

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2015**

**Martina Jakoubková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Studium vlivu chelatace iontů železa na  
akumulaci poškozené DNA a aktivaci kontrolních  
bodů buněčného cyklu myších embryonálních  
kmenových buněk**

**Diplomová práce**

**Martina Jakoubková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

**Vedoucí práce: RNDr. Leona Rašková Kafková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Leony Raškové Kafkové Ph.D. za použití citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce RNDr. Leoně Raškové Kafkové Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vedoucímu Ústavu biologie doc. Vladimíru Divokému a všem pracovníkům Ústavu biologie Lékařské fakulty UP v Olomouci za jejich ochotu a pomoc při práci.

## **Souhrn**

Teoretická část mé diplomové práce se zaměřuje nejprve na charakterizaci buněčného cyklu a jeho regulaci, následně pak na regulaci v přítomnosti poškozené DNA. Další část se zabývá charakterizací chelatačních činidel a jejich vlivem na buněčný cyklus. Antiproliferační účinek těchto látek je zprostředkován převážně inhibicí železo-obsahujícího enzymu ribonukleotid reduktázy. Inhibice pak vede k vyčerpání deoxyribonukleotidů, zastavení replikace DNA a aktivaci kontrolních signálních drah buněčného cyklu. U většiny buněčných typů dochází k blokaci buněčného cyklu v G1 fázi, méně pak v G2 fázi.

V experimentální části této diplomové práce byla testována chelatační činidla deferasirox a deferipron na liniích myších embryonálních kmenových buněk. Jejich odpověď na chelataci byla srovnána se somatickou buněčnou linií STO, která byla taktéž vystavena působení chelátorů.

V závěru mé diplomové práce jsou shrnuty dosažené výsledky a následně pak srovnány s výsledky mé bakalářské práce a s výsledky doposud publikovanými.

## **Summary**

The theoretical part of my thesis focuses on the characterization of the cell cycle regulation and regulation in the presence of DNA damage. The next part deals with the characterization of chelating agents and their influence on cell cycle

Iron chelators have antiproliferative effects. The response is mediated predominantly by inhibition of iron-containing enzyme ribonucleotide reductase. Inhibition leads to depletion deoxyribonucleotides, stop DNA replication and activation of the control pathways of the cell cycle. It leads to cell cycle arrest in the G1 phase of most cells, and less frequently in the G2 phase.

In the experimental part of this thesis we tested chelators deferiprone and deferasirox on the cell line of mouse embryonic stem cells. Their response to chelation was compared to somatic cell line STO, which were also exposed to those chelators.

At the end of my thesis are summarized and compared my results with the results previously published and published in my bachelor thesis.

## **Obsah**

<b>1 Cíl práce</b>	<b>8</b>
<b>2 Úvod</b>	<b>9</b>
<b>3 Současný stav řešené problematiky</b>	<b>10</b>
3.1 Charakteristika kmenových buněk	10
3.1.1 Nádorové kmenové buňky	11
3.2 Buněčný cyklus somatických buněk	11
3.2.1 Regulace buněčného cyklu	11
3.2.1.1 Cykliny, cyklin-dependentní kinázy (CDK) a jejich aktivace	12
3.2.1.2 Inhibitory cyklin-dependentních kináz	14
3.2.1.3 CDC25 fosfatázy	15
3.2.1.4 Inhibiční kinázy WEE1 a MYT1	15
3.2.1.5 Restrikční bod buněčného cyklu a regulace G1/S přechodu	16
3.2.1.6 Regulace S fáze	18
3.2.1.7 Regulace G2/M	18
3.2.2 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu	19
3.2.2.1 ATM/ATR senzorické kinázy	20
3.2.2.2 CHK1/CHK2 kinázy	21
3.2.2.3 Kontrolní mechanismus G1 fáze	22
3.2.2.4 Kontrolní mechanismus S fáze	22
3.2.2.5 Kontrolní mechanismus G2 fáze	23
3.3 Buněčný cyklus myších embryonálních kmenových buněk	25
3.3.1 Pluripotence a kontrola buněčného cyklu myších EKB	26
3.3.2 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu myších EKB	27
3.4 Vliv chelatace iontů železa na buněčný cyklus	28
3.4.1 Metabolismus železa	29

3.4.2 Vliv chelatace iontů železa na buněčný cyklus	30
3.5 Činidla chelatuující ionty železa	33
3.5.1 Desferioxamin mesylát	33
3.5.2 Deferasirox	34
3.5.3 Deferipron	34
<b>4 Experimentální část</b>	<b>36</b>
4.1 Materiál	36
4.2 Metody	36
4.2.1 Kultivace buněk	39
4.2.1.1 Myší embryonální kmenové buňky	39
4.2.1.1.1 Pasážování	39
4.2.1.1.2 Zamrazování	40
4.2.1.2 Myší embryonální fibroblasty	40
4.2.1.2.1 Pasážování	40
4.2.1.2.2 Zamrazování	40
4.2.2 Příprava chelatačních činidel	40
4.2.3 MTT test	41
4.2.4 Detekce proteinů	41
4.2.4.1 Buněčné lyzáty	42
4.2.4.2 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové	42
4.2.4.3 SDS-PAGE	42
4.2.4.4 Western blot	42
4.2.5 Průtoková cytometrie	44
4.2.5.1 Fixace buněk	44
4.2.5.2 Značení PI a anti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein	44
<b>5. Výsledky</b>	<b>46</b>
5.1 Testy cytotoxicity chelátorů železa	46



5.2 Aktivace kontrolních signálních drah buněčného cyklu chelátory železa	47
5.3 Dynamika buněčného cyklu	51
5.3.1 Dynamika buněčného cyklu v přítomnosti deferasiroxu	51
3.5.2 Dynamika buněčného cyklu v přítomnosti deferipronu	53
<b>6 Diskuze</b>	<b>55</b>
<b>7 Závěr</b>	<b>57</b>
Literatura	58
Použité zkratky	73

# 1 Cíl práce

1. Literární rešerše na téma regulace buněčného cyklu a aktivace kontrolních signálních drah. Vliv deprivace iontů železa na signální dráhy buněčného cyklu.
2. Detekce aktivace kontrolních signálních drah buněčného cyklu u myších embryonálních kmenových buněk a u myších embryonálních fibroblastů ošetřených chelatačními činidly deferasiroxem a deferipronem pomocí metody western blot.
3. Sledování dynamiky buněčného cyklu u buněk ošetřených deferasiroxem a deferipronem metodou průtokové cytometrie.
4. Porovnání účinku chelatačních činidel deferasiroxu, deferipronu a desferioxaminu z hlediska aktivace kontrolních signálních drah a dynamiky buněčného cyklu.

## 2 Úvod

Embryonální kmenové buňky se vyznačují schopností sebeobnovy a neomezené proliferace a diferenciaci. Vytvářejí vnitřní masu buněk embryonálního stádia blastocysty. Svou postupnou diferenciací dávají vzniknout všem buněčným typům dospělého organismu. Díky těmto vlastnostem mají embryonální kmenové buňky široký potenciál využití, a to především v regenerativní medicíně a vývojové biologii (Bishop a kol 2002).

Kmenové buňky se od diferenciovaných buněk liší délkou, strukturou a regulací buněčného cyklu. Jeden buněčný cyklus kmenových buněk trvá přibližně 10 hodin, což je výrazně kratší doba ve srovnání s buňkami diferencovanými, u nichž je délka buněčného cyklu v rozmezí 24h – několik let. Rozdíl ve struktuře buněčného cyklu spočívá zejména ve výrazném zkrácení G1 fáze. Na úrovni signálních drah vykazují kmenové buňky v průběhu celého buněčného cyklu vysokou aktivitu cyklin dependentních kináz a s tím související zvýšenou expresi jednotlivých typů cyklinů (Ballabeni a kol. 2011). K jejich rychlé proliferaci přispívá také absence restričního bodu v pozdní G1 fázi (viz kapitola 3.2.1.4 Restriční bod buněčného cyklu a regulace G1/S přechodu). Kontrolní signální dráhy aktivované genotoxickým stresem nejsou u kmenových buněk plně funkční, jako je tomu v případě somatických buněk, a neumožňují proto zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (viz kapitola 3.2.2 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu) (Abdelalim 2013).

Poznatky o průběhu a regulaci buněčného cyklu u embryonálních kmenových buněk mohou být aplikovány u nádorových kmenových buněk, které jsou nedílnou součástí každého nádoru a se kterými embryonální kmenové buňky sdílí řadu vlastností. Nádorové kmenové buňky stojí za vznikem, růstem a metastazováním nádorů. Aplikace vědomostí získaných studiem biologie kmenových buněk na nádorové kmenové buňky tak může přispět k vývoji nových přístupů v terapii nádorových onemocnění (Yu a kol. 2012).

Železo je esenciální pro funkci mnohých buněčných procesů. Deprivace železa pro buňku představuje stresový podnět, který způsobuje mimo jiné zastavení replikační vidličky prostřednictvím inhibice ribonukleotid reduktázy, obsahující jako kofaktor iont železa. Tento proces vede k aktivaci kontrolních signálních mechanismů způsobujících zástavu buněčného cyklu či apoptózu. Rychle proliferující buňky, k nimž patří také nádorové a kmenové buňky, přitom oproti somatickým buňkám vyžadují mnohem větší množství železa a vykazují rovněž vyšší citlivost vůči jeho nedostatku (Yu a kol. 2007).

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Charakteristika kmenových buněk

Kmenové buňky (KB) jsou výjimečné svou diferenciací kapacitou a schopností sebeobnovy. Právě tyto vlastnosti předurčují jejich využití ve vývojové biologii, regenerativní medicíně a modelování celé řady chorob (Bishop a kol. 2002).

U kmenových buněk rozlišujeme tři typy diferenciací kapacity. Diferenciací kapacitu, označovanou jako totipotence, mají embryonální KB (EKB) do fáze moruly, která obsahuje 8 buněk. Tyto EKB vykazují schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáň. Po této fázi vývoje následuje diferenciací buněk a formování blastocysty, která se skládá z diferencované vnější části trofoblastu a vnitřní masy pluripotentních EKB. Jako pluripotenci označujeme schopnost buněk diferencovat pouze do embryonálních tkání ektodermu, mezodermu a endodermu (Wobus, Boheler 2005). Dalším typem diferenciací kapacity je multipotence. Tato diferenciací se omezuje pouze na jedinou buněčnou linii. Příkladem jsou kmenové buňky kostní dřeně produkující krevní elementy – v tomto případě „dospělé“ KB proliferují a diferencují do konkrétního typu buněk, u nichž došlo k poškození nebo k jejich úplné ztrátě. Multipotentní KB vykazují určitou plasticitu z hlediska diferenciacího programu daného tkáňovým prostředím. Po jejich přemístění do jiné tkáň jsou multipotentní KB schopny změnit svůj diferenciací program, přičemž tento jev označujeme jako transdiferenciací (Wagners, Weissman 2004). Proces sebeobnovy představuje schopnost kmenové buňky produkovat další identické KB. S touto schopností souvisí symetrické a asymetrické dělení. Výsledkem symetrického dělení KB jsou 2 dceřiné buňky identické s mateřskou buňkou. Takové dělení lze pozorovat jednak během embryonálního vývoje obratlovců i bezobratlých, jednak při hojení a regeneraci tkání. Symetrickým dělením vždy dochází ke zvýšení počtu KB. Asymetrické dělení jejich počet zachovává. Tímto dělením vzniká jedna buňka identická s mateřskou, zatímco druhá buňka podstupuje proces diferenciací. Rovnováhu mezi symetrickým a asymetrickým buněčným dělením kontrolují externí signály, což zajišťuje vznik ideálního počtu kmenových a diferencovaných buněk (Morrison, Kimble 2006).

KB jsou buňky přirozeně imortalizované. Jejich imortalizace souvisí s vysokou aktivitou telomerázy, enzymu, katalyzujícího prodlužování telomer. S diferenciací dochází k utlumování aktivity tohoto enzymu a u somatických buněk jsou telomerázy inaktivní, což

vede k postupnému zkracování telomer a senescenci. V malé míře je telomeráza funkční i u dospělých KB (Armstrong a kol. 2005).

### **3.1.1 Nádorové kmenové buňky**

Nádorové kmenové buňky (NKB) jsou nedílnou součástí většiny tumorů. NKB mají schopnost sebeobnovy, díky vysoké aktivitě telomeráz mají neomezený proliferační potenciál a jsou multipotentní. K objevu nádorových NKB došlo v malignitách hematopoetického systému i v solidních tumorech. Tyto buňky jsou v nádoru zastoupeny velmi malou buněčnou populací, obvykle v rozmezí 0,5-5%, která však stojí za vznikem a regenerací tumoru. Díky těmto buňkám, dokáže nádorová tkáň odolávat chemoterapii a dochází k relapsu nádorových onemocnění. Tuto schopnost většinová populace buněk nádoru nemá (Yu a kol. 2012).

NKB mohou vzniknout z normálních tkáňových KB, které většinu času tráví v G0 fázi. Buňka však vykazuje schopnost opravy chyb v DNA pouze při procesu sebeobnovy, a proto se u nedělících se KB v G0 fázi působením karcinogenů hromadí mutace, na jejichž základě může dojít k přeměně normální KB na nádorovou. Druhou možností je vznik nádorové KB z více diferencované buňky, která získala schopnost sebeobnovy (Dean a kol. 2005).

Nádorové KB dávají vzniknout nádorovým buňkám s již omezeným proliferačním potenciálem a konečným počtem dělení. Z fyziologického hlediska by se tento proces nazýval diferenciací, při němž buňka dosáhne určité funkce v dané tkáni a dále již nepokračuje ve svém dělení. Nicméně v případě rakovinných buněk k takovéto funkční specializaci nedochází, pouze k postupnému zpomalování buněčného dělení až do bodu, kdy se zastaví úplně (Dean a kol. 2005).

Pluripotentní a nádorové KB sdílí mnoho vlastností. Z hlediska léčby rakoviny je významná také jejich rezistence vůči lékům a toxickým látkám, způsobená expresí ABC transportérů. Z tohoto důvodu lze poznatky získané na základě studia biologie KB aplikovat na NKB a vývoj nových terapeutických strategií (Dean a kol. 2005).

## **3.2 Buněčný cyklus somatických buněk**

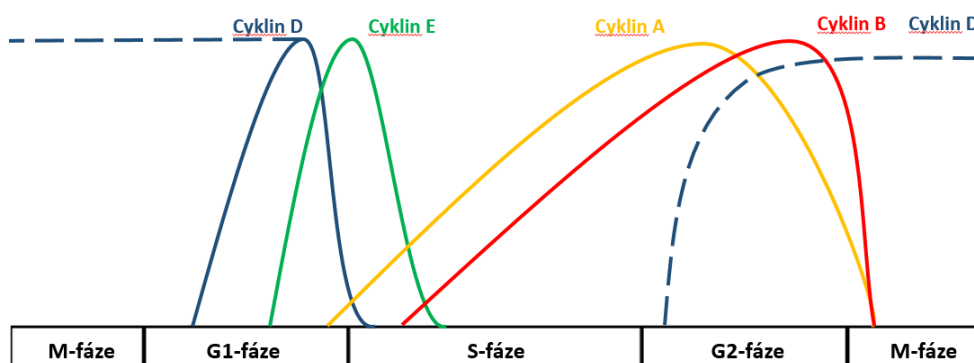
### **3.2.1 Regulace buněčného cyklu**

Buněčný cyklus dělíme na dvě základní části – interfázi a mitotickou fázi. Interfáze se skládá z S fáze, G1 fáze a G2 fáze, kdy buňka roste a replikuje svou DNA (Vermeulen a kol

2003). Mitotická fáze se skládá z profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Jednotlivé fáze buněčného cyklu vyžadují striktní regulaci. Zejména replikace DNA v S fázi a následné přesné rozdělení DNA do dceřiných buněk během mitotického dělení je na tuto regulaci náročná (Hartwell, Kastan 1994). V rámci buněčného cyklu existuje celá řada mechanismů, které zajišťují přesné načasování všech procesů a jejich správné dokončení. Stresové podněty vytvářejí nepříznivé podmínky pro pokračování buněčného cyklu, čímž mohou aktivovat kontrolní mechanismy způsobující zastavení buněčného cyklu, senescenci nebo apoptózu. Mutace genů, které jsou součástí signálních drah buněčného cyklu, vedou často ke zvýšení genetické nestability a vzniku rakoviny (Hartwell, Kastan 1994).

### 3.2.1.1 Cykliny, cyklin-dependentní kinázy (CDK) a jejich aktivace

Hlavním regulátorem buněčného cyklu jsou cyklin-dependentní kinázy (CDK) patřící mezi serin/threonin proteinkinázy, které fungují v komplexu s vazebným partnerem cyklinem. Hladina CDK je v průběhu buněčného cyklu konstantní, zatímco hladina cyklinů kolísá (Obr. 1). Změny aktivity CDK umožňují regulovat přechod z jedné fáze buněčného cyklu do fáze následující. U kvasinek existuje pouze jeden multifunkční CDK1 řídící progresi celým buněčným cyklem a 9 cyklinů, které se účastní regulace buněčného cyklu (Miller, Frederick 2000; Satyanarayana, Kaldis 2009). U vyšších eukaryot bylo nalezeno přes 20 proteinů z této skupiny a stejné množství příslušných cyklinů. Ne všechny tyto cykliny se ale podílí na regulačních mechanismech buněčného cyklu. Pro každou fázi buněčného cyklu je specifická aktivita konkrétního cyklin/CDK komplexu. (Satyanarayana, Kaldis 2009).



**Obr. 1: Oscilace hladiny cyklinů.** Cykliny typu A, B, D a E spolu s CDK vytváří základní síť signálních drah regulujících buněčný cyklus. Pro každou fázi buněčného cyklu je specifický daný typ cyklinu, který aktivuje konkrétní CDK. Přerušovaná čára u cyklinu D znázorňuje zvýšení hladiny v G2 fázi pouze v přítomnosti stálého mitogenního stimulu. V tomto případě hladina cyklinu D přetrvává až do další G1 fáze. V opačném případě vstupuje buňka do nedělící se G0 fáze.

Cykliny jsou hlavním regulačním mechanismem kinázové aktivity CDK. Samostatná CDK nevykazuje žádnou kinázovou aktivitu. Asociace CDK s cyklinem vyvolá konformační změnu, která odkrývá aktivní katalytické místo na CDK a tím umožňuje přenos signálu. Kromě aktivace CDK zajišťuje vazba cyklinu také jeho substrátovou specifitu. Evolučně se homologie cyklinů pohybuje mezi 30 – 50 %. Všechny cykliny sdílí homologní region čítající 100 aminokyselin, označovaný jako cyklinový box, který interaguje s CDK. CDK jsou rovněž vysoce homologní proteiny, a to ze 45 – 70 % (Jeffrey a kol. 1995). Samotná vazba cyklinu na CDK není pro její aktivaci dostačující. Dále je nezbytná fosforylace v aktivním katalytickém místě CDK, na pozici Thr 161. Tuto fosforylaci katalyzuje CDK aktivační kináza (CAK). Vazba cyklinu aktivuje pouze bazální aktivitu CDK. Teprve fosforylace prostřednictvím CAK umožňuje jeho plnou aktivaci (Aprelikova a kol. 1995). Pro fosforylaci je však vazba cyklinu, který změnou konformace CDK odkrývá pozici Thr 161, nezbytná (Jeffrey a kol. 1995). Savčí CAK se skládá ze tří podjednotek katalytické CDK7, regulační podjednotky cyklinu H a podjednotky MAT1. Společně s dalšími 6 podjednotkami je CAK také součástí transkripčního faktoru TFIIF (Lolli, Johnson 2005). Fosforylace v některých pozicích může vést naopak k inhibici aktivity CDK, tu provádí kinázy WEE1 a MYT1 (viz kapitola 3.2.1.4 Inhibiční kinázy WEE1 a MYT1).

