

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresa a purifikace rekombinantního komplexu
CDK2/CycA a jeho charakterizace**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Miroslav Peřina
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.“

V Olomouci dne 11. 5. 2018

.....

Poděkování

„Rád bych tímto poděkoval svému školiteli Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a čas, který mi věnoval. Zároveň bych chtěl poděkovat Mgr. Janě Škerlové, Ph.D. za spolupráci a ochotu. Poděkování patří také všem členům Laboratoře růstových regulátorů za pomoc a cenné rady, především Janě Hudcové a Olze Hustákové za technickou podporu. Taktéž bych chtěl poděkovat institucím: Katedra biochemie PřF UP, CRH, ÚOCHB AV ČR, v. v. i. a ÚEB AV ČR, v. v. i. za poskytnutý prostor a prostředky k vypracování bakalářské práce.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Miroslav Peřina
Název práce	Exprese a purifikace rekombinantního komplexu CDK 2/CycA a jeho následná charakterizace
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Cyklin-dependentní kinasy jsou klíčové regulační enzymy, intenzivně studované za účelem pochopení fyziologických procesů buňky, ale i klinické léčby nemocí.</p> <p>V praktické části této bakalářské práce byla úspěšně optimalizována exprese a afinitní purifikace rekombinantního lidského komplexu cyklin-dependentní kinasy 2 s cyklinem A.</p> <p>Získaný komplex byl biochemicky studován a byla potvrzena jeho enzymatická aktivita. Součástí studie byla i charakterizace nového inhibitoru s označením LGR4455, u kterého byl potvrzen kompetitivní charakter inhibice a byla stanovena nanomolární inhibiční konstanta. Vazba do aktivního místa kinasy byla potvrzena vyřešením krystalové struktury komplexu s inhibitorem.</p>
Klíčová slova	Cyklin-dependentní kinasy, inhibitor, buněčný cyklus, exprese, purifikace, aktivita
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Miroslav Peřina
Title	Expression and purification of recombinant complex CDK2/CycA and its characterisation
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Radek Jorda. Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Cyclin-dependent kinases are key regulatory enzymes, intensively studied to understand the physiological processes of the cell as well as for clinical treatment of diseases.</p> <p>An experimental part of this bachelor thesis was focused on the expression and affinity purification of the recombinant human complex cyclin-dependent kinase 2 with cyclin A.</p> <p>The purified complex was biochemically studied and its enzymatic activity was confirmed and quantified. Inhibition of catalytic activity by the novel compound, LGR4455, was also investigated and ATP-competitive character of inhibition in nanomolar ranges was determined. Finally, the crystal structure of the complex with the inhibitor that binds to the active site was elucidated.</p>
Keywords	Cyclin-dependent kinases, inhibitor, cell cycle expression, purification, activity
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Cyklin-dependentní kinasy	10
2.1.1	Cyklin-dependentní kinasy regulující buněčný cyklus	12
2.1.2	Cyklin-dependentní kinasy regulující transkripci	14
2.2	Struktura cyklin-dependentní kinasy 2 a její objevování.....	14
2.2.1	Aktivace cyklin-dependentní kinasy 2 vazbou cyklinu A.....	16
2.2.2	Kinasová reakce	20
2.3	Nové poznatky o struktuře a regulaci cyklin-dependentních kinas	21
2.3.1	Interakce kinasové a cyklinové podjednotky	21
2.3.2	Regulace aktivity fosforylací.....	22
2.3.3	Inhibice cyklin-dependentních kinas.....	22
2.3.4	Aktivace cyklin dependentní kinasy 2 obcházející kanonický model.....	23
2.3.5	Další regulační místa v molekule cyklin dependentní kinasy 2	24
2.4	Stav struktur cyklin-dependentních kinas v proteinové databance (PDB).....	25
2.5	Přístupy vedoucí ke stanovení struktury proteinu	29
2.5.1	Expresní systémy.....	30
2.5.2	Purifikace rekombinantních proteinů	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1	Materiál	33
3.1.1	Chemikálie.....	33
3.1.2	Biologický materiál	34
3.1.3	Roztoky	35
3.2	Přístrojové vybavení a příslušenství.....	35
3.3	Metody	36
3.3.1	Transformace klonovacích bakterií, kultivace a izolace plasmidové DNA	36
3.3.2	Horizontální elektroforéza plasmidů v agarosovém gelu.....	37
3.3.3	Transformace kompetentních expresních bakterií, kultivace, sklizení	37
3.3.4	Purifikace komplexu cyklin-dependentní kinasy 2 s cyklinem A.....	38
3.3.5	Polyakrylamidová elektroforéza za denaturujících podmínek	40
3.3.6	Kinasová reakce – stanovení aktivity a inhibice komplexu	41
3.3.7	Krystalizace a získání difrakčních dat.....	41