Cykliny typu D, mezi které řadíme D1, D2 a D3, asociují s CDK4 a CDK6 a vzniklé komplexy zodpovídají za aktivaci buněčného cyklu v G1 fázi. Cykliny D patří mezi jediné cykliny, jejichž expresi indukuje mitogenní podnět. Aktivovaný CDK4/6 fosforyluje retinoblastomový protein (Rb) a další příbuzné proteiny (viz kapitola 3.2.1.4 Restrikční bod buněčného cyklu a regulace G1/S přechodu). CDK4 je exprimován ve všech buňkách, zatímco CDK6 preferenčně v hematopoetických progenitorech a jeho mutace se tedy projevuje defekty právě v hematopoetickém systému (Malumbres a kol. 2004). Tři typy cyklinu D zastávají v některých buňkách specifickou funkci, ale mohou se ve své funkci úplně nebo částečně zastoupit. Deficience jednoho ze tří typů má za následek tkáňově specifické defekty. Deficience všech tří typů cyklinů D má během embryogeneze letální následky, což znamená, že k dělení embryonálních buněk dochází nezávisle na aktivitě cyklinu D, protože zahájení dalšího buněčného cyklu EK buněk nevyžaduje přítomnosti mitogenu (Carthon a kol. 2005).

Cykliny typu E, konkrétně E1 a E2, regulují přestup z G1 do S fáze kompletní inaktivací Rb. Cykliny E1 a E2 jsou vzájemně funkčně redundantní (Parisi a kol. 2003). Deficit obou cyklinů E současně vede k letalitě během embryonálního vývoje. Cyklin E není esenciální pro vstup do S fáze u proliferujících buněk. Jeho funkci může převzít cyklin A.

Hlavní význam cyklinu E spočívá v řízení reaktivace buněčného cyklu u buněk v G0 fázi (Geng a kol. 2003). Při aktivaci buněčného cyklu umožňuje komplex E/CDK2 vazbu MCM (*mini chromosome maintenance complex*) na replikační počátek. U proliferujících buněk se MCM připojuje k replikačnímu počátku krátce po dokončení mitózy, a to v nepřítomnosti cyklinu E/CDK2. Stejný mechanismus také zabraňuje endoreduplikaci DNA v trofoblastových buňkách (Geng a kol. 2003). Cykliny typu A zahrnují cykliny A1 a A2. K expresi cyklinu A1 dochází v germinálních buňkách, avšak esenciální je pouze pro buňky samčí. Cyklin A2 je nepostradatelný pro přechod buněčného cyklu z G1 do S fáze a pro vstup buňky do mitózy. (Winston a kol. 2000).

Cykliny typu B čítají 3 homology – B1, B2 a B3. Každý z těchto homologů má odlišnou funkci. Cyklin B1, jehož deficiencie je pro buňku letální, je hlavním regulátorem vstupu buňky do mitózy. Během interfáze se vyskytuje v cytoplazmě a teprve před vstupem do mitózy nastává jeho transport do jádra. Cyklin B2 je umístěn na Golgiho aparátu, kde se podílí na jeho rozpadu a segregaci do dceřiných buněk (Jackman a kol. 1995). Exprese cyklinu B3 se omezuje pouze na varlata a fetální vaječníky (Nguyen a kol. 2002).

### 3.2.1.2 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou dalším regulátorem aktivity CDK. Do první skupiny inhibitorů patří proteiny rodiny INK4, které inhibují kinázy CDK4 a CDK6 – p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> a p19<sup>INK4d</sup> (Hirai a kol. 1995). Jejich exprese je aktivována antimitogenními signály, mezi které řadíme kontaktní inhibici, senescenci nebo TGF- $\beta$  (Malumbres a kol. 2004). Všechny inhibitory této skupiny sdílí stejné strukturní a biochemické vlastnosti (Hirai a kol. 1995). Exprese jednotlivých členů této rodiny je tkáňově specifická a také závislá na vývojovém stádiu organismu (Zindy a kol. 1997). INK4 inhibitory se váží jak na samotný CDK4(6), tak na komplex cyklin D/CDK4(6) (Jeffrey a kol. 2000).

Druhá skupina inhibitorů, která inhibuje kinázy CDK1 a CDK2, náleží do rodiny proteinu Cip/Kip. Patří sem proteiny p21 (viz kapitola 3.2.2.3 Kontrolní mechanismus G1 fáze), p27 a p57. Tyto inhibitory se vážou na komplex cyklinu s CDK a tím jej inhibují. Cip/Kip inhibitory CDK hrají úlohu při zástavě buněčného cyklu v reakci na kontaktní inhibici, proliferaci, diferenciaci, narušení genomové integrity a další stresové podněty. Na rozdíl od předchozí skupiny inhibitorů regulují aktivitu cyklinu A, D, E a B prostřednictvím vazby na komplex cyklin/CDK (Sherr, Roberts 1999).



### 3.2.1.3 CDC25 fosfatázy

CDC25 fosfatázy regulují postup do další fáze buněčného cyklu defosforylační aktivací CDK. U savců existují 3 homology tohoto enzymu - CDC25A, CDC25B a CDC25C. CDC25 fosfatázy jsou cílem kontrolních mechanismů buněčného cyklu, které vedou k její degradaci. K expresi CDC25A dochází od pozdní G1 fáze a k jeho degradaci pak na samotném konci mitózy. Akumulace CDC25B nastupuje během S fáze a vrcholí v mitóze, kdy je CDC25B také degradován (Boutros a kol. 2006). CDC25C je přítomen v průběhu celého buněčného cyklu. Aktivitu CDC25 rovněž reguluje subcelulární lokalizace (Lopez-Girona a kol. 1999).

CDC25A se podílí převážně na regulaci G1/S fáze, kde aktivuje komplex cyklinu E/CDK2 a cyklinu A/CDK2. Exprese CDC25A je transkripčně aktivována E2F a c-MYC transkripčními faktory (Lindqvist a kol. 2005).

Klíčovým regulátorem CDC25B je cyklin A/CDK2. CDC25B představuje důležitý regulátor vstupu buňky do mitotické fáze (Mitra, Endres 2003). Jeho úloha spočívá v defosforylaci a aktivaci cyklin B/CDK1 lokalizovaného na centrozomech, kde reguluje mitotický aparát (Lindqvist a kol. 2005).

CDC25C je během interfáze udržován v inaktivním stavu asociací s 14-3-3 proteinem. Tento komplex disociuje před vstupem do mitózy díky fosforylaci CDC25C prostřednictvím cyklinu B/CDK1 a Polo-like kinázy (PLK), což způsobuje kompletní aktivaci CDC25C. Aktivní fosfatáza defosforyluje cyklin B/CDK1 a zpětnovazebně tak zesiluje aktivitu tohoto komplexu (Perdiguero, Nebreda).

Mezi homology fosfatáz existuje i funkční redundance. Myši deficientní na CDC25C jsou zcela zdravé a u odvozených buněk probíhá normální buněčný cyklus. Inaktivace CDC25B vede pouze ke sterilitě u samic a také v tomto případě probíhá u odvozených buněk normální buněčný cyklus. Deficience CDC25B i CDC25C rovněž nebrání průběh buněčného cyklu, z čehož vyplývá schopnost CDC25A kompenzovat funkci obou těchto fosfatáz (Ferguson a kol. 2005).

### 3.2.1.4 Inhibiční kinázy WEE1 a MYT1

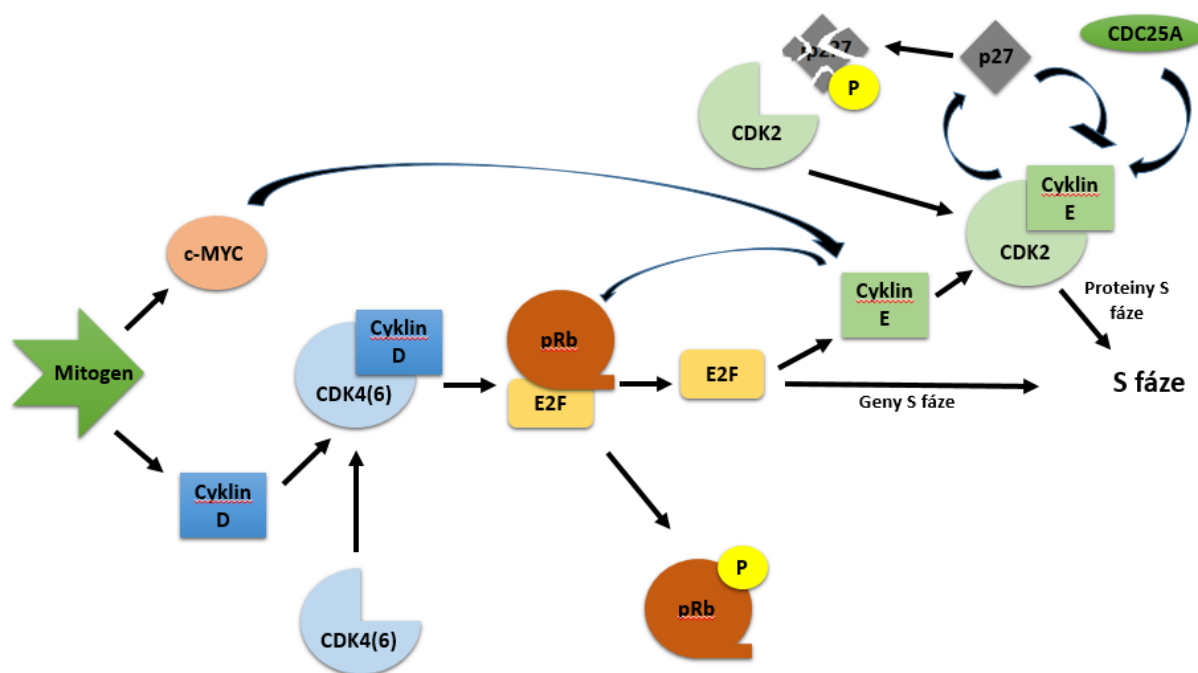
WEE1 a MYT1 kinázy jsou negativními regulátory CDK1 a CDK2. Fosforylují v pozici Thr14/Tyr15, čímž brání vazbě ATP a inhibují tak aktivitu CDK. Podílí se tedy na časování vstupu do S fáze a jejím průběhu (regulace CDK2), následně vstupu do mitózy a

také inhibici CDK v případě aktivace kontrolních signálních mechanismů (regulace CDK1). CDC25 fosfatázy fosforylaci v obou pozicích odstraňují (viz kapitola 3.2.1.3 CDC25 fosfatázy) (Hughes a kol. 2013).

Obě tyto kinázy se liší svou lokalizací – zatímco WEE1 je během interfáze přítomen v jádře a teprve při vstupu buňky do mitózy dochází k jeho přesunu do cytoplazmy, MYT1 se v buňce vyskytuje vázaný na membránu Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula (Baldin, Ducommun 1995, Liu a kol. 1997).

### 3.2.1.5 Restrikční bod buněčného cyklu a regulace G1/S přechodu

Restrikční bod je signální dráha, která se nachází před koncem G1 fáze a rozděluje buněčný cyklus na dvě části – na část závislou na mitogenních faktorech a na část na mitogenních faktorech nezávislou. V části závislé na mitogenních faktorech může buňka přejít do fáze klidové, G0 fáze. Jakmile ale přejde restrikční bod, musí buněčný cyklus dokončit (Obr. 2) (Novák, Tyson 2004).



**Obr. 2: Restrikční bod buněčného cyklu.** Restrikční bod představuje důležitý mezník v G1 fázi, po jehož překročení musí buňka dokončit své dělení. Klíčovým proteinem tohoto bodu je pRb, který blokuje aktivitu transkripčního faktoru E2F. Vazbu pRb na E2F může být narušena fosforylací pRb na celé řadě míst. pRb může být fosforylováno komplexy cyklin D/CDK4(6) a cyklin E/CDK2. Uvolněním E2F transkripčního faktoru dochází k jeho aktivaci, indukci exprese genů S fáze.

Začátek G1 fáze je spojen s aktivitou komplexu cyklinu D/CDK4(6) jehož substrátem je Rb protein. Specifickou fosforylací Rb proteinu dochází k jeho parciální inaktivaci, k následnému uvolnění E2F transkripčního faktoru a k expresi genů potřebných pro přechod do S fáze (např. cyklin A a cyklin E). pRb protein je v první polovině G1 fáze fosforylován komplexem cyklinu D/CDK4(6), následně pak komplexem cyklinu E/CDK2, čímž je zajištěna jeho plná inaktivace. Expresi cyklinu D zahajuje externí signální podnět, kterým je nejčastěji vazba růstového faktoru aktivujícího hlavní mitogenní signální dráhu mitogenem-aktivované kinázy (MAPK) (Klein, Assoian 2008). Při vstupu do S fáze dochází k radikálnímu snížení hladiny cyklinu D prostřednictvím glykogen syntázy kinázy 3 (GSK3), která fosforyluje cyklin D v pozici Thr 286. Následuje jeho export z jádra a snížení proteinové stability (Guo a kol. 2005). Tato redukce hladiny cyklinu D je nutná z důvodu jeho vazby na PCNA, která inhibuje replikaci DNA (Pagano a kol. 1994). U kontinuálně proliferujících buněk přetrvává mitogenní podnět, který způsobuje opětovné navýšení hladiny cyklinu D v G2 fázi skrze stabilizaci mRNA cyklinu D. Tato zvýšená hladina přetrvává do další G1 fáze, která se tímto stává nezávislá na aktivaci mitogenu a pokračuje dále do S fáze (Guo a kol. 2005).

Skupina E2F obsahuje celkem 6 proteinů. E2F představují aktivátory transkripce v komplexu s DP proteiny (DP1, DP2), se kterými vytváří aktivní heterodimer. V komplexu s rodinou Rb proteinů (pRb, p107, p130) je transaktivační doména E2F maskována, následně je zde rekrutována histon deacetyláza a exprese genu je takto suprimována. Každý ze šesti E2F preferenčně váže odlišný Rb protein (Wells a kol. 2000).

Na pRb se nachází několik fosforylačních míst pro CDK. Odlišná fosforylační místa umožňují přepínat pRb do několika funkčních stupňů. Vazba E2F transkripčního faktoru je regulována 7 fosforylačními místy a inhibována 2 postupnými fosforylacemi (Knudsen, Wang 1997). Tuto specifickou fosforylací provádí cyklin D/CDK4(6) v pozdní G1 fázi, čímž zároveň částečně inaktivuje pRb. Kompletní inaktivace je pak dokončena fosforylací prostřednictvím cyklinu E/CDK2 (Lundberg, Weinberg 1998). Po vstupu do S fáze udržuje hyperfosforylací aktivita cyklinu A/CDK2 (Sherr 1996). K defosforylací pRb pak dochází v anafázi, a to působením enzymu fosfoprotein fosfatázy typu 1 (PP1) (Ludlow a kol. 1992).

Aktivace transkripce cyklinu E probíhá přes pRb/E2F signální dráhu, kde fosforylace prostřednictvím cyklinu D/CDK4(6) způsobuje uvolnění histon deacetylázy z represivního komplexu s pRb (Zhang a kol. 200). Cyklin E je navíc schopen zesilovat svou vlastní expresi skrze pozitivní zpětnovazebnou smyčku, kdy dochází k plné aktivaci E2F transkripčního faktoru (Ohtani a kol. 1995). Druhou paralelní dráhou k pRb/E2F, která aktivuje transkripci

cyklinu E, představuje aktivace transkripčního faktoru c-MYC. Ten je indukován vnějším mitogenním stimulem (Santoni-Rugiu a kol. 2000). Kromě pRb musí cyklin E/CDK2 překonat také supresivní efekt inhibitoru p27, který spouští negativní zpětnovazebnou smyčku. Toho cyklin E/CDK2 dosahuje fosforylací p27 a jeho následnou degradací (Tesvetkov a kol. 1999). Poločas cyklinu E je méně než 30 minut. Nejvyšších hladin tento cyklin dosahuje na počátku S fáze při zahájení replikace DNA. (Singer a kol. 1999)

### **3.2.1.6 Regulace S fáze**

K zahájení S fáze buněčného cyklu dochází společně s iniciací replikace DNA, její ukončení pak nastává v momentě, kdy je celý genom zreplikován. Začátek, průběh a konec S fáze podléhá regulaci tak, aby došlo k přesné replikaci každého úseku DNA pouze jedenkrát (Takeda, Dutta 2005).

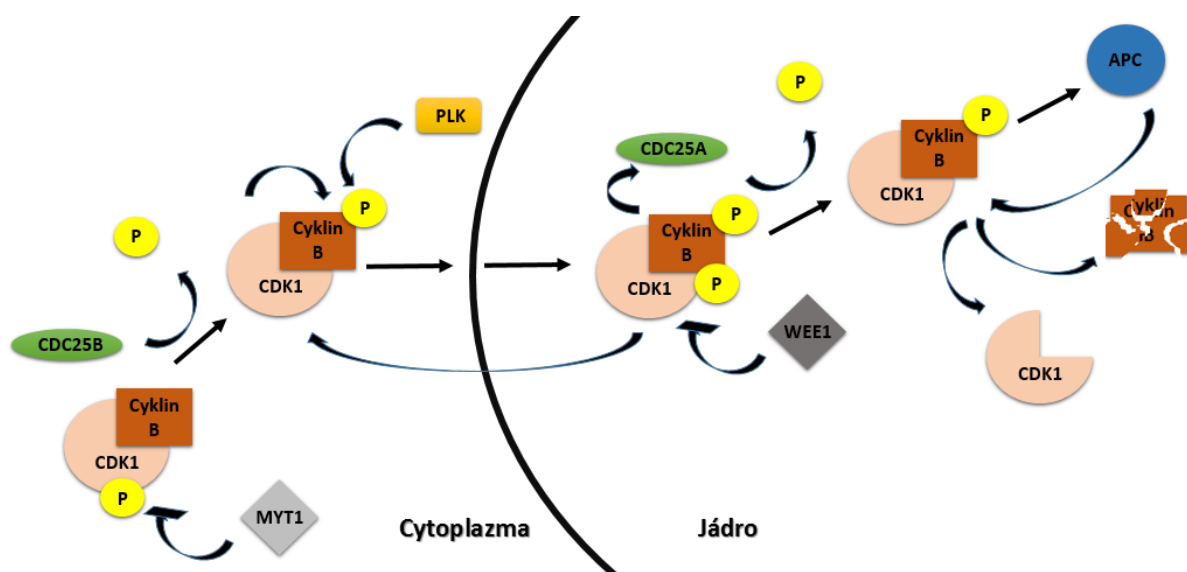
Replikaci DNA je zahájena transkripcí genů řízenou E2F transkripčním faktorem. Jedná se o geny pre-replikačního komplexu (CDC6, CDT1 a MCM proteiny) (Jackson a kol. 1995). Na počátku S fáze dochází k aktivaci tohoto komplexu a k jeho transformaci na pre-iniciační komplex, kterou umožňují proteiny regulované taktéž E2F transkripčním faktorem (Zou, Stillman 2000). Jak již bylo uvedeno, negativní regulace replikace zajišťuje, že dojde pouze k jediné aktivaci pre-replikačního komplexu v průběhu celého buněčného cyklu, což zabraňuje opakované replikaci daného úseku DNA. Tento mechanismus se uskutečňuje prostřednictvím proteinu CDC6, který je pro zahájení replikace nezbytný. Na počátku S fáze dochází k fosforylaci CDC6 aktivitou cyklin A/CDK2 a k jeho následnému transportu z jádra do cytoplasmy, což zabraňuje opětovnému vytvoření pre-replikačního komplexu (Petersen a kol. 1999).

### **3.2.1.7 Regulace G2/M**

Pro vstup do M fáze je vyžadována aktivita komplexu cyklinu B1/CDK1. Aktivitu tohoto komplexu reguluje celá řada proteinů, které často vytváří pozitivní zpětnovazebné smyčky a tím aktivitu B1/CDK1 zesilují (Fung, Poon 2005).

Akumulace komplexu B1/CDK1 začíná v S fázi a vrcholí na konci G2 fáze před vstupem do mitózy. Jeho transkripce je aktivována transkripčními faktory B-MYB, E2F, FOXM1 a NF-Y (Fung, Poon 2005). Vzniklá aktivita cyklin B1/CDK1 aktivuje APC, který zpětnovazebně ubikvitinuje a degraduje cyklin B1. Inaktivace kinázové aktivity CDK je striktně vyžadována pro dokončení mitózy (Golan a kol. 2002).

Na další úrovni reguluje aktivitu komplexu cyklin B1/CDK1 fosforylace a lokalizace. V průběhu interfáze dochází k translokaci do cytoplazmy. Fosforylace cyklin B/CDK1 autofosforylací nebo prostřednictvím PLK1 dochází k odkrytí nukleárního lokalizačního signálu na CDK, který umožňuje relokizaci komplexu z cytoplazmy do jádra. Inhibiční kinázy MYT1 a WEE1 naopak zajišťují export komplexu z jádra do cytoplazmy (Toyoshima-Morimoto a kol. 2000). Vstup do mitózy se potom uskutečňuje nahromaděním dostatečného množství cyklin B/CDK1 v jádře, který zde stabilizuje CDC25A a potlačuje inhibiční efekt WEE1 (Obr. 3) (Lindqvist a kol 2009).



**Obr. 3: Aktivace cyklinu B/Cdk1 a vstup do mitózy.** Před vstupem do mitózy dochází k relokizaci cyklinu B/CDK1 mezi jádrem a cytoplazmou a naopak. Inhibiční kinázy WEE1 (v jádře) a MYT1 (v cytoplazmě) zajišťují lokalizaci komplexu do cytoplazmy. Autofosforylace a fosforylace prostřednictvím PLK naopak směřují komplex do jádra. Při vstupu do mitózy dochází k nahromaděním cyklin B/CDK1 v jádře a k aktivaci CDC25 duální fosfatázy, která odstraňuje fosforylaci inhibičních kináz. Aktivní komplex aktivuje APC, který zpětně degraduje cyklin B a inhibuje aktivitu CDK1.

### 3.2.2 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu

Buněčný cyklus vyžaduje udržení genomické stability a prevenci vzniku mutací a poškození DNA. Za tímto účelem se v buněčném cyklu nacházejí kontrolní signální dráhy, ve kterých je buňka schopná pozastavit buněčný cyklus v případě, že dojde k narušení integrity genomu. Tento mechanismus také umožňuje vyrovnat se s dalšími stresovými situacemi, mezi které patří nedostatek živin, nízká hladina kyslíku, aktivace onkogenu. V případě nevratného poškození pak buňka podstupuje apoptózu, neboť mutace složek signálních drah kontrolních bodů či molekul reparačních mechanismů představují častou příčinu genetických onemocnění

a rakoviny (Kastan, Bartek 2004). Kontrolní body navíc zajišťují pozastavení buněčného cyklu před kompletním dokončením předchozí fáze (Hartwell, Weinert 1989).

Molekuly signálních drah zprostředkovávajících odpověď na přítomnost poškozené DNA, výsledkem jejichž činnosti je zastavení buněčného cyklu, se skládají ze 3 základních skupin proteinů. První skupina zahrnuje senzoričké proteiny kinázy ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) a ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*), které rozpoznávají a váží poškozenou DNA. Druhá skupina proteinů, do níž řadíme CHK1 a CHK2, signál amplifikuje a převádí na třetí skupinu molekul, efektorové proteiny. Tato poslední skupina pak řídí buněčný cyklus, přestavbu chromatinu nebo se podílí na reparačních mechanismech. V mé práci se zaměřím na klíčové proteiny drah kontrolních bodů buněčného cyklu (Hartwell, Weinert 1989).

### 3.2.2.1 ATM/ATR senzoričké kinázy

ATM a ATR jsou Ser/Thr kinázy řadící se do skupiny fosfatidyl inositol-3-kináz (PIKK). Jedná se o velké proteiny s molekulovou hmotností 301 – 469 kDa. Zatímco ATM je aktivována přítomností dvouvláknových DNA zlomů, ATR je aktivována zlomy jednovláknovými a inhibicí replikační vidličky. PIKK sice jistou bazální afinitu pro poškozenou DNA vykazují, jejich vazba je však regulována interakcí se specifickým pomocným proteinem. V případě ATR se jedná o ATRIP (ATR interakční protein), v případě ATM pak o MRN komplex. MRN komplex se skládá z MRE11, RAD50 a NBS1 proteinů (Falck a kol. 2005).

V inaktivní formě se ATM v buňce vyskytuje ve formě dimeru, který není schopen fosforylovat své substráty. Poškození DNA však vyvolá jeho autofosforylaci, čímž způsobuje rozpad inaktivního dimeru na aktivní monomery. Samotná aktivace ATM ale není iniciována vznikem zlomů v DNA, nýbrž změnou struktury chromatinu, ke které došlo v blízkosti dvouvláknového zlomu (Bakkenist, Kastan 2003). Druhým krokem aktivace ATM je jeho vazba do dvouvláknového zlomu zprostředkovaná interakcí s NBS1, který, jakožto součást MRN komplexu, umožňuje relokizaci ATM do místa poškození (Falck a kol. 2005). V pozici dvouvláknového zlomu se zároveň nezávisle na aktivaci ATM akumulují některé z jeho substrátů, jako jsou BRCA1, SMC1 nebo NBS1, které se podílejí nejen na relokizaci ATM, ale mají také význam v odpovědi na poškozenou DNA (Kitagawa a kol 2004). V rámci vědeckých studií bylo prokázáno, že ATM není pro normální průběh buněčného růstu ani pro diferenciaci buňky esenciální. Mutace genů, způsobující vznik nefunkčního ATM, vede ke

genetickému onemocnění ataxia-telangiectasia – poruše projevující se neuronální degenerací, imunodeficiencí, genomickou nestabilitou a predispozicemi k rakovině (Shiloh, Kastan 2001). Protein ATR je nepostradatelný při buněčné odpovědi na replikační stres, který může být způsoben různými fyziologickými stavy nebo takovým typem poškození DNA, při němž vzniká jednovláknový zlom. Společným meziproduktem těchto poškození, detekovatelných pouze jedním senzorem, je jednovláknová DNA (ssDNA). Ta se v buňce nikdy nevyskytuje v samostatné formě, ale pokryta replikačním proteinem A (RPA), který hraje úlohu nejen při replikaci, ale podílí se také na signalizaci kontrolních mechanismů zahrnujících ATR. RPA pak umožňuje lokalizaci komplexu ATR-ATRIP (Zou, Elledge 2003).

### 3.2.2.2 CHK1/CHK2 kinázy

Mezi jedny z nejvýznamnějších substrátů ATM a ATR patří CHK 1/2 kinázy, které se řadí mezi Ser/Thr kinázy. Úkolem těchto kináz je přenos a amplifikace signálu ze sensorických molekul skupiny PIKK na efektorové molekuly (Bartek, Lukas 2003). Původním předpokladem ohledně aktivace CHK kináz prostřednictvím ATR/ATM bylo, že se jedná o dvě paralelní dráhy odpovídající na odlišné genotoxické stimuly, kdy CHK1 a ATR tvoří jednu signální dráhu a CHK2 a ATM druhou. Později však bylo prokázáno, že dochází i k jejich propojení (Gatei a kol. 2003).

Exprese CHK1 kinázy je regulována E2F transkripčním faktorem (Lukas a kol. 2001). CHK1 kináza je nezbytná pro embryonální buňky. Její absence vede k jejich letalitě. To ale neplatí pro somatické buňky, kdy CHK1 deficiencie vede k defektům při replikaci DNA a buněčném růstu (Zachos a kol, 2003).

CHK2 je stabilní jaderný protein exprimovaný v průběhu celého buněčného cyklu. Germ line mutace vedou ke vzniku onemocnění zvaného Li-Fraumeni syndrom, pro který jsou typické predispozice ke vzniku maligních nádorů různého původu (Lukas a kol. 2001).

CHK1 a CHK2 sdílejí mnoho substrátů, jako je MDM2, p53 nebo CDC25A/C. Unikátními substráty pro CHK2 jsou např. BRCA1 (důležitý pro opravu DNA) a PLK3 (důležitý pro zastavení buněčného cyklu). V případě CHK1 se pak jedná o TLK1/2 (remodelace chromatinu). V závislosti na stresovém stimulu a aktuálním stavu buňky je aktivována konkrétní signální dráha (Bartek, Lukas 2003).

### 3.2.2.3 Kontrolní mechanismus G1 fáze

Kontrolní bod G1 fáze umožňuje vstup do S fáze v případě, není-li narušena integrita genomu. Při poškození DNA dochází k dočasnému nebo permanentnímu zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a při rozsáhlém narušení DNA až k apoptóze. V G1 fázi je odpověď dominantně zprostředkovávána dvěma signálními drahami, které mají odlišnou rychlost odpovědi a dobu trvání (Kastan, Bartek 2004).

Zastavení buněčného cyklu je řízeno transkripčním faktorem p53, jehož aktivita je řízena fosforylací několika reziduí ATM, CHK1 a CHK2 kinázami (Craig a kol. 2003). Za fyziologických podmínek je hladina p53 v buňce velmi nízká a p53 je vázán na MDM2 (Kubbutat a kol. 1997). MDM2 je ubikvitin ligáza, která p53 ubikvitinyluje a je zodpovědná za jeho proteazomovou degradaci. Fosforylace prostřednictvím „upstream“ kináz narušuje interakci p53 s MDM2, p53 je stabilizován, dochází ke zvýšení jeho hladiny a tím k aktivaci transkripce. Exprese genu pro MDM2 je indukována aktivovaným p53, což způsobuje negativní zpětnovazebnou regulaci (Poyurovsky a kol. 2010). Druhou možností regulace aktivity p53 jsou post-translační modifikace. Fosforylace p53 na jiných místech než na výše zmíněných Thr 18, Ser 20 a Ser 15 prostřednictvím ATM, ATR, CHK1, CHK2 DNA-PK a dalších mohou regulovat stabilitu a transkripční aktivitu p53. Acetylace taktéž inhibuje vznik represivního komplexu p53 s MDM2. Jedním z efektorových proteinů kontrolního bodu buněčného cyklu, jehož exprese je řízena prostřednictvím p53, je inhibitor p21. p21 inhibuje komplexy cyklin A/CDK 2 a cyklin E/CDK2. Inhibicí těchto komplexů nemůže dojít k fosforylaci pRb a uvolnění transkripčního faktoru E2F, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1/S (Brugarolas a kol. 1998). Dalším způsobem, jakým p21 přispívá k zastavení buněčného cyklu, je přímá blokáce DNA syntézy interakcí s PCNA - důležitým faktorem při vzniku replikačního komplexu a při samotné replikaci (Oku a kol. 1998).

Druhá signální dráha vede k degradaci CDC25A fosfatázy. CDC25 fosfatázy kontrolují přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu prostřednictvím aktivace CDK (viz kapitola 3.2.1.3 CDC25 fosfatázy). CHK1/2 aktivované kinázy poškozením DNA fosforylují CDC25A, čímž dochází ke snížení jeho hladiny prostřednictvím proteazomové degradace proteinu. Touto cestou je umožněna inhibice komplexu cyklin E/CDK2, který umožňuje vstup do S fáze (Mailand a kol. 2000; Flack a kol. 2001)

Obě zmíněné signální dráhy (Obr. 4) se a liší v rychlosti odpovědi a době trvání. Inhibice buněčného cyklu prostřednictvím degradace CDC25 nastává již po 30 minutách od působení genotoxického stresu. Zastavení buněčného cyklu je ale pouze přechodné a po 4-8



hodinách dochází ke zvýšení hladiny fosfatázy na původní hladinu (Flack a kol. 2001). Pro signální dráhu aktivující transkripční faktor p53 je důležitá transkripce a akumulace syntetizovaného proteinu, proto vyžaduje delší čas pro nástup v řádu několika hodin. Inhibice buněčného cyklu je v tomto případě dlouhodobá až trvalá (Kastan, Bartek 2004).

#### **3.2.2.4 Kontrolní mechanismus S fáze**

Během replikace v S fázi dochází ke spontánnímu vzniku chyb a lézí. S fáze proto vykazuje nejvyšší citlivost ke vzniku mutací a má největší význam z hlediska prevence genetické nestability. Na rozdíl od kontrolních bodů v ostatních fázích buněčného cyklu nelze zde buněčný cyklus zastavit, ale pouze zpomalit. Při vzniku DNA poškození, dojde pouze k lokálnímu zastavení replikace na konkrétním chromozómu, zatímco na ostatních chromozómech replikace probíhá (Bartek a kol. 2004).

Kontrolní bod v S-fázi je aktivován replikačním stresem, který inhibuje replikační vidličku. Tímto stresovým podnětem může být inhibice enzymů replikace, aberantní struktury DNA nebo vyčerpání deoxyribonukleotidů. (Bartek a kol. 2004). Při inhibici replikační vidličky vznikají v DNA jednovláknové zlomy, které aktivují ATR kinázu. Signál je převeden na CHK1/2 s následnou fosforylací a degradací CDC25A. Degradace fosfatázy inhibuje aktivitu komplexu cyklinu E/CDK2. Iniciační faktor CDC45 a jeho vazba na prereplikační komplex je nutná pro zahájení replikace. Tuto vazbu zprostředkovává aktivita cyklinu E/CDK2 a CDC7. Proto inhibice komplexu cyklin E/CDK2 brání aktivaci prereplikačního komplexu (Obr. 4) (Costanzo a kol. 2003).

Geneticky dědičné choroby postihující kontrolní mechanismus S fáze způsobují radio-rezistentní syntézu DNA, kdy buňka není schopná zpomalit syntézu DNA při genotoxickém záření. Tyto charakteristiky vykazují buňky derivované z pacientů postižených chorobou ataxia telangiectasia (ATM) nebo Nijmegenbreakage syndrome (NBS), fenotypově se projevující zvýšeným výskytem nádorových onemocnění (Flack a kol. 2002).

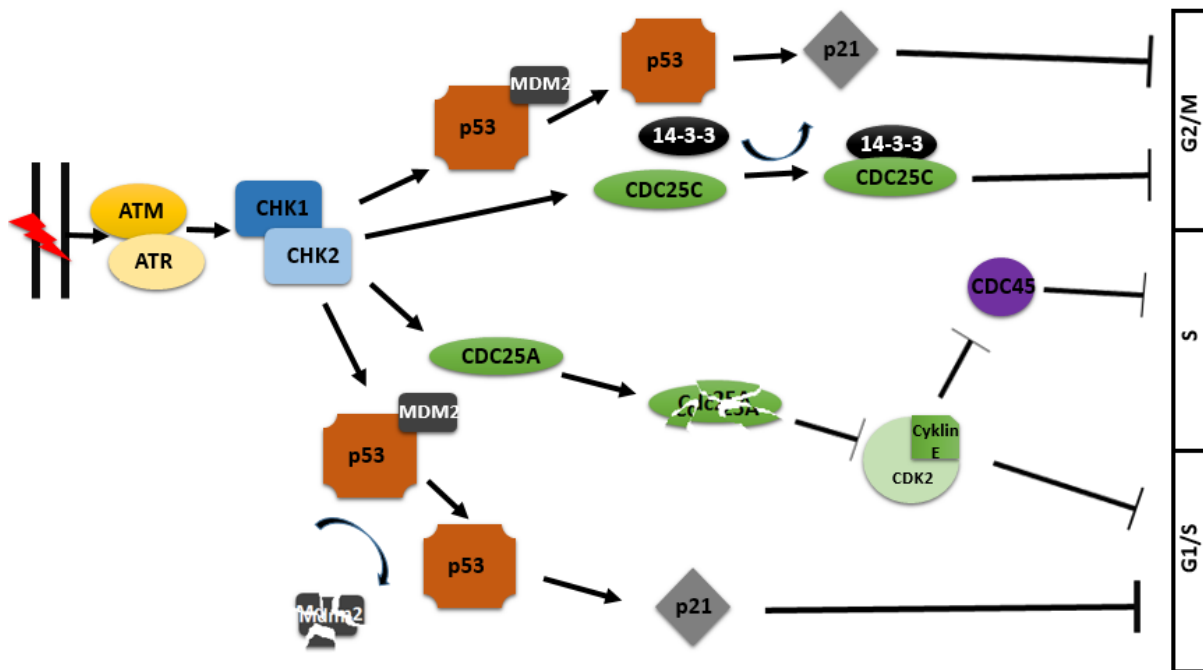
#### **3.2.2.5 Kontrolní mechanismus G2 fáze**

Kontrolní mechanismus G2 fáze je prevencí vstupu do mitotického dělení v případě, že nedošlo k úplné replikaci DNA nebo došlo k jejímu poškození. Buňky, které mají tento kontrolní bod defektní, mohou vstoupit do mitózy s poškozenou nebo neúplně replikovanou DNA, což pak vede ve většině případů ke smrti buňky, ke vzniku chromozomových aberací nebo karcinogenezi. Hlavním regulátorem vstupu buněčného cyklu do mitózy je komplex

cyklin B/CDK1, jehož inhibice představuje hlavní cíl kontrolních signálních drah (Löbrich, Jeggo 2007).

Podobně jako je v G1 fázi aktivován komplex cyklin E/CDK2 defosforylací CDC25A, je i komplex cyklin B/CDK1 aktivován defosforylací fosfatázou CDC25C. Inhibici CDC25C řadíme mezi cíle kontrolních mechanismů G2 fáze (Ferguson a kol. 2005). Aktivované „upstream“ kinázy CHK1/2 fosforylací CDC25C v pozici Ser 216 způsobují stabilizaci vazby mezi fosfatázou a 14-3-3 vazebným proteinem a tím inhibici aktivity CDC25C (Obr. 4) (Peng a kol. 1997). Podobným způsobem dochází k inhibici aktivity CDC25B, který je fosforylován v pozici Ser 309 prostřednictvím mitogenem aktivované proteinkinázy p38. K aktivaci této protein kinázy dochází působením nejen genotoxického UV záření, ale i dalších stresových podnětů na buňku (Bulavin a kol. 2001).

Další signální dráha podílející se na G2/M kontrolním bodu zahrnuje již zmíněný transkripční faktor p53. Mezi jeho transkripční cíle patří také p21, který je univerzálním inhibítozem pro aktivitu CDK jak G1/S, tak pro cyklin B/CDK1 v G2/M fázi. Dále také indukuje transkripci GADD45 (DNA Damage-inducible 45), který specificky interaguje s CDK1, což vede k disociaci komplexu s cyklinem B (Zhan a kol. 1999). Dalším transkripčně regulovaným inhibítozem CDK1 je 14-3-3 $\sigma$ . Jedná se o protein patřící do skupiny 14-3-3 proteinů, které mají několik izoform podílejících se na transdukci signálu a řízení buněčného cyklu. 14-3-3 $\sigma$  ovlivňuje subcelulární lokalizaci CDK1. Svou vazbu na CDK1 brání jeho akumulaci v jádře a tím i jeho biologické aktivitě (Laronga a kol. 2000).



**Obr. 4: Kontrolní signální dráhy buněčného cyklu.** Kontrolní mechanismy v jednotlivých fázích buněčného cyklu se liší. Společnou částí je aktivace ATR/ATM a CHK1/CHK2. V G1 fázi dochází k aktivaci p53 a expresi CDK inhibitoru p21. Druhá signální dráha je společná pro S fázi, kde je aktivována při replikačním stresu. Dochází k degradaci CDC25A a inhibici CDK2. Kontrolní mechanismy G2 fáze vedou taktéž k aktivaci p53 a inhibici CDC25C. V tomto případě nedochází k degradaci fosfatázy, ale asociaci s 14-3-3 proteinem, který inhibuje aktivitu CDC25C

### 3.3 Buněčný cyklus myších embryonálních kmenových buněk.

Embryonální kmenové buňky jsou charakteristické pluripotencí a vysokou rychlostí proliferace. Jedním z faktorů je odlišná struktura buněčného cyklu. Somatické buňky tráví převážnou část cyklu v G1 fázi. EKB se nachází povětšinu času v S fázi protože G fáze jsou zkráceny. Buňka tedy krátce po dokončení mitózy přechází k replikaci DNA a opětovnému vstupu do mitózy. Na úrovni regulačních mechanismů je rozdílná struktura buněčného cyklu dána převážně odlišnou regulací časově limitující G1/S a G2/M fáze (Stead a kol. 2002).

Nejdůležitější změnou v regulačních mechanismech oproti somatickým buňkám je vysoká aktivita CDK, která je spojena s ektopickou expresí cyklinů. Cykliny A a E jsou exprimovány ve velkém množství po celý buněčný cyklus (Stead a kol. 2002). Cyklin D/CDK4 naopak u EKB nevykazuje žádnou aktivitu. Hladina cyklinu D je velice nízká a protein je lokalizován v cytoplazmě a nedochází k transportu do jádra (Savatier a kol. 1995). Pouze aktivita cyklinu B/CDK1 osciluje stejně, jako je tomu u somatických buněk (Stead a kol. 2002).

pRB v hypofosforylované formě je u EKB téměř nedetekovatelný. Po celý buněčný cyklus se nachází v hyperfosforylovaném inaktivním stavu (Savatier a kol. 1994). Inaktivní stav pRB je udržován konstantní aktivitou cyklinu E/CDK2 a cyklinu A/CDK2. Částečná inaktivace pRB, kterou provádí cyklin D/CDK4, je v tomto případě kompenzována aktivitou cyklinu E/CDK2, který jedná nezávisle na aktivitě CDK4 (Stead a kol. 2002).