4	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
4.1	Horizontální elektroforéza plasmidů.....	43
4.2	Optimalizace exprese a purifikace CDK2/CycA	44
4.3	Kinasová reakce	51
4.4	Struktura komplexu cyklin-dependentní kinasy 2 s cyklinem A	53
5	ZÁVĚR	55
6	LITERATURA	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Seznámit se s problematikou významu inhibice cyklin-dependentních kinas (CDK), pokroku ve vývoji inhibitorů CDK.

Provést rešerši přístupů vedoucích k identifikaci struktury komplexu CDK/Cyklin (typy exprese, purifikace).

Experimentální část

Optimalizovat expresi a purifikaci lidského komplexu CDK2/CycA.

Stanovit enzymovou aktivitu purifikovaného komplexu, stanovit inhibiční aktivitu studovaného inhibitoru.

Purifikovat dostatečné množství komplexu CDK2/CycA pro krystalizaci.

1 ÚVOD

Kinasy jsou enzymy patřící do skupiny transferas, jež katalyzují přenos fosfátu z ATP na substrát. Do rodiny kinas patří mimo jiné i tzv. cyklin-dependentní kinasy (CDK), které interagují s proteiny zvanými cykliny (Cyc). CDK katalyzují fosforylaci klíčových proteinových substrátů zahrnutých do regulace mnoha buněčných procesů, především buněčného cyklu a transkripce (Norbury a Nurse, 1996; Malumbres, 2014), čímž zajišťují velmi přísnou kontrolu nad těmito procesy v eukaryotických organismech. Vzhledem ke své klíčové roli pro lidské zdraví i nemoci jsou CDK velmi intenzivně studované cíle.

Pro jejich studium *in vitro* je používána široká paleta biochemických a molekulárně biologických metod, avšak nejvíce zastoupena je jejich exprese v heterologních systémech (nejčastěji v bakteriálních či hmyzích buňkách). Po jejich purifikaci a asociaci s adekvátním cyklinem je studována enzymová aktivita a následně inhibice nízkomolekulárními látkami. Pro kompletní popis interakce komplexu CDK/Cyc s daným inhibitorem je velmi často prováděna krystalizace a rentgenová analýza za zisku trojrozměrné struktury. Na základě popisu vazebného módu inhibitoru a interakce s jednotlivými residui aminokyselin mohou být navrhovány nové inhibitory s vylepšenými vlastnostmi.

Teoretická část této práce se zabývá funkcí CDK v organismu, strukturou CDK2 a jejím postupným objevováním, stavem struktur CDK v proteinové databance a současnými metodami používanými k expresi a purifikaci lidských CDK. Praktická část této práce popisuje optimalizaci exprese a purifikace komplexu CDK2/CycA, charakterizaci enzymové aktivity a inhibice novým inhibitorem LGR4455 a strukturu komplexu CDK2/CycA s daným inhibitorem.