Negativní regulátory cyklinu E/CDK2 signální dráhy pRB, p21, LATS2 jsou posttranslačně regulovány prostřednictvím microRNA. Tyto nekódující RNA se vážou na mRNA daného proteinu a inhibují jeho translaci. U EKB mají velký podíl na urychlení vstupu do S fáze, zkrácení G1 fáze a urychlení proliferace (Wang a kol. 2008).

### **3.3.1 Pluripotence a kontrola buněčného cyklu myších EKB**

Schopnost sebeobnovy pluripotentních buněk a její udržování je úzce spjato s regulací buněčného cyklu a jeho odlišnou strukturou (Abdelalim 2013). Sebeobnova je závislá na vnějších signálech z prostředí jako je LIF (leukemický inhibiční faktor), signální dráha WNT a BMF2 (bone morphogenetic protein 2). Tento vnější signál pak reguluje aktivitu signálních molekul a transkripčních faktorů, které udržují schopnost sebeobnovy. Pro pluripotentní buňky je charakteristická přítomnost transkripčních faktorů OCT4, NANOG a SOX2 udržujících nediferencovaný stav kmenové buňky (Chambers, Smith 2004).

LIF se řadí mezi cytokininy. Váže se na receptorový komplex LIF receptor  $\alpha$  (LIFR  $\alpha$ ) a gp130, se kterými vytváří heterotrimer (Zhang a kol. 1997). Dimerizace receptoru (LIFR a gp130) vede k aktivaci JAK asociované tyrosin kinázy s následnou fosforylací tyrosinových residuí na gp130, které interagují s SHP-2 doménami dalších proteinů. V případě sebeobnovy EKB je tímto proteinem transkripční faktor STAT. Aktivací této skupiny transkripčních faktorů dochází k dimerizaci a translokaci do jádra, kde aktivují cílové geny (Niwa a kol. 1998). Lidské EKB mají jiní mechanismus udržení pluripotence, protože LIF aktivuje signální dráhu STAT, nicméně přesto dochází k diferenciaci. Lidské EKB se udržují v nediferencovaném stavu kultivací na vrstvě embryonálních fibroblastů, které vylučují látky pro udržení pluripotence (Dahéron a kol. 2004).

Funkci BMF2 zprostředkovává heterotetramerní serin/threonin kinázový receptor, který aktivuje transkripční faktor SAMAD1, -5 nebo -8. Transkripční faktory pak tvoří komplex s mediátorem SMAD4 a jsou translokovány do jádra, kde řídí transkripční aktivaci cílových genů (Nakashima a kol. 2001). Inhibice diferenciaci je prostřednictvím LIF jen parciální a buňky podléhají neuronální diferenciaci. Na úplné supresi diferenciaci se podílí

LIF a BMF2 zároveň. Aktivita BMF2 zajišťuje aktivaci *Id* genů (Inhibitor of differentiation) (Ying a kol. 2003).

Mezi vnější signály podílející se na sebeobnově je signální dráha WNT. Mimoto hraje signální dráha další úlohy, příkladem je určení anteroposteriorní osy těla během vývoje embrya. WNT se váže na receptorový komplex a inaktivuje tak degradaci  $\beta$ -catenin, který se nachází v degradačním komplexu s APC, Axinem a GSK3 (glykogen syntáza kináza 3). Aktivní  $\beta$ -catenin eliminuje represivní funkci TCF3 (T-cell factor 3) proteinu, a reguluje tak aktivaci cílových genů (Sokol 2011). Aktivita  $\beta$ -catenin není pro udržení pluripotence esenciální. Funkce této dráhy mohou být zastoupeny aktivací LIF (Wray a kol. 2011).

Transkripční faktory, které vytváří základní složku regulace pluripotence, jsou SOX2, NANOG a OCT4. Jejich cílem je aktivace „downstream“ transkripčních faktorů jako KLF4, MYC, E2F1, ZFX a další. Tyto tři transkripční faktory jsou aktivovány vnějšími signálními drahami prostřednictvím SMAD a STAT transkripčních faktorů (Chen a kol. 2008).

Pluripotentní EKB, derivované z vnitřní masy blastocysty, mohou být v kultivačních podmínkách, *in vitro*, udržovány v nediferencovaném stavu buďto kultivací na vrstvě inaktivovaných myších embryonálních fibroblastů, nebo v přítomnosti LIF. Udržení pluripotence v médiu s LIF je možné pouze u myších EKB, nikoliv u lidských. Pokud nejsou tyto kultivační podmínky dodrženy, dochází ke spontánní diferenciaci buněk a také k událostem podobným raným stádiím embryogeneze. V suspenzní kultuře za takových podmínek vznikají sférické agregáty EKB nazývané embryoidní tělíska. Později, spolu se zvyšujícím se počtem buněk, jsou formovány zárodečné vrstvy ektoderm, mezoderm a endoderm, ze kterých se vyvíjí celá řada buněčných typů jako například kardiomyocyty, hematopoetické buňky, neurony nebo pankreatické buňky (Dang a kol. 2001, Vaghefi a kol. 2009).

### **3.3.2 Kontrolní mechanismy buněčného cyklu myších EKB**

Pro somatické buňky je typická vysoká frekvence náhodných mutací. Ztrátou heterozygotnosti pak dochází ke vzniku nefunkčního genu nebo jeho produktu. Nejčastější příčinou ztráty heterozygotnosti je mitotická rekombinace. V průběhu života organismu se tyto mutace v těle hromadí a většinou pak vedou ke vzniku různých onemocnění (rakovina, neurodegenerativní choroby a další) nebo až ke smrti. Embryonální kmenové buňky dávají vznik celému organismu včetně pohlavních buněk. Proto by takové množství mutací, jaké se vyskytuje u somatických buněk, bylo neúnosné. Mutace by se přenášely jak do dalších

buněčných linií organismu, tak do dalších generací. Z tohoto důvodu mají embryonální kmenové buňky vyvinuty odlišné mechanismy kontroly buněčného cyklu. Frekvence mutací dosahuje až stonásobně nižších hodnot než u diferencovaných buněk (Hong a kol. 2007).

Jedním z těchto mechanismů, které souvisí s kontrolními mechanismy buněčného cyklu, je selekce embryonálních kmenových buněk postižených genotoxickým stresem. S tímto souvisí disfunkce G1/S kontrolního bodu u těchto buněk. G1/S kontrolní bod slouží u somatických buněk při genotoxickém stresu k zastavení buněčného cyklu, a tím získání času k opravě DNA. Tímto mechanismem jsou pak buňky chráněny před případnou apoptózou. U kmenových buněk je tak zajištěna selekce poškozených buněk z populace (Hong, Stambrook 2004).

Dvě signální dráhy, které se podílejí na zastavení buněčného cyklu v pozdní G1 nejsou plně funkční jako u somatických buněk. Signální dráha degradující CDC25A je přerušena díky odlišné lokalizaci CHK2, který je lokalizován na centrozomech a není tak schopen fosforylovat své substráty - tedy fosfatázu CDC25A (Hong, Stambrook 2004). K degradaci CDC25A přesto dochází a to prostřednictvím GSK3- $\beta$ . Ke snížení aktivity CDK2 ale nedochází (Koledova a kol. 2010). Protein p53 je aktivován fosforylací ATM, avšak omezená translokace p53 do jádra brání indukci exprese inhibitoru p21 (Hong, Stambrook 2004). Jadernému transportu p53 do jádra brání acetylace prostřednictvím acetylázy SIRT1, která se u embryonálních kmenových buněk exprimuje ve velkém množství. p53 není schopen vykonávat transkripční aktivitu, ale je schopen aktivovat apoptózu mitochondriální cestou (Han a kol. 2008). S p53 souvisí také další mechanismus obrany vůči genotoxickému stresu a vzniku mutací. Při poškození DNA dochází k fosforylaci p53 na pozici Ser 315 a tato modifikovaná forma se váže na promotor genu *Nanog* a suprimuje jeho expresi. *Nanog* je gen důležitý pro udržení pluripotence kmenové buňky a jeho supresí dochází k diferenciaci (Lin a kol. 2005).

### **3.4 Vliv chelatace iontů železa na buněčný cyklus**

Železnaté i železité ionty jsou kofaktorem některých enzymů a účastní se tak regulace mnoha centrálních buněčných procesů. Hladina těchto iontů musí být v buňkách přísně regulována a udržována v úzkém rozmezí. Jak nízká, tak i vysoká hladina má nepříznivý vliv na živý organismus. Přebytek iontů železa vede k produkci volných radikálů, které poškozují proteiny, lipidy a DNA. Přebytek je také spojen s neurodegenerativními chorobami jako NBIA (neurodegeneration with brain iron accumulation), Friedreichova ataxia, Parkinsonova

a Alzheimerova choroba. Lidé s hemochromatosou (přebytek uloženého železa) mají sklon ke vzniku cirhózy, kardiomyopatie a diabetes mellitus. Naopak deficiencie železa brání proliferaci buněk, a je příčinnou anemií (Anderson a kol. 2012).

### 3.4.1 Metabolismus železa

Regulace hladiny iontů železa probíhá na několika úrovních. Hladina iontů železa je řízena množstvím iontů přijmutých z potravy a množstvím iontů uvolněných z intracelulárních zásob uložených ve formě feritinu. Ionty železa přijmuté v potravě jsou vstřebávány v tenkém střevě. Prvním krokem k této absorpci je redukce iontů  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  prostřednictvím DCYTB (duodenal cytochrome *b*). V této redukované formě je  $\text{Fe}^{2+}$  transportováno DMT1 (divalent metal transporter 1) přes apikální membránu enterocyty do buňky. Druhým méně známým transportérem je pak HO-1 (haem oxygenase 1). Železo, které není využito samotným enterocytem, je transportováno dál do krevního řečiště transportérem feroportinem. Eflux  $\text{Fe}^{2+}$  je spojen s opětovnou oxidací na  $\text{Fe}^{3+}$ . Transport oxidované formy železa v krevním řečišti do tkání je zajištěn transferinem (Wang, Pantopoulos 2011)

Transferin s navázaným  $\text{Fe}^{3+}$  se váže na transferinový receptor v cílových tkáních. Celý komplex je pak endocytózou importován do buňky (Ohgami a kol. 2005). V plazmě se nachází také volné anorganické železo v podobě  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  v podstatně menší koncentraci, než vázané na transferin. I pro tuto formu železa je buňka schopná transportovat přes membránu do cytoplasmy. Tento mechanismus získávání železa využívají buňky tkáňových kultur. Pro železnatý iont je využito DMT1 stejně jako u enterocyty. Železitý iont je transportován prostřednictvím  $\beta$ <sub>a</sub>-integrinu a mobiliferinu, který mimo železo transportuje také zinek a měď (Conrad a kol. 2000).

Přebytek iontů železa, které nejsou buňkou využity, může být zdrojem vzniku volných radikálů, které poškozují buněčné struktury. Přebytečné ionty železa jsou transportovány ven z buňky feroportinem, nebo je uloženo v cytoplasmě navázané na protein feritin v rozpustné a kdykoliv pro buňku dostupné formě. Feritin se skládá z 24 podjednotek. U vyšších eukaryot jsou dva geny pro feritin, jejichž produkty se označují jako těžký a lehký. Kombinací těchto dvou podjednotek vznikají různé izoformy feritinu, které jsou tkáňově specifické. Vazebná kapacita jedné molekuly feritinu je až 4000 atomů železa. Uvolňování iontů železa probíhá degradací feritinu (Arosio a kol. 2009).

Výše zmíněné proteiny metabolismu železa jsou na translační úrovni regulovány IRP1 a IRP2 proteiny (iron regulatory protein). Jsou to cytosolické proteiny, které se váží na IRE

(*iron-responsive element*) 5' nebo 3' konec regionu cílové mRNA, který není překládán. Těmito proteiny jsou transferin receptor (TfR 1), DMT1, podjednotky feritinu a ferroportin. Mimoto regulují translaci mnoha dalších proteinů jako hypoxia-inducible transkripční faktor 2 $\alpha$ , amyloidní beta prekurzor protein, který souvisí s Alzheimerovou chorobou a mnoho dalších. To znamená, že IRP mají mimo udržení homeostáze železa i další funkce. Vazbou na mRNA dochází k její stabilizaci nebo naopak potlačení exprese daného genu. V případě, že je železa nedostatek, se IRP váží na 5' IRE feritinu a ferroportinu, čímž potlačují translaci mRNA a vazbou na 3' IRE TfR 1 stabilizuje mRNA. Tím buňka podporuje import železa a naopak potlačuje export. Inhibice exprese feritinu zajišťuje přítomnost volného železa, které může buňka ihned využít. Pokud je železa dostatečné množství, dochází k opačnému jevu. IRP afinitu k IRE nevykazují. Dochází ke zvýšení syntézy ferroportinu a transferinu a k degradaci mRNA TfR 1. (Anderson a kol. 2012).

### 3.4.2 Vliv chelatace železa na buněčný cyklus

Železo je důležité pro funkci mnoha buněčných procesů. Účastní se respirace, biosyntézy makromolekul, syntézy DNA, růstu a proliferace. Deficit železa má významný vliv na regulaci buněčného cyklu a výsledkem je většinou zastavení cyklu v G1 fázi. Rychle proliferující nádorové a kmenové buňky, vyžadují větší příjem železa než normální somatické buňky. Z tohoto důvodu jsou více citlivé na jeho deficit. Antiproliferační účinky chelatačních činidel umožňují jejich potencionální využití v terapii nádorových onemocnění (Heath a kol. 2013). Nedostatek železa aktivuje expresi IRP2 což vede ke zvýšení exprese transferinového receptoru a zvýšení importu železa (Wu a kol. 1999).

Níže jsou popsány molekuly účastníci se regulace buněčného cyklu, které jsou ovlivněny chelatací železa.

**Ribonukleotid reduktáza (RNR)** je enzym katalyzující reakci přeměny ribonukleotidu na deoxyribonukleotid. Jedná se o limitující krok v dostupnosti deoxyribonukleotidů v procesu syntézy DNA. Aktivita RNR je regulována na úrovni transkripční, posttranslační a také její lokalizací (Sanvisens a kol. 2011). RNR se skládá ze dvou podjednotek, velké R1 a malé R2. R1 obsahuje katalytické místo, na R2 podjednotku jsou vázány dva železití ionty sloužící ke stabilizaci tyrosilového radikálu, který je nezbytný pro katalytickou funkci (Perlstein a kol. 2005). Chelátory železa mohou chelatovat ionty železa přímo z enzymu a zničit tak tyrosilový radikál a inhibovat funkci enzymu, nebo vyčerpávat volné železo a bránit tak syntéze nové R2 podjednotky enzymu. Chelatace železa



vede v takovém případě k inhibici aktivity enzymu, zastavení syntézy DNA a celého buněčného cyklu (Nyholm a kol. 1993).

**Cykliny.** Z řad cyklinů má chelatace železa největší vliv na cyklin D. Jeho hladina je ovlivněna proteinovou proteazomální degradací. Hladina mRNA zůstává nezměněná (Nurtjahaja-Tjendraputra a kol 2007). Snížená exprese cyklinu D vede k inhibici buněčného cyklu v G1/S díky aktivnímu Rb v hypofosforlylovaném stavu (Gao, Richardson 2001).

**p53** slouží jako metabolický senzor. Jestliže je přerušena produkce nukleotidů vlivem chelatace železa a inhibice RNR, dochází v důsledku nukleotidové deficience k chybám při replikaci, tím k aktivaci kontrolních signálních drah (viz kapitola 3.2.2.4 Kontrolní mechanismus S fáze) a tím ke zvýšení hladiny a indukci p53 s výslednou inhibicí buněčného cyklu (Liang, Richardson 2003). p53 se také podílí na homeostázi železa. Aktivní p53 inaktivuje IRP, a tím zvyšuje hladinu feritinu a snižuje expresi transferin receptor. Snížením hladiny dostupného železa pak přispívá k zastavení buněčného cyklu (Zhang a kol. 2008).

**p21** je inhibitorem cyklin/CDK komplexu. Mimo tuto funkci má také funkci antiapoptickou a podporuje přežití v případě poškození DNA. U některých typů rakovin je hladina p21 zvýšena, jeho antiapoptická aktivita může zvyšovat odolnost nádorových buněk vůči chemoterapii (Weiss 2003). Chelátory železa způsobují zvýšení hladiny mRNA p21, nicméně hladina p21 zůstává stejná nebo se dokonce snižuje. Dochází k tomu dvěma posttranskripčními mechanismy regulace. V prvním případě je bráněno translokaci mRNA z jádra k translačním mechanismům v cytoplazmě. V druhém dochází k proteazomové degradaci proteinu ubikvitin nezávislou cestou. Tímto mechanismem chelatace železa podporuje antiproliferační aktivitu a apoptózu (Fu, Richardson 2007).

**p27** je dalším inhibitorem cyklinu D/CDK4 a cyklinu E/CDK2. Ve vysokých hladinách se nachází především u buněk v klidové fázi a stimulace růstovými faktory vyvolává pokles jeho hladiny. Chelatace železa vyvolává indukci exprese p27 skrze TGF- $\beta$ 1. Tyto události pak vedou k zastavení v G1/S fázi (Yoon a kol. 2002).

**HIF-1** je transkripční faktor, který je aktivován v hypoxických podmínkách. Je to heterodimer složený z HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  je kontinuálně exprimován a HIF-1 $\alpha$  je degradován v přítomnosti kyslíku. Degradaci zprostředkovává proteinový komplex s funkcí E3 ubikvitin ligázy. Komplex osahuje von Hippel-Lindau tumor supresor (VHL), který se váže přímo na HIF-1 $\alpha$ . Tuto vazbu umožňuje hydroxylace HIF-1 $\alpha$  enzymem prolyl-hydroxylázou, která obsahuje Fe<sup>2+</sup> kofaktor a slouží jako senzor dostupnosti kyslíku. V hypoxických podmínkách dochází ke stabilizaci HIF-1 $\alpha$ , dimerizaci s HIF-1 $\beta$  v jádře a aktivaci cílových genů (Callapian a kol. 2005). HIF-1 reguluje aktivaci exprese proteinů, které

umožňují adaptaci na hypoxické podmínky, a také svou aktivitou ovlivňuje proliferaci a apoptózu (Talks a kol. 2000). VHL/HIF signální dráha se podílí také na homeostázi železa. Responzivní element HIF-1 se nachází také u genu pro transferin receptor a aktivovaný HIF-1 indukuje jeho expresi. Deprivace železa pak vede k inhibici funkce enzymu VHL a stabilizaci HIF-1 $\alpha$  (Bianchi a kol. 1999). Vysoká aktivita HIF-1 je typická pro některé typy agresivních nádorů. HIF-1 aktivuje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, který podporuje angiogenezi. Ta zvyšuje invazivitu a růst nádoru (Le, Richardson 2004a). Dále aktivní HIF-1 vede ke stabilizaci a akumulaci p53 v jádře (An a kol. 1998).

**GADD45** (Growth Arrest and DNA Damage) je rodina proteinů zahrnujících GADD34, GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$ , GADD45 $\gamma$  a GADD153. Expresse těchto genů se zvyšuje při vystavení buňky stresovému stimulu. Tím může být např. nedostatek živin, expozice genotoxickým látkám nebo hypoxie. Proto je velmi pravděpodobné, že se na aktivaci podílí HIF-1. GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$  a GADD45 $\gamma$  se podílí na G2/M kontrolním bodu. GADD45 $\alpha$  je aktivován závisle na p53 a inhibuje CDK1, ale interaguje s dalšími proteiny buněčného cyklu jako p21 nebo p38 (MAPK). GADD34 a GADD153 se pravděpodobně podílí na aktivaci apoptózy. Deprivace železa výrazně zvyšuje expresi členů této skupiny proteinů, čímž je podpořen antiproliferační účinek a apoptóza chelatačních činidel železa (Saletta a kol. 2011).

**p38 a ERK** se řadí mezi mitogenem aktivované kinázy řídící buněčné dělení, diferenciaci a buněčnou smrt. Jednotlivé kinázy této skupiny jsou aktivovány jinými extracelulárními stimuly a odlišná je i konečná odpověď.