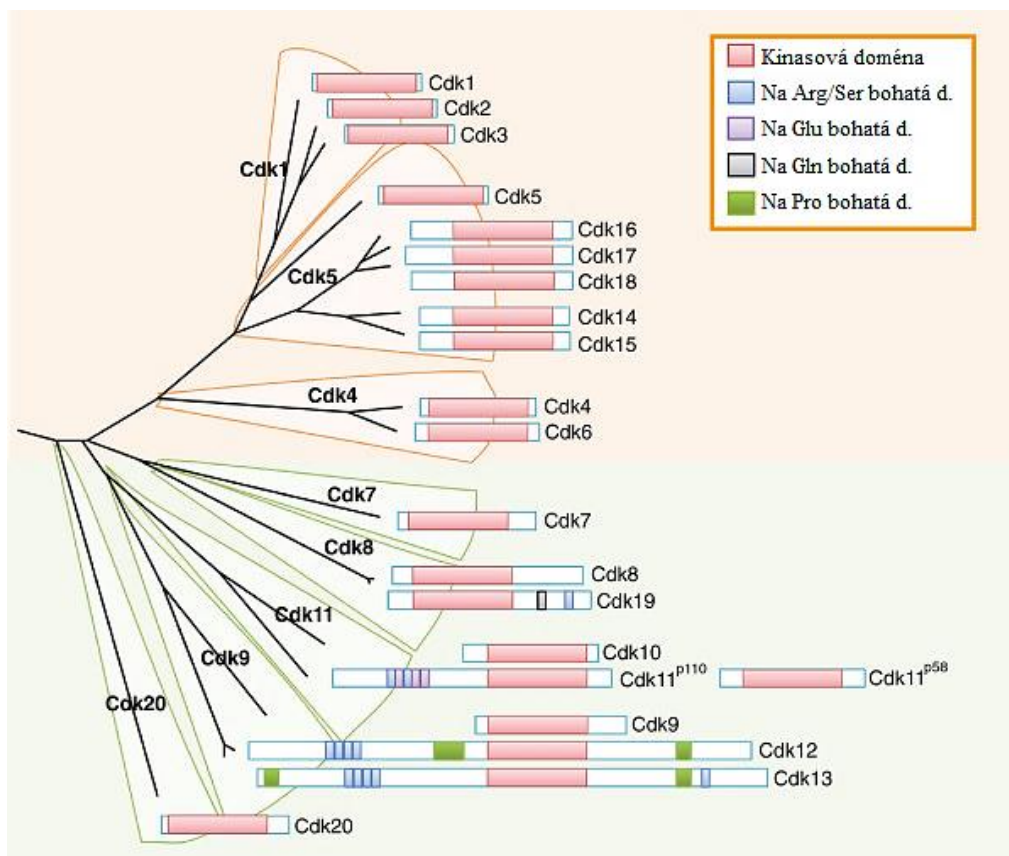
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cyklin-dependentní kinasy

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) (EC 2.7.11.22) jsou skupinou proteinkinás patřících do rodiny serin/threoninových kinas. Jejich katalytická aktivita je závislá na přítomnosti oddělené jednotky, cyklinu (Cyc), jež umožňuje kinasovou aktivitu. Koncentrace cyklinu se v průběhu buněčného cyklu periodicky mění, což dalo cyklinu i jeho název, a působí jako regulační faktor aktivity CDK (Norbury a Nurse, 1992.). Jsou to velmi důležité regulační enzymy, které v závislosti na intercelulárních i intracelulárních signálech katalyzují fosforylaci specifických substrátů zapojených především do regulace buněčného cyklu a transkripce. (De Bondt *et al.*, 1993).

Navzdory svým konzervovaným funkcím v eukaryotickém buněčném cyklu a transkripci dosáhly CDK mimořádného stupně evoluční divergence a specializace. Při analýze kvasinek, jakožto modelového eukaryotického organismu bylo objeveno šest různých CDK (Cao *et al.*, 2014). Ty mohou být rozděleny do dvou tříd, kde první třída CDK, vázající více typů cyklinů, reguluje buněčný cyklus a naopak druhá třída, vázající pouze jeden typ cyklinu, reguluje transkripci. Počet jednotlivých CDK se v průběhu evoluce zvyšoval, především mezi zástupci spojenými s buněčným cyklem, například u hub (*Fungi*) je známo 6 - 8 CDK a 9 – 15 cyklinů, u dvoukřídlých (*Diptera*) je to 11 CDK a 14 cyklinů, nakonec lidské buňky disponují 20 CDK a 29 cykliny (Liu a Kipreos, 2000). Kompletní soubor všech CDK kódovaný genomem určitého organismu se nazývá CDK-kinom (Obr. 1).

Regulace aktivity CDK je velmi komplexní, samotné jsou obvykle monomerní a nevykazují kinasovou aktivitu. Hlavním regulačním faktorem je vazba cyklinu, avšak až na výjimky není komplex CDK/Cyc plně aktivní. Jeho aktivita je dále regulována fosforylací katalyzovanou CDK-aktivačními kinasami (EC 2.7.11.22, např. Cak1 u kvasinek, příp. lidský CDK-aktivační komplex (CAK)) nebo naopak defosforylací katalyzovanou tzv. Cdc-fosfatasami (EC 3.1.3.48) (Pavletich, 1999). V poslední řadě může být aktivita negativně regulována vazbou endogenních proteinů ze třídy tzv. s CDK-interagujících proteinů/kinasových inhibičních proteinů (Cip/Kip) nebo inhibitorů třídy CDK4 (INK4). Tyto inhibiční proteiny mohou ovlivňovat buď vazbu cyklinu na CDK nebo inhibovat i katalyticky aktivní fosforylované CDK/Cyc komplexy, s výsledkem zastavení průchodu buněčným cyklem (Russo *et al.*, 1996).



Obr. 1 Evoluční vztahy mezi známými lidskými cyklin-dependentními kinasami. Rodiny CDK spojené s buněčným cyklem v horní části a níže rodiny CDK spojené s transkripcí. Růžově vyznačena kinasová doména a další domény dle legendy. Fylogenetický strom byl vytvořen na základě porovnání kinasových domén (převzato a upraveno z Malumbres 2014).

Mimo dodatečné proteinové domény je kinasová doména silně konzervovaná u všech lidských CDK (Liu et Kipreos, 2000). Stejně jako ostatní kiny, se i CDK vyznačují dvoulaločnatou terciární strukturou. Menší, N-terminální lalok je tvořen především β -skládanými listy, zatímco C-terminální lalok je bohatý na α -helixy a aktivní místo se nachází mezi těmito dvěma doménami. U monomerní formy bez navázaného cyklinu je katalytická kapsa obsahující ATP-vazebné místo uzavřena T-smyčkou, která zabraňuje enzymatické aktivitě. Vazba cyklinu a fosforylace silně ovlivňují jejich aktivitu (De Bondt *et al.*, 1993, Echalier *et al.*, 2010).

CDK jsou velmi důležité regulační kiny, které mimo zmíněnou kritickou regulaci buněčného cyklu a transkripce mají mnoho dalších, důležitých úloh. V poslední době bylo zjištěno, že jsou zapojené do odpovědi na poškození DNA a modulují DNA-opravné komplexy, čímž přispívají k udržení integrity genetické informace (Lu *et al.*, 2009; Jirawatnotai *et al.*, 2011). Dále jsou zapojené do regulace ubikvitin-proteasomové degradace proteinů (D'Angiolella *et al.*, 2013), aktivace methyltransferas pro udělení

epigenetických znaků nově syntetizované DNA a histonům (Zeng *et al.*, 2011), regulace buněčného metabolismu pro zajištění energie k průchodu buněčným cyklem (Hanse *et al.*, 2012). V neposlední řadě regulují diferenciaci pluripotentních embryonálních kmenových buněk (Becker *et al.*, 2006), ale i samoobnovu kmenových buněk (Li *et al.*, 2012), mnohé neuronální pochody (shrnutí Su a Tsai, 2011) či spermatogenezi (Mikolcevic *et al.*, 2012). S přihlédnutím ke všem důležitým regulačním funkcím, které CDK mají, je logické, že jejich mutace a deregulace vedou k rozvoji různých onemocnění a proto je studium CDK velmi slibné z klinického pohledu léčby nejen rakoviny, ale širokého spektra chorob, jako např. nemoci AIDS způsobené virem HIV (Schang *et al.*, 2002), srdeční hypertrofie, parazitických onemocnění atd. (Walker *et al.*, 2011).