ERK jsou součástí signálních drah, které jsou aktivovány onkogenem RAS kinázou. Mezi vnější stimuly této signální dráhy patří růstové faktory, cytokininy, virové infekce, transformační agens a karcinogeny. Z funkcí, co se týče regulace buněčného cyklu, řídí vstup do buněčného cyklu (expresse cyklinu D), reguluje G1/S a G2/M. Obecně podporuje proliferaci buněk. Ovšem prodloužená aktivace ERK může naopak vést k apoptóze (Chambard a kol. 2007).

p38 negativně reguluje buněčný cyklus. Brání proliferaci a tumorogenezi. Signální dráha p38 je aktivována například mikroorganismy, zánětlivými cytokininy a dalšími stresovými podněty. Signální dráha reguluje onkogenem aktivovanou senescenci (prodloužená aktivace ERK), replikační senescenci, kontaktní inhibici, odpověď na poškození DNA nebo apoptózu (Han, Sun 2007).

Chelatace železa vede k fosforylaci p38 a ERK, které dále aktivují apoptické signální dráhy vedoucí ke smrti buňky (Lee a kol. 2006).

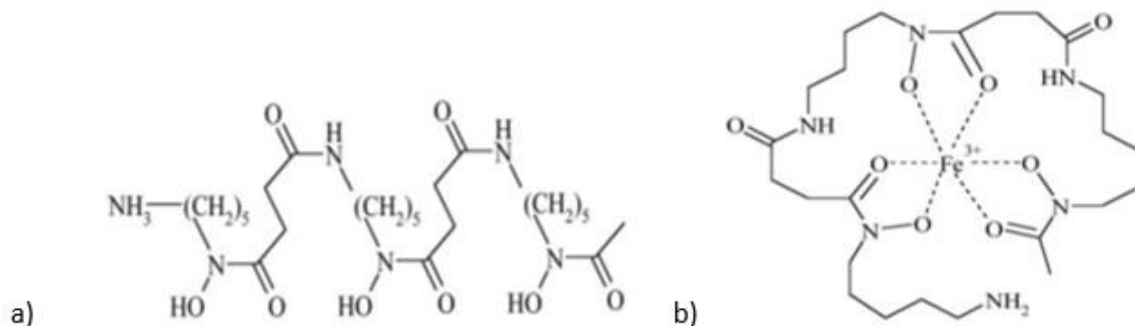
## 3.5 Činidla chelatující ionty železa

Chelatační činidla se v dnešní době používají při léčbě nadbytku železa nebo také v terapii různých druhů nádorových onemocnění. Proti proliferaci působí chelátory dvěma mechanismy. Prvním je chelatace železa, která interferuje s některými buněčnými procesy jako je respirace, metabolismus nebo replikace DNA (Heath a kol. 2013). Druhým mechanismem je produkce volných radikálů. Tento mechanismus se však vyskytuje jen u chelátorů, které jsou schopné vázat ionty  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Afinita pro vazbu jedné z forem železa (případně obou) je dána počtem koordinačních vazeb. Schopností vázat obě formy železa vzniká redoxní cyklus. Například železo v komplexu může být enzymaticky redukováno. Tato forma železa reaguje s peroxidem vodíku za vzniku oxidované formy železa a hydroxylového radikálu, který poškozuje buněčné komponenty včetně DNA. Proces je nazýván Fentonova reakce (Hider 2002). Významnou vlastností ovlivňující antiproliferační vlastnosti chelátorů je lipofilita. Lipofilní sloučeniny snadno prochází plazmatickou membránou a jsou schopné chelatovat intracelulární železo. Některé chelátory jsou pak schopné přímo interagovat s enzymy obsahujícími kofaktor železa (Hodges a kol 2004).

Při vývoji nových chelatačních činidel jsou nejdůležitější vlastnosti účinnost chelatace, toxicita a způsob podání. Ideální sloučenina by měla mít velkou účinnost, nízkou toxicitu s minimem vedlejších účinků a možnost orálního podání (Kalinowski, Richardson 2005).

### 3.5.1 Desferioxamin mesylát

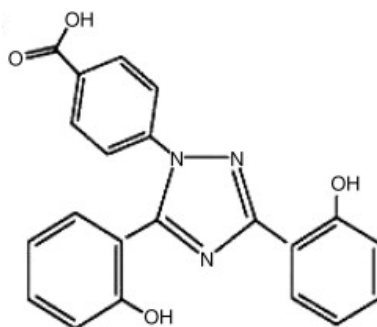
Desferioxamin mesylát (DFO) byl izolován z bakterie *Streptomyces pilosus*. Afinitu má pro železo ve formě  $\text{Fe}^{3+}$  nikoliv  $\text{Fe}^{2+}$ , proto není schopné tvořit ROS. DFO je velká hydrofilní molekula, která neumožňuje pasivní difuzi skrze plazmatickou membránu. Do buňky se dostává endocytózou. Jelikož je jeho absorpce v gastrointestinálním traktu omezená, je nutné jej podávat intravenózně, a to v mnohahodinových infuzích, jelikož jeho poločas rozpadu v plazmě je pouhých 12 minut (Aouad a kol. 2002, Doulias a kol. 2003). Cytotoxický efekt je zprostředkováván chelatací extracelulárního, endozomálního a lyzozomálního železa, který vede ke spotřebování vnitrobuněčných zásob železa z feritinu (Obr. 5) (Doulias a kol. 2003).



**Obr. 5: Chemická struktura chelatačního činidla desferioxamin mesylátu.** A) struktura chelatačního činidla. B) struktura desferioxaminu v komplexu s Fe<sup>3+</sup> (Kalinowski, Richardson 2005).

### 3.5.2 Deferasirox

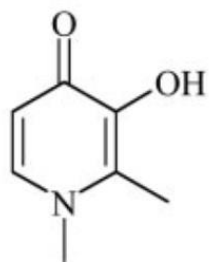
Deferasirox (DFX) je synteticky vyvinuté chelatační činidlo. Účastní se redoxního cyklu a je schopné vytvářet ROS (Pullarkat a kol 2012). Je lipofilní, což znamená, že prochází přes plazmatickou membránu prostou difuzí. Jeho snadné vstřebávání v gastrointestinální soustavě umožňuje orální podání. Plazmatický poločas je 8-16 hodin (Obr. 6) (Choudhry, Naithani 2007).



**Obr. 6: Chemická struktura chelatačního činidla deferasiroxu.** (Hajjizadeh a kol. 2008)

### 3.5.3 Deferipron

Deferipron (DFP) je orálně podávané chelatační činidlo. Za fyziologických podmínek váže komplex Fe<sup>3+</sup> v poměru 3:1. Při nízké koncentraci DFP (< 1 μM) může vznikat i poměr 2:1. V takovém případě není komplex plně koordinován a může probíhat redoxní cyklus a vznik ROS (Devanur a kol. 2007). DFP je malá lipofilní molekula, která snadno prochází plazmatickou membránou (Obr. 7) (Galanello 2007).



**Obr. 7: Chemická struktura chelatačního činidla deferipronu (Kalinowski, Richardson 2005)**

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

#### Přístrojové vybavení a software

- Termoblok Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- Vortex Bio V1 (Biosan, USA)
- Centrifuga Hettich Mikro 200R (Hettich, Německo)
- Centrifuga Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Standard Power Pack P25 (Biometra, Německo)
- Spektrofotometr Infinite 200 Nanoquant (Tecan, Švýcarsko)
- Spektrofotometr GENios Plus (Tecan, Švýcarsko)
- Laboratorní třepačka Stone Shaker (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Invertovaný mikroskop LX71 (Olympus, Japonsko)
- Centrifuga ALC PK110 (ALC, Velká Británie)
- Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA)
- MSC-Advantage™ Class II Biological Safety Cabinets (Thermo Scientific, USA)
- Thermo Forma Direct Heat CO2 Incubator Model 310 (Thermo Scientific, USA)
- MCO-18AC CO2 Incubator (Sanyo, Velká Británie)
- GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA)
- Průtokový cytometr FC500 (Beckman Coulter, USA)
- Software CXP analysis

#### Biologický materiál

- V6.5 buněčná linie myších embryonálních kmenových buněk
- HM1 buněčná linie myších embryonálních kmenových buněk
- STO buněčná linie myších embryonálních fibroblastů

#### Kultivační roztoky

- Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX™ (Life Technologies, USA)
- Medium kondicované myšími embryonálními fibroblasty s obsahem LIF
- FBS (PAA, Rakousko)
- L-Glutamin (Life Technologies, USA)

- Pyruvát sodný (Life Technologies, USA)
- $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma Aldrich, USA)
- Pen Strep (Life Technologies, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Life Technologies, USA)

#### Protilátky

- CDC25A Antibody (F-6) (Santa Cruz, USA)
- Phospho-Rb (Ser807/811) Antibody (Cell Signaling, USA)
- Rb Antibody (M-15) # L1906 (Santa Cruz, USA)
- Phospho-p53 (Ser15) Antibody (Cell Signaling, USA)
- p53 (1C12) Mouse mAb (Cell Signaling, USA)
- Monoclonal Anti-Chk2 antibody (Sigma Aldrich, USA)
- p-Chk1 (Ser 345) (Santa Cruz, USA)
- Chk1 Antibody (Cell Signaling, USA)
- Anti-  $\alpha$ -Actin antibody (Sigma Aldrich, USA)
- Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako, Dásnko)
- Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako, Dásnko)
- Rabbit anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz, USA)
- Anti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein (Roche, Švýcarsko)

#### Enzymy

- Trypsin (Life Technologies, USA)
- RNase A (Qiagen, EU)

#### Chelatační činidla

- Deferasorox (Farmak ČR)
- Deferipron (ApoPharma, Kanada)

#### Chemikálie

- Na<sub>2</sub>EDTA (Serva, Německo)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, USA)
- NaCl (LachNer, ČR)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Duchefa, Nizozemí)
- KCl (LachNer, ČR)
- HCl (Penta, ČR)
- Tris (Promega, USA)

- SDS (Serva, Německo)
- APS (Serva, Německo)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, USA)
- HEPES (Serva, Německo)
- Bradford reagent (Amresco, USA)
- ACRYL/BIS™ 37.5:1, 40% SOLUTION (Amresco, USA)
- Glycerol (LachNer, ČR)
- EGTA (Amresco, USA)
- Glycin (Duchefa, Nizozemí)
- DTT (Sigma Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Sigma Aldrich, USA)
- Ponceau (Sigma Aldrich, USA)
- Trichlorotová kyselina (Penta, ČR)
- 5-sulfosalicylová kyselina (Sigma Aldrich, USA)
- Propidium jodid (Sigma Aldrich, USA)
- Bromdeoxyuridin (Sigma Aldrich, USA)
- Dihydrát citrátu sodného (Sigma Aldrich, USA)
- Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)
- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)
- Developer/Replenisher (AGFA, Belgie)
- Manual Fixing Bath (AGFA, Belgie)
- Etanol (Fagron, ČR)
- Metanol (Fagron, ČR)
- TEMED (Sigma Aldrich, USA)
- MTT (Life Technologies, USA)
- Leupeptin hemisulfát (Sigma Aldrich, USA)
- Aprotinin (Sigma Aldrich, USA)
- NaF (Sigma Aldrich, USA)
- $\beta$ -glycerolfosfát (Sigma Aldrich, USA)
- PMSF (Sigma Aldrich, USA)
- DMSO (Sigma Aldrich, USA)
- Triton-X-100 (



- Želatina (Sigma Aldrich, USA)
- Sušené mléko (Olma, ČR)

#### Laboratorní roztoky a pufry

- 10x PBS – 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 82 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (úprava pH na 7,4)
- 1,5 M TRIS (pH 8,8) – 0,108 g/ml TRIS (úprava pH)
- 1 M TRIS (pH 6,8) – 0,128 g/ml TRIS (úprava pH)
- IP buffer – 50 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM HCl; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% glycerol; 0,1% tween
- 10x SDS running buffer – 250 mM TRIS; 1,9 M glycin; 1% (w/v) SDS
- Semi-dry transfer buffer – 50 mM TRIS; 40 mM glycin; 0,037% (w/v); 20% metanol
- 2x Laemmli dye – 1 mM TRIS; 4% SDS; 20% glycerol; 200 mM DTT; 0,2% bromfenolová modř
- 10x Ponceau – 2% (w/v) ponceau; 30% trichloroctová kys.; 30% sulfosalicylová kys.
- 0,1% roztok želatiny
- Pro přípravu roztoků a pufrů byla použita destilovaná voda

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kultivace buněk

#### 4.2.1.1 Myší embryonální kmenové buňky

Linie MEK V6.5 a HM1 byly kultivovány na plastových kultivačních miskách potažených 0,5% želatinou v médiu DMEM GlutaMAX™ (Gibco). Do média byly přidány další složky o koncentraci uvedené v závorce: FBS (15%), penicilin (100 unit/ml), streptomycin (100 µg/µl), pyruvát sodný (1 mM), neesenciální aminokyseliny (0.1 mM), L-glutamin (4 mM), LIF, β-merkaptoetanol (0.1 µM). Kultivace v inkubátoru probíhala při 37°C a 10% CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány každý druhý den, každý den bylo vyměňováno médium za čerstvé.

##### 4.2.1.1.1 Pasážování

- Médium bylo odsáto a miska 2x opláchnuta PBS (odstranění mrtvých buněk).

- Buňky byly z misky uvolněny nanesením rovnoměrné vrstvy trypsinu, který se nechal působit jednu minutu při 37°C.
- Trypsin byl neutralizován přidáním 5 ml média, buňky byly resuspendovány a centrifugovány při 1 200 rpm.
- Médium s trypsinem bylo odstraněno a buňky byly resuspendovány v čerstvém mediu. Potřebné množství buněk bylo přeneseno na novou kultivační misku.

#### 4.2.1.1.2 Zamrazování buněk

- Stejný postup jako při pasážování, až po centrifugaci a odsátí média s trypsinem.
- Buňky byly resuspendovány v 1 ml kompletního média s 10 % DMSO a ihned zamraženy při -80°C (zmrazovací médium je pro buňky toxické, proto musí být zamraženy ihned).

#### 4.2.1.2 Myší embryonální fibroblasty

Linie myších embryonálních fibroblastů STO byla kultivována na plastových kultivačních miskách v DMEM GlutaMAX™. Do média byly přidány další složky o celkové koncentraci v médiu uvedené v závorce: FBS (10%), penicilin (100 unit/ml), streptomycin (100 µg/µl). Kultivace v inkubátoru probíhala při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Fibroblasty byly pasážovány při dosažení 80% konfluence. Médium bylo vyměňováno na základě změny barvy, která indikuje vyčerpání živin a hromadění metabolitů.

##### 4.2.1.2.1 Pasážování

- Viz pasážování myších embryonálních kmenových buněk

##### 4.2.1.2.2 Zamrazování

- Viz zamrazování myších embryonálních kmenových buněk

#### 4.2.2 Příprava chelatačních činidel

##### Deferasirox

- Deferasirox je lipofilní činidlo nerozpustné ve vodě. Byl připraven 100 mM roztok činidla v DMSO, který byl uchováván při pokojové teplotě. Buňky byly ošetřeny přidáním roztoku do kultivačního média v takovém množství, aby bylo dosaženo požadované koncentrace.

## Deferipron

- Deferipron je hydrofilní látka. Byl připraven 100 mM roztok činidla v destilované vodě, který byl uchováván při -20°C. Buňky byly ošetřeny přidáním tohoto roztoku do kultivačního média v takovém množství, aby bylo dosaženo požadované koncentrace.

### 4.2.3 MTT test

Test cytotoxicity deferaxiroxu a deferipronu byl proveden MTT testem. Výsledkem byla hodnota  $IC_{50}$ , na jejímž základě byla určena koncentrace chelatačního činidla pro další experimenty. Pro MTT test byla použita koncentrační řada: 5 000; 1 000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 1; 0,5; 0,1  $\mu$ M.

- Na jamku 96 jamkové destičky byly vysety buňky v počtu 20 000 buněk pro linie EKB a 5 000 buněk pro linii STO.
- Ze zásobního roztoku byla připravena koncentrační řada testovaných činidel řaděná v kultivačním mediu 10x koncentrovanější, než výsledná koncentrace v kultuře.
- Do jamky bylo přidáno naředěné chelatační činidlo v takovém objemu, aby došlo k vyředění na požadovanou koncentraci. Jednotlivé koncentrace byly měřeny v triplikátech.
- Kultivace buněk probíhala při standartních podmínkách po dobu 24 hodin pro EKB a 48 hodin pro STO.
- Po skončení kultivační doby bylo přidáno MTT s výslednou koncentrací v mediu 0,5 mg/ml a opět kultivováno při standartních podmínkách cca 2 hodiny podle zabarvení buněk.
- Kultivační médium bylo odstraněno a vzniklé krystaly rozpuštěny roztokem isopropanolu s HCl.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 570 nm a výsledky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5

### 4.2.4 Detekce proteinů

Aktivace kontrolních signálních drah buněčného cyklu myších EKB ošetřených chelatačními činidly byla analyzovaná metodou western blot. Nejdříve byly izolovány proteiny z buněk, následně byla změřena jejich koncentrace metodou Bradfordové a dále byla provedena elektroforetická separace a detekce pomocí metody western blot.

#### **4.2.4.1. Buněčné lyzáty**

- Z kultivačních misek bylo odstraněno médium. Mrtvé buňky byly odstraněny opláchnutím misek v PBS. Zbytky PBS byly důkladně odstraněny vakuovou odsávačkou.
- Na buňky byla nanášena vrstva IP pufru s obsahem inhibitorů kináz a fosfatáz s koncentrací uvedenou v závorce:  $\beta$ -glycerolfosfát (10  $\mu$ M), NaF (1mM),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (0,1 mM), PMSF (0,1 mM), leupeptin (0,01 mg/ml), aprotinin (0,002 mg/ml), DTT (1 mM).
- Pomocí stěrky byly buňky přeneseny do plastové mikrozkušavky a tři čtvrtě hodiny lyzovány na ledu za občasných vortexování.
- Lyzáty byly centrifugovány 15 minut při 14 000 rpm v chlazené centrifuze na 4°C.
- Proteinové lyzáty (supernatant) byly přemístěny do nových mikrozkušavek a uchovány při -80°C.
- Vzorky bylo nutné po celou dobu udržovat na ledu.

#### **4.2.4.2 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové**

- Z proteinového standardu byla vytvořena kalibrační řada roztoků o koncentraci 0; 2,5; 5; 7,5; 10  $\mu$ g/ $\mu$ l. Standard byl přidáván do 0,5 ml činidla Bradfordové.
- 1  $\mu$ l proteinového lyzátu byl přidán do 0,5 ml činidla Bradfordové.
- Kalibrační řada a vzorky byly pipetovány do 96 jamkové destičky po 150  $\mu$ l. Každý vzorek včetně kalibrační řady byl měřen v triplicátech.
- Vzorky byly změřeny na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.
- Výsledky byly vyhodnoceny v Microsoft Excel.

#### **4.2.4.3 SDS-PAGE**

- Pro elektroforézu bylo použito 50  $\mu$ g proteinů na vzorek. Objem lyzátu byl spočítán na základě zjištěné koncentrace proteinů.
- K proteinovému lyzátu byl přidán Laemmli dye ve výsledné koncentraci 1x.
- Vzorky byly denaturovány v termobloku 5 minut při 95°C a prudce schlazeny na ledu.
- Celý objem vzorku byl nanášen na akrylamidový gel.
- Elektroforéza byla provedena na 10% gelu, pro protein CHK2 na 8% gelu.

#### **4.2.4.4 Western blot**

- Proteiny z gelu byly blotováním přeneseny na membránu z nitrocelulózy.

- Membrána byla obarvena v 1x ponceau pro kontrolu přítomnosti a množství proteinu.
- Na základě molekulární markeru byla membrána nařezána tak, aby obsahovala cílové proteiny. Ponceau bylo odstraněno v PBS/0,001% Tween.
- 1 hodinu byla membrána blokována v 5% mléku rozpuštěném v PBS.
- Na membránu byla nanášena primární protilátka (Tab. 1) proti cílovému proteinu a inkubována přes noc při 4°C.
- Druhý den byla membrána promývána v PBS/0,001% Tween 3x po 10 minutách za intenzivního třepání.
- Na membránu byla nanášena sekundární protilátka (Tab. 1) konjugovaná s enzymem křenovou peroxidázou a inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě.
- Membrána byla promývána 3x po 15 minutách v PBS/0,001% Tween minutách za intenzivního třepání.
- Membrána byla inkubována s ECL substrátem 5 minut, a poté exponována na světlocitlivý film.

**Tab. I: Ředění protilátek pro metodu detekce western blot**

	<b>Protilátka</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Původ protilátky</b>	<b>Ředění</b>
<b>Primární protilátka</b>	CDC25A (F-6)	Santa Cruz	Myš	1:1000
	Phospho-Rb (Ser807/811)	Cell Signaling	Králík	1:1000
	Rb (M-15)	Santa Cruz	Koza	1:500
	Phospho-p53 (Ser15)	Cell Signaling	Králík	1:1000
	p53 (1C12)	Cell Signaling	Myš	1:1000
	Anti-Chk2	Sigma Aldrich	Myš	1:500
	p-Chk1	Santa Cruz	králík	1:500
	Chk1 Antibody	Cell Signaling	myš	1:500
	Anti- $\alpha$ -Actin	Sigma Aldrich	Králík	1:1000
<b>Sekundární protilátka</b>	Anti-Mouse	Dako	Králík	1:1000
	Anti-Rabbit	Dako	Koza	1:1000
	Anti-goat	Santa Cruz	Králík	1:1000

Poznámka: všechny uvedené protilátky byly ředěny v 5% mléku.

## 4.2.5 Průtoková cytometrie

Dynamika buněčného cyklu byla analyzována pomocí průtokové cytometrie. Buněčná DNA byla značena bromdeoxyuridinem, který se inkorporuje během replikace do DNA a jeho detekce pomocí protilátky značené fluoresceinem lze analyzovat aktivní S fázi. Dále byla obarvena propidium jodidem (PI) pro analýzu celkového obsahu DNA a dynamiku buněčného cyklu

### 4.2.5.1 Fixace buněk

- Před fixací byly buňky ošetřeny bromdeoxyuridinem o celkové koncentraci v médiu 10  $\mu\text{M}$  a inkubovány při standardních podmínkách 1 hodinu.
- Po inkubaci byl postup stejný jako u pasážování s tím rozdílem, že bylo centrifugováno i staré medium, aby bylo možné analyzovat počet apoptických buněk.
- Centrifugované buňky byly znovu resuspendovány a promyty v PBS a opět resuspendovány v 300  $\mu\text{l}$  PBS. Na mírném vortexu bylo po kapkách přidáváno 700  $\mu\text{l}$  96% vychlazeného etanolu.
- Fixované buňky byly uchovány při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2.5.2 Značení PI a Anti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein

- Fixované buňky byly centrifugovány 5 minut při 2 800 rpm. Etanol byl odstraněn a buňky resuspendovány v 50  $\mu\text{l}$  PBS/1%FBS.
- Na mírném vortexu byl po kapkách přidán 1 ml 2M HCl/0,5% Triton-X-100 a vzorky inkubovány při pokojové teplotě 30 minut za častého protřepávání jednou za 5-10 minut. Poté byly centrifugovány za stejných podmínek, supernatant odstraněn a vzorek neutralizován přidáním 3 ml PBS/1%FBS.
- Centrifugace vzorků při stejných podmínkách.
- Supernatant byl odstraněn a buňky permeabilizovány resuspendováním v 1 ml PBS/1%FBS/0,5% Tween.
- Supernatant byl odstraněn a vzorky byly opět resuspendovány v 95  $\mu\text{l}$  PBS/1%FBS/0,5% Tween + 5  $\mu\text{l}$  Anti-Bromodeoxyuridine-Fluorescein a inkubovány 30 minut při pokojové teplotě ve tmě.
- Vzorky byly promyty v 1 ml PBS a centrifugovány.
- Supernatant byl odstraněn a přidáno 200  $\mu\text{l}$  60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  PI naředěného v 1.1% dihydrátu citrátu sodném + 1  $\mu\text{l}$  RNázy A. Vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě.

- Analýza na průtokovém cytometru FC500 od firmy Beckman Coulter a vyhodnocení výsledků v CXP Analysis

## 5 Výsledky

### 5.1 Testy cytotoxicity chelátorů železa

MTT testy cytotoxicity pro deferasirox a deferipron byly provedeny na buněčných liniích myších embryonálních kmenových buněk (mEK) HM-1, V6.5 a linii myších embryonálních fibroblastů STO. Výsledná hodnota  $IC_{50}$  nám umožnila určit koncentraci pro následující experimenty, tedy pro analýzu buněčného cyklu a aktivaci kontrolních signálních drah.

Myší embryonální fibroblasty mají přibližně poloviční rychlost buněčného cyklu ve srovnání s kmenovými buňkami. Myší embryonální fibroblasty se dělí jednou za 24 hodin, zatímco mEK buňky se dělí jednou za 12 hodin. Proto  $IC_{50}$  chelatačních činidel pro mEKB byla stanovena po 24 hodinách a pro STO po 48 hodinách kultivace v přítomnosti testované látky.

Hodnoty  $IC_{50}$  DFX a DFP pro linie HM-1 a V6.5 jsou shrnuty v Tabulce II a III.  $IC_{50}$  pro STO byla v případě DFX nižší než u kmenových buněk, u DFP mírně vyšší. Tento rozdíl může být způsoben odlišným cytotoxickým mechanismem DFX a DFP.

Pro naše další experimenty jsme na základě naměřených hodnot  $IC_{50}$  zvolili koncentrace uvedené v Tab. IV. Jedná se o poloviční koncentraci vůči  $IC_{50}$  a koncentraci odpovídající  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  jsme zvolili pro vyhodnocení aktivace signálních drah vedoucích k apoptóze,  $\frac{1}{2} IC_{50}$  jsme zvolili, abychom srovnali odpověď buněk na chelataci iontů železa při koncentraci, která má nižší míru toxicity než  $IC_{50}$ , ale současně aktivuje odpověď buněk na chelataci.

**Tab. II: Hodnoty  $IC_{50}$  pro deferasirox**

Buněčná linie	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
V6.5	50,23
HM-1	53,81
STO	33,34



**Tab. III: Hodnoty IC<sub>50</sub> pro deferipron**

Buněčná linie	IC <sub>50</sub> [μM]
V6.5	128,4
HM-1	145
STO	151,4

**Tab IV: Koncentrace chelatačních činidel pro další experimenty**

CHELATAČNÍ ČINIDLO	BUNĚČNÁ LINIE	KONCENTRACE Č. 1 [μM]	KONCENTRACE Č. 2 [μM]
DEFERASIROX	V6.5	20	50
	HM-1	20	50
	STO	15	30
DEFERIPRON	V6.5	70	145
	HM-1	65	130
	STO	75	150

## 5.2 Aktivace kontrolních signálních drah buněčného cyklu chelátory železa

Kontrolní mechanismy poškození DNA, které jsou aktivovány i chelatací iontů železa, zahrnují dvě hlavní signální dráhy, z nichž jedna vede k degradaci proteinu CDC25A a druhá k aktivaci p53 transkripčního faktoru (Kastan, Bartek 2004). Tyto signální dráhy jsou sice aktivní u somatických buněk, nicméně jejich aktivace není u mEK buněk v případě chelatace iontů železa zcela objasněna (Hong, Stambrook 2004).

Aktivace kontrolních signálních drah byla analyzována metodou western blot. Buňky byly ošetřeny chelatačními činidly o koncentracích uvedených v Tab. IV. Buňky byly kultivovány po dobu 24 a 48 hodin pro EKB, 48 hodin a 96 hodin pro STO. Detekována byla celková hladina proteinů CDC25A, pRb, p53 a CHK2, a fosforylace proteinů pRb a p53. Tyto proteiny jsou důležitou součástí kontrolních signálních drah ve všech fázích buněčného cyklu (Obr. 3).

## **Aktivace CHK2**

CHK2 je aktivován fosforylací ATR/ATM kinázou (Gatei a kol. 2003). Jelikož fosfospecifická protilátka rozpoznávající fosforylovaný CHK2 u myši není dostupná, použili jsme pro detekci fosforylované formy protilátku rozpoznávající celkovou hladinu CHK2. U fosforylované formy CHK2 došlo k posunutí bandu k vyšší molekulové hmotnosti (Lukas a kol. 2001). Pro kontrolu fosforylovaného CHK2 jsme použili buňky V6.5 ozářené  $\gamma$  zářením.

MEK buňky ošetřené DFX po 24 hodinách aktivaci nevykazovaly, po 48 hodinách byl detekován mírný posun tzn. došlo k fosforylaci a aktivaci proteinu CHK2 (Obr. 8). Stejně tomu bylo i pro MEK buňky ošetřené DFP (Obr. 9). Posun fosforylovaného CHK2 byl pozorován až po 48 hodinách kultivace. K aktivaci CHK2 došlo i u linie STO v reakci na DFX i DFP. Ve srovnání s kontrolními buňkami V6.5 ozářených  $\gamma$  zářením nebyl posun u CHK2 tak výrazný. Díky pozadí na filmu byl posun vidět pouze na filmu, proto ho na obrázku nelze pozorovat.

## **Fosforylace CHK1**

Fosforylaci CHK1-Ser345 se nepodařilo detekovat. Celková hladina CHK1 nebyla již detekována, díky pozadí nespecificky navázané CHK1-Ser345 protilátce.

## **Degradace CDC25A**

CDC25A je duální fosfatáza, která odstraňuje inhibiční fosforylaci a aktivuje komplex cyklinu E/CDK2 (Mailand a kol. 2000).

mEK buňky ošetřené DFX vykazovaly po 24 hodinách snížení hladiny proteinu CDC25A ve srovnání s kontrolními buňkami. Po 48 hodinách došlo kompletně k degradaci CDC25A (Obr. 8). Na STO fibroblasty měl DFX stejný účinek jako na mEK buňky.

Podobný pokles byl pozorován u mEK buněk ošetřených DFP, V tomto případě ale nedošlo ke kompletní degradaci CDC25A. Velice nízká hladina byla pozorována i po 48 hodinách (Obr. 9). Stejný pokles hladiny CDC25A byl pozorován i u STO fibroblastů.

## **Aktivace p53**

p53 je transkripční faktor, který je v buňkách udržován v inaktivním stavu vazbou s MDM2 (Kubbutat a kol. 1997.).

V buněčných lyzátech ošetřených buněk byla detekována hladina fosforylovaného p53 v pozici Ser15 a celková hladina proteinu. DFX vyvolal u mKB buněk stabilizaci a nárůst

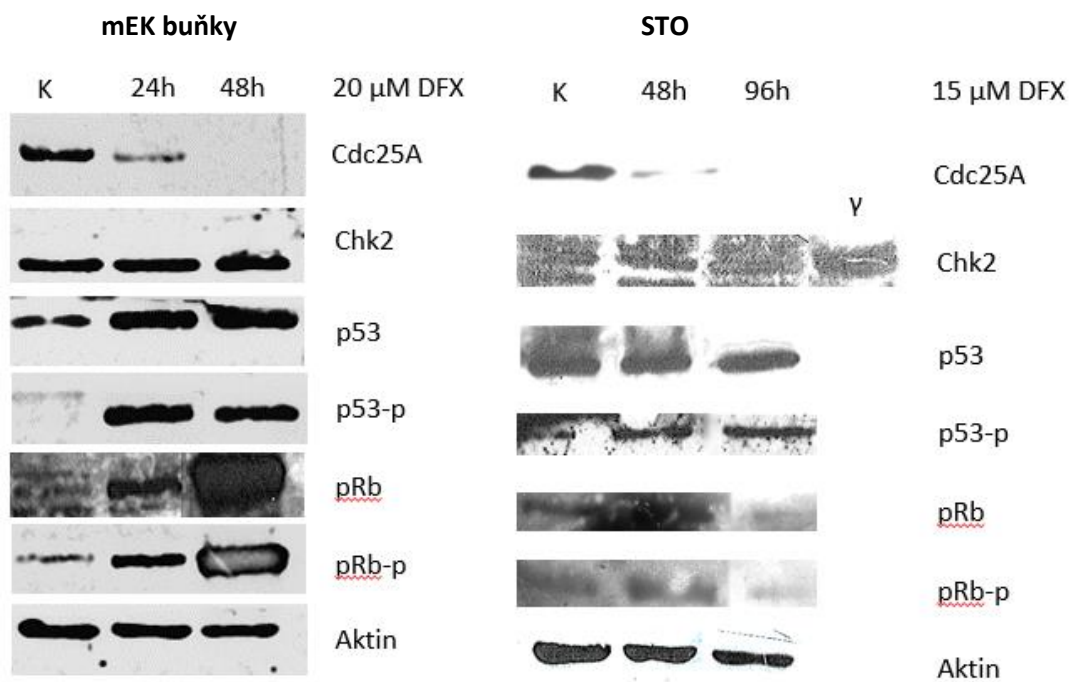
hladiny fosforylovaného p53. Zároveň došlo k nárůstu celkové hladiny p53, což ukazuje na zvýšení hladiny proteinu také na úrovni exprese. U linie STO došlo ke zvýšení hladiny fosforylovaného p53 nicméně hladina celkového p53 byla nezměněná, tzn. že nedošlo ke zvýšení exprese proteinu jako u mEK buněk (Obr. 8).

Stejný nárůst fosforylovaného a celkového p53 byl pozorován také u mEK buněk ošetřených DFP. U STO taktéž došlo k nárůstu hladiny fosforylovaného p53, ale hladina celkového proteinu zůstala konstantní (Obr. 9)

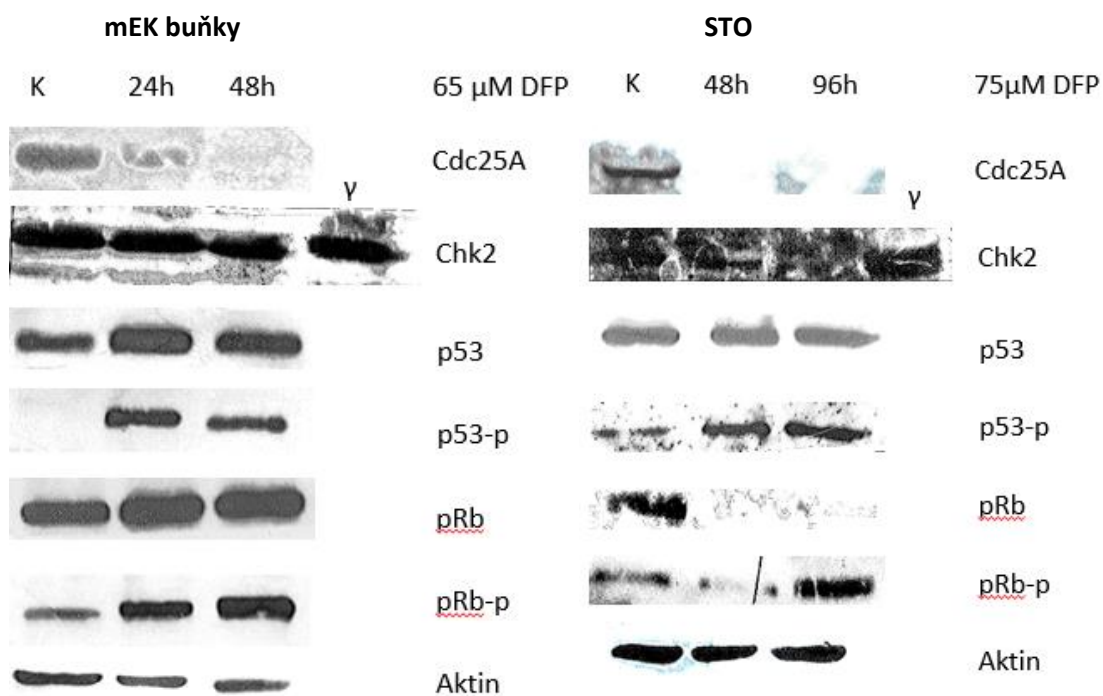
### **Inaktivace pRB**

pRB tvoří heterodimerní komplex s transkripčními faktory rodiny E2F a inhibuje tak jejich aktivitu a vstup do S fáze (Wells a kol. 2000). U myších EK buněk se pRb nachází po celý buněčný cyklus v hyperfosforylovaném inaktivním stavu (Savatier a kol. 1994). V experimentu byla detekována hladina fosforylovaného pRB v pozicích Ser 807 a Ser 811, které působí supresivně na vazebnou aktivitu C vazebné domény (Knudsen, Wang 1997). Fosforylaci provádí cyklin D1/CDK4 (Zarkowska, Mittnacht 1997) Dále byla detekována hladina celkového pRb.

EK buňky ošetřené DFX vykazovaly nárůst hladiny fosforylovaného pRb a zároveň také nárůst celkové hladiny pRb tzn., že k nárůstu došlo nejen na úrovni aktivace samotného pRb proteinu, ale také na úrovni genové exprese (Obr. 8). Stejně tak reagovaly mEK buňky po ošetření DFP (Obr. 9). U STO fibroblastů došlo naopak k poklesu jak fosforylované formy pRb tak k poklesu celkové hladiny v reakci na přítomnost DFX i DFP.



Obr. 8: Detekce hladiny proteinů kontrolních signálních drah linie mEK a STO buněk ošetřených DFX



Obr. 9: Detekce hladiny proteinů kontrolních signálních drah linie mEK a STO buněk ošetřených DFP

## 5.3 Dynamika buněčného cyklu

EK buňky mají unikátní strukturu buněčného cyklu. Většinu buněčného cyklu tvoří S-fáze. Somatické buňky tráví největší část buněčného cyklu v G1 fázi (Stead a kol. 2002).

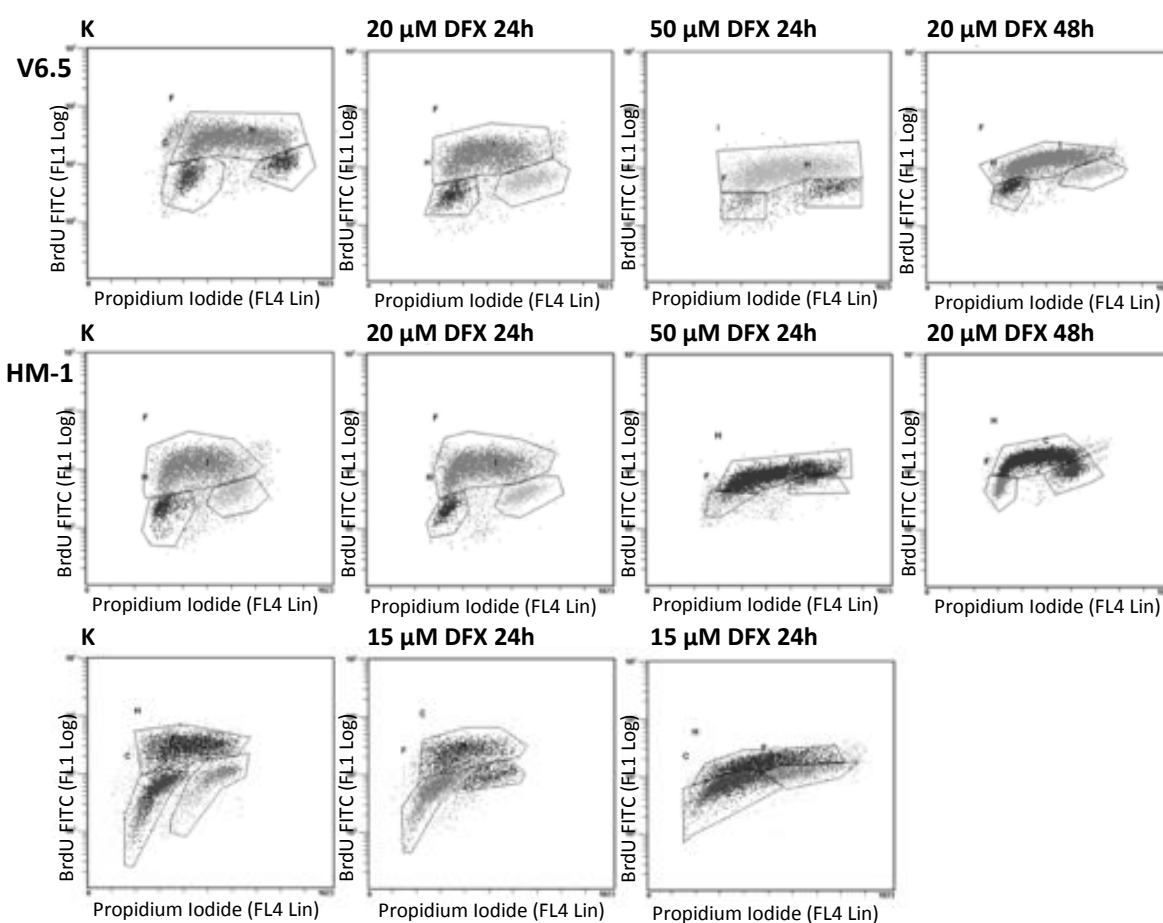
Cílem našeho experimentu bylo sledovat změny ve struktuře buněčného cyklu, které jsou výsledkem chelatace iontů železa z média i z buněk. Zaměřili jsme se na zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a na dynamiku S-fáze. Buňky ošetřené chelatačním činidlem byly hodinu před lýzou a fixací kultivovány s analogem tymidinu bromdeoxyuridinem (BrdU). BrdU nám umožňuje detekci buněk v aktivní S fázi, tedy při replikaci DNA.

### 5.3.1 Dynamika buněčného cyklu v přítomnosti deferasiroxu

mEK buňky byly kultivovány s DFX o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  po dobu 24 a 48 hodin a o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin. STO byly kultivovány s DFX při 15  $\mu\text{M}$  koncentraci po dobou kultivace 48 a 96 hodin. U EK buněk ošetřených DFX především u linie V6.5 lze pozorovat nárůst buněk v S fázi a zároveň úbytek v G1 fázi, tento rozdíl je výrazný především u koncentrace 50  $\mu\text{M}$ , kde tento rozdíl činí cca 14%. Zastoupení buněk v G2/M fázi se také mírně snižuje (Tab.V). 20  $\mu\text{M}$  koncentrace po 24 hodinách kultivace nevykazovala oproti kontrole žádný významný rozdíl. U 48 hodinové kultivace byl rozdíl buněk v S fázi ve srovnání s kontrolou 7 %. Podobný efekt měl DFX také na linii HM-1. Rozdíly ovšem nebyly tak výrazné jako u linie V6.5. U EK buněk lze pozorovat mírný pokles intenzity fluorescence značené protilátky proti BrdU. Což znamená, že dochází ke zpomalení replikaci DNA. U STO fibroblastů dochází naopak k nárůstu buněk v G1 fázi u 96 h kultivace je to 10% rozdíl oproti kontrolnímu vzorku. Naopak dochází k úbytku v S fázi. Počet buněk v G2/M zůstává přibližně stejný. I v případě STO dochází k výraznějšímu poklesu fluorescence BrdU a tedy zastavení replikace DNA (Obr. 10). Rozdíl mezi mEK buňkami STO je vidět také v množství apoptických buněk. U EK se zvyšuje procento apoptických buněk a to zejména u 50  $\mu\text{M}$  koncentrace. U STO nejsou žádné výrazné rozdíly ve srovnání s kontrolním vzorkem (Tab. V)

**Tab. V: Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu**

	<i>c</i> DFX [ $\mu$ M]/Čas [h]	G1 [%]	S [%]	G2/M [%]	Apoptóza [%]
V6.5	0/24	11,8	66,6	14,4	6,2
	20/24	11,2	67,5	17,8	10,3
	50/24	6,7	80,4	10	32,4
	20/48	11,2	73,1	12,6	nesledována
HM-1	0/24	13,7	66,3	14,4	nesledována
	20/24	11,7	70,6	13,4	nesledována
	50/24	6,37	74,5	6,6	nesledována
	20/48	11,1	72,5	14,4	nesledována
STO	0/24	35,8	47,5	14	2,8
	15/48	41	42	12	2,9
	15/96	45,5	37,8	15,4	1,4



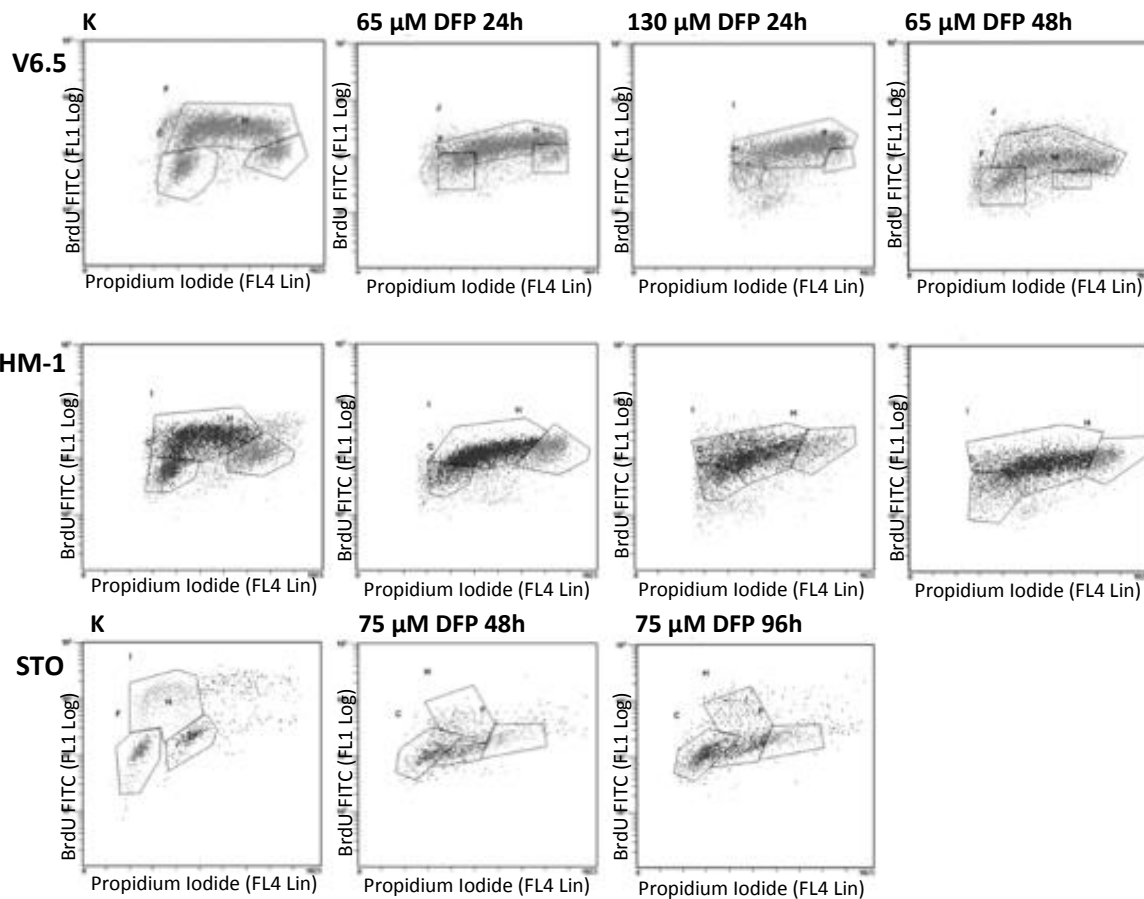
**Obr. 10: Dynamika buněčného cyklu linie MEK buněk a STO ošetřených DFX**

### 5.3.2 Dynamika buněčného cyklu v přítomnosti deferipronu

V6.5 linie byla kultivována s DFP o koncentraci 65  $\mu\text{M}$  po dobu 24 a 48 hodin a o koncentraci 130  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin. Linie HM-1 byl kultivována při 70  $\mu\text{M}$  koncentraci po dobu 24 a 48 hodin a o koncentraci 145  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin. STO byly kultivovány s DFP při 75  $\mu\text{M}$  koncentraci po dobu kultivace 48 a 96 hodin. U linie V6.5 lze pozorovat výraznou změnu v zastoupení buněk v jednotlivých fázích při kultivaci v přítomnosti 130  $\mu\text{M}$  - dochází ke zvýšení počtu buněk v S fázi ve srovnání s neošetřenými buňkami o 10%. Při kultivaci v přítomnosti 65  $\mu\text{M}$  DFP je po 96 hodinách tento rozdíl 9% oproti kontrole. Linie HM-1 reagovala na chelataci iontů železa pomocí DFP stejně jako V6.5 (Tab. VI). U DFP došlo k výraznému poklesu inkorporace BrdU, u buněk tedy nedochází k replikaci DNA a došlo k zastavení cyklu v S fázi. U STO je vidět výrazné zvýšení počtu buněk v G1 fázi, tzn. došlo k zastavení buněčného cyklu v G1 a současně k zastavení replikace u buněk v S fázi (Obr. 11). Stejně jako u DFX, u linií mEK buněk dochází ke zvýšení počtu mrtvých buněk. U STO linie nejsou zřejmé žádné výrazné rozdíly (Tab. VI).

**Tab. VI: Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu**

	<i>c DFP [<math>\mu\text{M}</math>]/Čas [h]</i>	<i>G1 [%]</i>	<i>S [%]</i>	<i>G2/M [%]</i>	<i>Apoptóza [%]</i>
V6.5	0/24	13,3	68,9	8,7	5,8
	65/24	14,9	63,8	9	12,4
	130/24	16,4	78,9	3,3	31,9
	65/48	18	67,7	3,6	31,2
HM-1	0/24	15,4	53,9	19,7	5,3
	70/24	14,1	61	16,5	13
	145/24	14,8	65	12,5	30,9
	70/48	11,8	70,6	14,1	30,1
STO	0/24	27,6	40,9	17,8	7,6
	75/48	39,6	39,7	14,6	14,5
	75/96	42,8	32,8	12,4	6,4



**Obr. 11: Dynamika buněčného cyklu linie MEK buněk a STO ošetřených DFP**



## 6 Diskuze

Chelatační látky deferasirox (DFX) a deferipron (DFP) mají vysokou afinitu k iontům železa. Deficit iontů železa v buňce vede k aktivaci kontrolních signálních drah a k zástavě buněčného cyklu somatických buněk. DFX a DFP se liší svými chemickými vlastnostmi, které určují jejich cytotoxický efekt, a proto se liší i buněčná odpověď na jednotlivé látky (Kalinowski, Richardson 2005). Vliv chelatačních látek na somatické buňky je poměrně dobře popsán (Yu a kol. 2007). Odstranění iontů železa vede k aberantní funkci enzymů, jejichž kofaktorem jsou ionty železa, k replikačnímu stresu a k aktivaci kontrolních signálních drah, což vede k zastavení buněčného cyklu nejčastěji v G1 fázi (Nyholm a kol. 1993). V naší práci jsme se zaměřili na charakterizaci odpovědi mEK buněk na přítomnost chelatačních činidel.

Publikace uvádí toxicitu pro DFX testované na lidské myeloidní leukemické buněčné linii HL-60 po dobu kultivace 24 hodin hodnotu  $IC_{50}$  50  $\mu$ M (Ohyashiki a kol. 2009). Pro DFP 180  $\mu$ M a DFO 20  $\mu$ M na buněčné linii rakoviny prsu MCF-7 po dobu kultivace 24 hodin (Le, Richardson 2004b). Námi zjištěné hodnoty  $IC_{50}$  pro DFX 50  $\mu$ M pro V6.5 54  $\mu$ M pro HM-1 a pro DFP 128 pro V6.5 a 145 pro HM-1 se výrazně nelišily od hodnot v jiných publikacích, kde byly chelatační činidla testována na liniích nádorových kmenových buněk.  $IC_{50}$  mezi STO a mEK buňkami se mírně lišily díky době kultivace STO a chelátoru po dobu, která trvala 48 hodin a nejspíš také díky odlišnostem v regulaci buněčného cyklu. Obecně má nejvíc antiproliferační efekt DFO, DFX a nejméně DFP.

Souhlasně s dříve publikovanými daty jsme ukázali, že DFX zastavuje buněčný cyklus STO buněk, aniž by evokoval apoptózu. Toto zastavení buněčného cyklu je řízeno ATM/ATR-Chk2-Cdc25A a ATM-p53 signální drahou. Souhlasně se zastavením buněčného cyklu je aktivován protein pRb, který brání přechodu do S-fáze. U mEK buněk je situace odlišná. DFX u nich vyvolává apoptózu bez zastavení progresu buněčného cyklu. Apoptóza je řízena ATM-p53 signální drahou. Současně dochází k zvýšené expresi a fosforylaci pRb, která vede k jeho inaktivaci, čímž dochází k rychlému přechodu do S-fáze. Již dříve bylo publikováno, že mEK buňky nemají aktivní G1 kontrolní bod. Je možné, že urychlený přechod z G1 do S-fáze a následná aktivace apoptózy je součástí obranného mechanismu kmenových buněk před přenosem DNA mutací do dalších generací.

U DFP je situace odlišná. Zatímco STO linie reaguje na přítomnost DFP v kultivačním médiu velmi podobně jako DFX – dochází k zastavení buněčného cyklu v G1 a v S-fázi díky aktivaci ATM-p53 a ATM/ATR-CHK2-CDC25A, mEK buňky se chovají jinak než u

kultivace v přítomnosti DFX. DFP způsobuje u mEK buněk jak apoptózu, tak zastavení buněčného cyklu v S-fázi. Jelikož signální dráhy jsou u mEK buněk aktivovány obdobně u obou chelátorů, je možné, že DFP iniciuje diferenciaci, čímž umožňuje buňkám zastavení buněčného cyklu.

Celková hladina CHK1 se nám nepodařilo detekovat, protože došlo k nespecifické vazbě protilátky na proteiny. Nelze tedy říct, zda se CHK1 podílel na aktivaci ATM-p53 a ATM/ATR-CHK2-CDC25A signálních drah.

Dynamika buněčného cyklu v přítomnosti DFP a DFX byla porovnána s výsledky pro DFO, které byly uvedeny v mé bakalářské práci. STO fibroblasty v přítomnosti DFO reagují stejně jako na DFX a DFP – dochází k zástavě buněčného cyklu v G1 a S fázi. Naopak u mEK buněk nebyl pozorován žádný efekt – nedošlo k zastavení buněčného cyklu. DFO stejně jako DFX a DFP evokuje apoptózu (Jakoubková, 2013).

Efekt chelatačních činidel na buněčný cyklus mEK buněk je nejspíš dán mechanismem působení. Lipofilní DFX a DFP se dostávají do buňky prostou difuzí a chelatují intracelulární železo. K rozdílnému efektu DFX a DFP na buněčný cyklus mEK buněk mohla přispět schopnost DFX generovat volené radikály (Choudhry, Naithani 2007; Pullarkat a kol 2012) Ty poškozují DNA, což vedle v případě mEK buněk k apoptóze nikoliv zástavě buněčného cyklu v S-fázi, jako u DFP, která produkuje radikály pouze při nízkých koncentracích (Galanello 2007). DFO se díky hydrofilitě dostává do buňky pouze endocytózou velice omezeně, proto chelatuje železo převážně z média a efekt deprivace se projeví po vyčerpání zásob iontů železa v buňce (Aouad a kol. 2002, Doulias a kol. 2003).

Vzhledem k proapoptickému vlivu chelátorů železa je velmi pravděpodobné jejich využití v léčebné terapii. Můžeme předpokládat stejný efekt DFP, DFX a DFO i na ostatní kmenové buňky včetně nádorových.

## 7 Závěr

Myší embryonální kmenové buňky jsou vhodným modelem pro studium nádorových kmenových buněk. EK buňky stejně jako buňky nádorové se rychle dělí a vyžadují tak větší množství iontů železa než normální somatické buňky. V této práci byla zhodnocena antiproliferační a proapoptotická aktivita chelatačních činidel DFX a DFP u myších embryonálních kmenových buněk

V teoretické části této diplomové práce byly popsány obecné vlastnosti embryonálních kmenových buněk, základní mechanismy regulace buněčného cyklu a signální molekuly buněčného cyklu regulované dostupností železa. V experimentální části byly testovány chelatační činidla DFX a DFP a jejich vliv na dynamiku buněčného cyklu myších embryonálních kmenových buněk a aktivaci kontrolních signálních drah. Tyto výsledky byly porovnány s výsledky DFO z mé bakalářské práce.

U myších embryonálních kmenových buněk kultivovaných v přítomnosti DFX nebo DFP byla detekována hladina proteinů CHK2, CDC25A, pRb, p53 které jsou součástí kontrolních signálních drah buněčného cyklu. Výsledky ukázaly, že chelatace železa DFX i DFP vede k degradaci CDC25A a aktivaci CHK2 u mEK buněk i kontrolních STO fibroblastů. V případě embryonálních kmenových buněk, došlo ke zvýšení hladiny fosforylované a celkové hladiny pRb. U somatické linie STO, jsme pozorovali pokles celkové i fosforylované formy. Rozdíl mezi STO a mEK buňkami byl také v expresi p53. U mEK buněk došlo ke zvýšení exprese p53, zatímco u STO zůstala hladina konstantní. Ke zvýšení fosforylované formy p53 došlo u mEK buněk i STO. Vzhledem k akumulaci p53 u mEK buněk a k aktivaci apoptózy u této linie můžeme předpokládat významnou úlohu tohoto proteinu v regulaci buněčné odpovědi.

Pacienti s myelodysplastickým syndromem, kteří jsou na chelatační terapii, vykazují lepší přežití a nižší pravděpodobnost leukemické transformace. Naše studie přičítá efekt chelatační terapie u těchto pacientů aktivaci apoptózy u hematopoetických progenitorů.

## Literatura

Abdelalim E. A. (2013) Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cell Rev and Rep* 9, 764-773

An W. G., Kanekal M., Simon M. C., Maltepe E., Blagosklonny M. V., Neckers L. M. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 392, 405-408

Anderson C. P., Shen M., Eisenstein R. S., Leibold E. A. (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1468-1483

Aouad F., Florence A., Zhang Y., Collins F., Henry Ch., Ward R. J., Crichton R. R. (2002) Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta* 339, 470-480

Aprelikova O., Xiong Y., Liu E. T. (1995) Both p16 and p21 families of cyclin-dependent-kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent-kinase by the CDK-activating kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 18195-18197

Armstrong L., Saretzki G., Peters H., Wappler I., Evans J., Hole N., von Zglinicki T., Lako M. (2005) Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 23, 516-529

Arosio P., Ingrassia R., Cavadini P. (2009) Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 589-599

Bakkenist Ch. J., Kastan M. B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506

Baldin V., Ducommun B. (1995) Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *Journal of Cell Science* 108, 2425-2432

Ballabeni A., Park I. H., Zhao R., Wang W., Lerou P. H., Daley G. Q., Kirschner M. W. (2011) Cell cycle adaptations of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 29, 19252-19257

- Bartek J., Lukas J. (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429
- Bartek J., Lukas C., Lukas J. (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nature* 5, 729-804
- Bianchi L., Tacchini L., Cairo G. (1999) HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acid Research* 27, 4223-4227
- Bishop A. E., Buttery L. D. K., Polak J. M. (2002) Embryonic stem cells. *Journal of Pathology* 197, 424-429
- Boutros R., Dozier Ch., Ducommun B. (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 185-191
- Brugarolas J., Moberg K., Boyd S. D., Taya Y., Jacks T., Lees J. A. (1998) Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after  $\gamma$ -irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1002-1007
- Bulavin D. V., Higashimoto Y., Popoff I. J., Gaarde W. A., Basrur V., Potapova O., Appella E., Fornace A. J. (2001) Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411, 102-107
- Callapian M., Zhou J., Schnizer S., Metzen E., Lohr Ch., Deitmer J. W., Brune B. (2005) Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1 $\alpha$  accumulation—Implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Experimental Cell Research* 306, 274-284
- Carthon B. C., Neumann C. A., Das M., Pawlyk B., Li T., Geng Y., Sicinski P. (2005) Genetic replacement of cyclin D1 function in Mouse development by cyclin D2. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1081-1088
- Chambard J. C., Lefloch R., Pouyssegur J., Lenormand P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773, 1299-1310
- Chambers I., Smith A. (2004) Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 7150-7160
- Chen X., Xu H., Yuan P., Fang F., Huss M., Vega V. B., Wong E., Orlov Y. L., Zhang W., Jiang J., Loh Y., Yeo H. Ch., Yeo Z. X., Narang V., Govindarajan K. R., Leong B., Shahab

- A., Ruan Y., Bourque G., Sung W., Clarke N. D., Wel Ch., Ng H. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106-1117
- Choudhry V. P., Naithani R. (2007) Deferasirox exposure induces reactive oxygen species and reduces growth and viability of myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Indian Journal of Pediatrics* 74, 759-764
- Conrad M. E., Umbreit J. N., Moore E. G., Hainsworth L. N., Porubcin M., Simovich M. J., Nakada M. T., Dolan K., Garrick M. D. (2000) Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, 767-774
- Costanzo V., Shechter D., Lupardus P. J., Cimprich K. A., Gottesman M., Gautier J. (2003) An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Molecular Cell* 11, 203-213
- Craig A., Scott M., Burch L., Smith G., Ball K., Hupp T. (2003) Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *Embo* 4, 787-792
- Dahéron L., Opitz S. L., Lenisch W. M., Andrews P. W., Itskovitz-Eldor J., Daley G. Q. (2004) LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 770-778
- Dang S. M., Kyba M., Perlingeiro R., Daley G. Q., Zandstra P. W. (2001) Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cell in different culture system. *Biotechnol Bioeng* 78, 442-453
- Dean M., Fojo T., Bates S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews* 5, 275-284
- Devanur L. D., Neubert H., Hider R. C. (2007) The fenton activity of Iron(III) in the presence of deferiprone. *Journal of Pharmaceutical Science* 97, 1457-1467
- Douliat P. T., Christoforidis S., Brunk U. T., Galaris D. (2003) Endosomal and lysosomal effect of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 719-728

- Ferguson A. M., White L- S., Donovan P. J., Worms H. P. (2005) Normal cell cycle and checkpoint response in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2853-2860
- Falck J., Coates J., Jackson S. P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611
- Falck J., Mailand N., Syljuansen R. G., Bartek J., Lukas J. (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847
- Fu D. Richardson D. R. (2007) Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>CIP1/WAF1</sup> by iron depletion. *Blood* 110, 752-761
- Fung T. K., Poon R. Y. C. (2005) A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, 335–342
- Galanello R. (2007) Deferiprone in the treatment of transfusiondependent thalassemia: a review and perspective. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 3, 795-805
- Gatei M., Sloper K., Sorensen C., Syljuansen R., Falck J., Hobson K., Savage K., Lukas J., Zhou B., Bartek J., Khanna K. K. (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiatio. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 14806–14811
- Gao J., Richardson D. R. (2001) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: the mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood* 98, 842-850
- Geng Y., Yu Q., Sicinska E., Das M., Schneider J. E., Bhattacharya S., Rideout III W. M., Bronson R. T., Gardner H., Sicinki P. (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431-443
- Golan A., Yudovsky Y., Hershko A. (2002) The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk\*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 15552–15557

- Guo Y., Hartwalkar J., Stacey D. W., Hitomi M. (2005) Destabilization of cyclin D1 message plays a critical role in cell cycle exit upon mitogen withdrawal. *Oncogene* 24, 1032-1042
- Guo Y., Yang K., Harwalkar J., Nye J. M., Mason D. R., Garrett M. D., Hitomi M., Stacey D. (2005) Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene* 24, 2599-2612
- Han M. K., Song E. K., Guo Y., Ou X., Mantel Ch., Broxmeyer H. E. (2008) SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2, 241-251
- Han J. Sun P. (2007) The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 364-371
- Hajjizadeh M., Jabbari A., Heli H., Moosavi-Movahedi A. A., Shafiee A., Karimian K. (2008) Electrocatalytic oxidation and determination of deferasirox and deferiprone on a nickel oxyhydroxide-modified electrode. *Analytical Biochemistry* 373, 337-348
- Hartwell L. H., Kastan M. B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828
- Hartwell L. H., Weinert T. A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 3, 629-634
- Heath J. L., Weiss J. M., Lavau C. P., Weschler D. S. (2013) Iron deprivation in cancer—potential therapeutic implications. *Nutrients* 5, 2836-2859
- Hider R. C. (2002) Nature of nontransferrin-bound iron. *European Journal of Clinical Investigation*. 32, 50-54
- Hirai H., Russel M. F., Kato J., Ashmun R. A., Sherr Ch. J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, Are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2672-2681
- Hodges Y. K., Antholine W. E., Horwitz L. D. (2004) Effect on ribonucleotide reductase of novel lipophilic iron chelators: the desferri-exochelins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, 595-598
- Hong Y., Cervantes E. B., Tichy E., Tischfield J. A., Stambrook P. J. (2007) Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells. *Mutation Research* 614, 48-55



- Hong Y., Stambrook P. J. (2004) Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 5, 14443-14448
- Hughes B. T., Sidorova J., Swanger J., Monnath R. J., Clurman B. E. (2013) Essential role for Cdk2 inhibitory phosphorylation during replication stress revealed by a human Cdk2 knockin mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 8954-8959
- Jackman M., Firth M., Pines J. (1995) Human cyclins BI and B2 are localized to strikingly different structures: BI to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *The EMBO Journal* 14, 1646-1654
- Jackson P. K., Chevalier S., Philippe M., Kirchner M. W. (1995) Early Events in DNA Replication Require Cyclin E and Are Blocked by p21<sup>CIP1</sup>. *The Journal of Cell Biology* 130, 755-769
- Jakoubková M. (2013) Vliv deprivace iontů železa na buněčný cyklus myších embryonálních kmenových buněk. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě UP na katedře buněčné biologie a genetiky. Vedoucí bakalářské práce Leona Rašková Kafková
- Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwits J., Massague J., Pavletich N. P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320
- Jeffrey P. D., Tong L., Pavletich N. P. (2000) Structural basis of inhibition of CDK–cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes & Development* 14, 3115-3125
- Kalinowski D. S., Richardson D. R. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 57, 547-583
- Kastan M. B., Bartek J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323
- Kitagawa R., Bakkenist Ch. J., McKinnon P. J., Kastan M. B. (2004) Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM–NBS1–BRCA1 pathway. *Genes & Development* 18, 1423-1438
- Klein E. A., Assoian R. K. (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *Journal of Cell Science* 121, 3853-3857

- Knudsen E. S., Wang Y. J. (1997) Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 17, 5771-5783
- Koledova Z., Kafková Rašková L. Kramer A., Divoký V. (2010) DNA damage-Induced degradation of Cdc25A does not lead to Inhibition of Cdk2 activity in mouse embryonic stem cell. *Stem Cells* 28: 450-461
- Kubbutat M. H. G., Jones S. N., Vousden K. H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 383, 299-303
- Laronga Ch., Yang H., Neal Ch., Lee M. (2000) Association of the Cyclin-dependent Kinases and 14-3-3 Sigma Negatively Regulates Cell Cycle Progression. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 23106–23112
- (a) Le N. T. V., Richardson D. R. (2004) Competing pathways of iron chelation: angiogenesis or anti-tumor activity: targeting different molecules to induce specific effects. *Int. J. Cancer* 110, 468–469
- (b) Le N. T. V., Richardson D. R. (2004) Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 104, 2967- 2975
- Lee S. K., Jang H. J., Lee H. J., Lee J., Jeon B. H., Jun Ch. D., Lee S. K. Kim E. Ch. (2006) p38 and ERK MAP kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and -suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Life Science* 79, 1419-1427
- Liang S. X., Richardson D. R. (2003) The effect of potent iron chelators on the regulation of p53: examination of the expression, localization and DNA-binding activity of p53 and the transactivation of *WAF1*. *Carcinogenesis* 24, 1601-1614
- Liu F., Stanton J. J., Wu Z., Piwnica-Worms H. (1997) The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and golgi complex. *Molecular and Cellular Biology* 17, 571-583

- Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S., Murohy M. E., Appella E., Xu Y. (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing *Nanog* expression. *Nature Cell Biology* 7, 165-171
- Lindqvist A., Kallstrom H., Lundgren A., Barsoum E., Rosenthal Ch. K. (2005) Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1–Cdk1 at the centrosome. *The Journal of Cell Biology* 171, 35-75
- Lindqvist A., Rodríguez-Bravo V., Medema R. H. (2009) The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of Cell Biology* 185, 193-202
- Löbrich M., Jeggo P. A. (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature* 7, 861-869
- Lolli G., Johnson L. N. (2005) CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 4, 572-577
- Lopez-Girona A., Furnari B., Mondesert O., Russell P. (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172-175
- Ludlow J. W., Glendening C. L., Livingston D. M., DeCaprio J. A. (1992) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Molecular and Cellular Biology* 13, 367-372
- Lukas C., Bartkova J., Latella L., Falck J., Mailand N., Schroeder T., Sehested M., Lukas J., Barte J. (2001) DNA Damage-activated kinase Chk2 Is Independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Research* 61, 4990-4993
- Lundberg A. S., Weinberg R. A. (1997) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and Cellular Biology* 18, 753-761
- Mailand N., Flack J., Lukas C., Syljuásen R. G., Walcker M., Bartek J., Lukas J. (2000) Rapid destruction of juman Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425-1429
- Malumbres M., Sotillo R., Santamaría D., Galán J., Cerezo A., Ortega S., Dubus P., Barbacid M. (2004) Mammalian Cells Cycle without the D-Type Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504

- Miller M. E., Frederick R. C. (2000): Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 20, 542-555
- Mitra J., Endres G. H. (2003) Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* 23, 3361–3367
- Morrison S. J., Kimble J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074
- Nakashima K., Takizawa T., Ochal W., Yanagisawa M., Hisatsune T., Nakakfuku M., Mlyazono K., Kishimoto T., Kageyama R., Taga T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 5868-5873
- Nguyen T., Manova K., Capodiec P., Lindon C., Bottega S., Wang X., Refik-Rogers J., Pines J., Wolgemuth D. J., Koff A. (2002) Characterization and expression of mammalian cyclin B3, a prepachytene meiotic cyclin. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 41960-41969
- Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development* 12, 2048-2060
- Novák B., Tyson J. J. (2004) A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *Journal of Theoretical Biology* 230, 563-579
- Nurtjahaja-Tjendraputra E., Fu D., Phang J. M., Richardson D. R. (2007) Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency–mediated growth suppression. *Blood* 109, 4045-4054
- Nyholm S., Mann G. J., Johansson A. G., Bergeron R. J., Graslund A., Thelander L. (1993) Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 26200-26205
- Ohgami R. S., Campagna D. R., Greer E. L., Antiochos B., McDonald A., Chen J., Sharp J. J., Fujiwara Y., Barker J. E., Fleming M. D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature* 437, 1254-1269
- Ohtani K., DeGregori J., Nevins J. R. (1995) Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 12146-12150

- Ohyashiki J. H., Kobayashi C, Hamamura R., Okabe S., Tauchi T., Ohyashiki K. (2009) The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Science* 100, 970-977
- Oku T., Ikeda S., Sasaki H., Fukuda K., Morioka H. Ohtsuka E., Yoshikawa H., Tsurimoto T. (1998) Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase  $\delta$  and replication factor C. *Genes to Cells* 3, 357-369
- Perlstein D. L., Ge J., Ortigosa A. D., Robblee J. H., Zhang Z., Huang M., Stubbe J. (2005) The active form of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit is a heterodimer *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry* 44, 15366-15377
- Pullarkat V., Sehgal A., Li L., Meng Z., Lin A., Forman S., Bhatia R. (2012) Deferasirox exposure induces reactive oxygen species and reduces growth and viability of myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Leukemia Research* 36, 966-973
- Saletta F., Rahmanto Y. S., Siafakas A. R., Richardson D- R- (2011) Cellular iron depletion and the Mechanisms Involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA damage family of genes. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 35396-35406
- Santoni-Rugiu E., Falck J., Mailand N., Bartek J., Lukas J. (2000) Involvement of Myc activity in a G1/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20, 3497-3509
- Sanvisens N., Banó M. C., Huang M., Puig S. (2011) Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Molecular Cell* 44, 759-769
- Satyanarayana A., Kaldis P. (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogen* 28, 2925-2939
- Savatier P., Huang S., Szekely L., Wiman K. G., Samarut J. (1994) Contrasting patterns of retinoblastoma protein expression in mouse embryonic stem cells and embryonic fibroblasts. *Oncogene* 9, 809-818
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L. A., Rudkin B. B., Samarut J. (1995) Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitor in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 12, 309-322
- Sherr Ch. J. (1996) Cancer cell cycle. *Science* 274, 1672-1677

- Sherr Ch. J., Roberts J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 13, 1501-1512
- Shiloh Y., Kastan M. B. (2001) ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.* 83, 209-254
- Singer J. D., Gurian-West M., Clurman B., Roberts J. M. (1999) Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Development* 15, 2375-2387
- Sokol S. Y. (2001) Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development* 138, 4341-4350
- Stead E., White J., Faast R., Conn S., Goldstone S., Rathjen J., Dhingra U., Rathejn P., Walker D., Dalton S. (2002) Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* 21, 8320-8333
- Talks K. L., Turley H., Gatter K. C., Maxwell P. H., Pugh Ch. W., Ratcliffe P. J., Harris A. D. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues. Cancers, and tumor-associated macrophages. *American Journal of Pathology* 157, 411-421
- Takeda D. Y., Dutta A. (2005) DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24, 2827-2843
- Toyoshima-Morimoto F., Taniguchy E., Shinya N., Iwamatsu A., Nishida E. (2000) Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Natura* 410, 215-220
- Tsvetko L. M., Yeh K. H., Lee S. J., Sun H., Zhang H. (1999) p27<sup>Kip1</sup> ubiquitination and degradation is regulated by the SCF<sup>Skp2</sup> complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current Biology* 12, 661-664
- Pagano M., Theodoras A. M., Tam S. W., Draetta G. F. (1994) Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes & Development* 8, 1627-1639
- Parisi T., Beck A. R., Rougier N., McNeil T., Lucian L. Werb Z., Amati B. (2003) Cyclins E1 and E2 are required for endoreduplication in placental trophoblasts giant cells. *The EMBO Journal* 22, 4794-4803

- Peng Ch., Graves P. R., Thoma R. S., Wu Z., Shaw A. S., Piwnica-Worms H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science* 277, 1501-1505
- Perdiguero E., Nebreda A. R. (2004) Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G2/M transition. *Cell Cycle* 6, 733-737
- Petersen B. O., Lukas J., Sorensen C. S., Bartek J., Helin K. (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO Journal* 18, 396-410
- Poyurovsky V. M., Katz Ch., Laptenko O., Beckerman R., Lokshin M., Ahn J., Byeon I., Gabizon R., Mattia M., Zupnick A., Brown L. M., Friedler A., Prives C. (2010) The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 982-989
- Vaghefi S. H. E., Fard N. Z., Shahidzadeh Z., Nematollahi-mahani S. N. (2009) Isolation and primary culture of ES-like colonies from NMRI mouse embryos. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 7, 145-152
- Vermeulen K., Bockstaele D. R. B., Berneman Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131-149
- Wagers A. J., Weissman I. L. (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648
- Wang Y., Baskerville S., Shenoy A., Babiarz J. E., Baehner L., Brelloch R. (2008) Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature* 40, 1478-1483
- Wang J., Pantopoulos K. (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 434, 365-381
- Weiss R. H. (2003) p21<sup>Waf1/Cip1</sup> as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* 4, 245-429
- Wells J., Boyd K. E., Fry Ch. J., Bartley S. M., Farnham P. J. (2000) Target Gene Specificity of E2F and Pocket Protein Family Members in Living Cells. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5795-5807

- Winston N., Bourgain-Guglielmetti F., Ciemerych M. A., Kubiak J. Z., Senamaud-Beaufort C., Carrington M., Bréchet Ch. Sobczak-Thépot J. (2000) Early development of mouse embryos null mutant for the cyclin A2 gene occurs in the absence of maternally derived cyclin A2 gene products. *Developmental Biology* 223, 139-153
- Wobus A. M., Bohler K. R. (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85: 635–678
- Wray J., Kalkan T., Gomez-Lopez S., Eckardt D., Cook A., Kelmer R., Smith A. (2011) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature Cell Biology* 13, 838-845
- Wu K. J., Polack A., Dalla-Favera R. (1999) Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 238, 676-679
- Ying Q., Nichols J., Chambers I., Smith A. (2003) BMP Induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cells self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292
- Yoon G., Kim H. J., Yoon Y. S., Cho H., Lim I. K., Lee J. H. (2002) Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-mediated p27<sup>Kip1</sup> expression. *Biochem J.* 366, 613-621
- Yu Y., Kovacevic Z., Richardson D. R. (2007) Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle* 6, 1982-1994
- Yu Z., Pestell T. G., Lisanti M. P., Pestell R. G. (2012) Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 2144-2151
- Zachos G., Rainey M. D., Gillespie D. A. F. (2003) Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defect. *The EMBO Journal* 22, 713-723
- Zarkowska T. Mittnacht S. (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 12738-12746
- Zhan Q., Antinore M. J., Wang X. W., Carrier F., Smith M. L., Harris C. C., Fornace A. J. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Onkogene* 18, 2892-900



Zhang J.G., Owczarek C. M., Ward L. D., Howlett G. J., Fabri J. L., Roberts B. A., Nicol N. A. (1997) Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J.* 325, 693-700

Zhang F., Wang W., Tsuji Y., Torti S. V., Torti F. M. (2008) Post-transcriptional modulation of Iron homeostasis during p53-dependent growth arrest. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 33911-33918

Zindy F., Soares H. Hertog K. H., Morgan J., Sherr C. J., Roussel M. F. (1997) Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ.* 8, 1139-1150

Zou L., Elledge S. J., (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 6, 1542-1548

Zou L., Stillman B. (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Molecular and Cellular Biology* 20, 3086-3096

## **Použité zkratky**

APC - anafázi podporující komplex  
APS - ammonium persulfate  
ATM - ataxia-telangiectasia mutated  
ATR - ataxia-telangiectasia and Rad3-related  
ATRIP - ATR interakční protein  
BMF2 - bone morphogenetic protein 2  
BRCA1 - breast cancer type 1 susceptibility protein  
CAK - CDK aktivační kináza  
CDC45 - cell division cycle 45  
CDC7 - cell division cycle 7  
CDK - cyklin-dependentní-kinázy  
CHK1/2 - checkpoint kinase 1/2  
DCYTb - duodenal cytochrome b  
DFO - desferrioxamin mesylát  
DFP - deferipron  
DFX - deferasirox  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO dimetylsulfoxid  
DMT1 - divalent metal transporter 1  
DP – dimerizační partner  
DTT - dithiothreitol  
EGTA - etylenglykol-tetraoctová kyselina  
EKB - embryonální kmenové buňky  
ERK - extracelulárním signálem-regulovaná kináza  
FBS - fetální hovězí sérum  
FOXM1 - forkhead box protein M1  
GADD45 - growth arrest and DNA-damage-inducible protein  
GSK3 - glykogen syntáza kináza 3  
HEPES - 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetanesulfonová kyselina  
HIF-1 - hypoxický indukibilní faktor1  
HO-1 - haem oxygenáza 1  
IRE - iron-responsive element

IRP 1/2 - iron regulatory protein 1/2  
JAK - Janus kináza  
KB - kmenové buňky  
KLF4 - Kruppel-like factor 4  
LIF - leukemický inhibiční faktor  
LIFR - LIF receptor  
MAPK mitogenem-aktivovaná kináza  
MCM - minichromosome maintenance  
MDM2 - mouse double minute 2  
mEK - myší embryonální kmenové  
MRE11 - meiotický rekombinační faktor 11  
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid  
MYT1 myelinový transkripční faktor 1  
NBIA - neurodegeneration with brain iron accumulation  
NBS1 – nibrin  
NF-Y - nukleární faktor Y  
NKB - nádorové kmenové buňky  
OCT4 - oktamerní transkripční faktor 4  
PBS - fosfátový pufr  
PCNA - proliferační antigen buněčného jádra  
PIKK - fosfatidyl inositol-3-kináza  
PLK - Polo-like kináza  
PMSF fenylmetylsulfonyl fluorid  
PP1 - protein fosfatáza 1  
RAD50 -DNA reparační protein  
Rb - retinoblastomový protein  
RNR - ribonukleotid reduktáza  
ROS - reaktivní formy kyslíku  
RPA - replikační protein A  
SDS - dodecylsírán sodný  
SIRT1 - silent mating type information regulation 2 homolog  
SMC1 - tructural maintenance of chromosomes 1  
SOX2 - SRY (sex determining region Y)-box 2  
STAT - signal transducer and activator of transcription

TCF3 - T-cell factor 3

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametyletylenediamin

TfR 1 - transferin receptor 1

TGF- $\beta$ 1 – transformující růstový faktor  $\beta$  1

TLK1/2 - tousled-like kinase  $\frac{1}{2}$

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan

VHL - von Hippel-Lindau

ZFX - zinc finger X-chromosomal protein