2.1.1 Cyklin-dependentní kinasy regulující buněčný cyklus

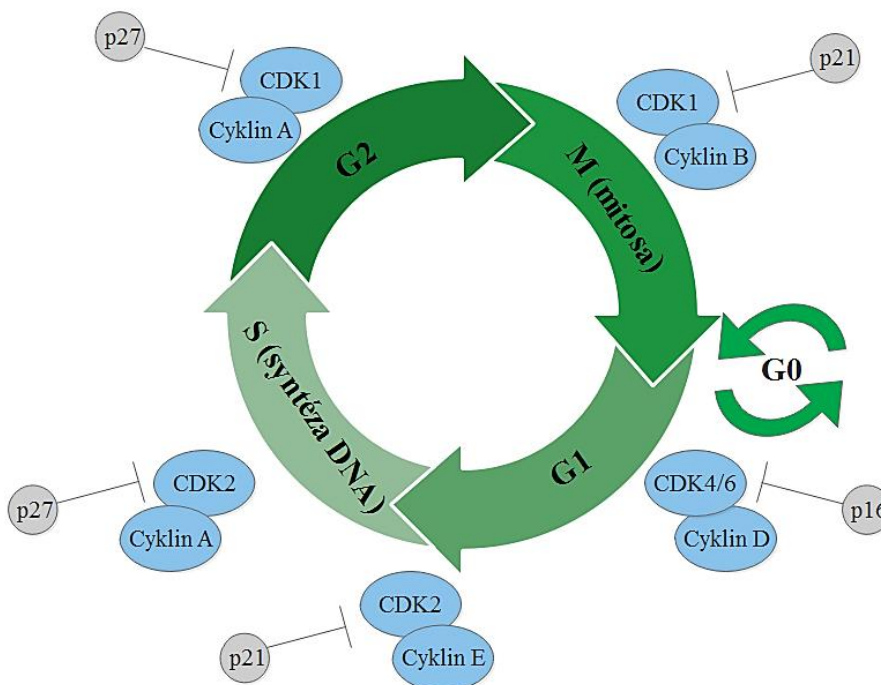
Evoluční studie CDK navrhuje rozdělení mezi 8 podrodin, reprezentovaných CDK1, CDK4 a CDK5 (odvozené od kvasinkových kinas spojených s buněčným cyklem) dále CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20 (fungujících jako transkripční CDK) (Liu a Kiperos, 2000). V tomto ohledu spadá CDK2 do podrodiny CDK1 a je typickým představitelem CDK spojené s buněčným cyklem, avšak na rozdíl od CDK1, jež je jedinou CDK nezbytnou pro savčí buněčný cyklus, jsou CDK2 a CDK3 postradatelné a jejich funkci může převzít právě CDK1 (Santamaria *et al.*, 2007).

Co se týče buněčného cyklu, vstup do G1 fáze a průchod její brzkou částí je koordinován aktivitou komplexů CDK4 a CDK6 s cyklinem D, jehož exprese je předtím aktivována mitogen-dependentní drahou. Tyto komplexy plní katalytickou roli, při které katalyzují fosforylaci retinoblastomového proteinu (pRB), čímž zajišťují další postup v G1 fázi a dále slouží jako cíle zachycující proteinové inhibitory CDK z rodiny Cip/Kip, velmi účinné inhibitory CDK2. Těmito mechanismy vytvářejí prostředí, ve kterém v pozdní G1 fázi může vzrůst aktivita CDK2, jako odpověď na expresi cyklinu E. Aktivita CDK2/CycE vede k fosforylaci klíčových substrátů zodpovědných za včasný počátek DNA replikace. Exprese cyklinu E v pozdní G1 fázi strmě klesá a CDK2 asociuje s cyklinem A do komplexů, které koordinují S fázi. Nakonec regulační funkci přebírá CDK1 v komplexu s cyklinem A a později především s cyklinem B, směřující buňku do mitotického dělení (Sherr a Roberts, 2004) (Obr. 2).

Výše uvedený popis průchodu buněčným cyklem shrnuje tzv. kvantitativní model, podle kterého jednotlivé komplexy CDK/Cyc umožňují jednotlivé oddělené fáze

buněčného cyklu. Avšak některé studie naznačovaly, že *in vivo* jsou CDK vzájemně nahraditelné, některé z nich i postradatelné a že jedna CDK je schopna zajistit jak replikaci, tak mitosu (Fisher a Nurse, 1996, Coudreuse a Nurse, 2010). Na základě těchto zjištění byl předložen i tzv. kvantitativní model, jež navrhoval, že fáze buněčného cyklu jsou závislé na celkové aktivitě CDK. Avšak na základě rozdílných metod použitých ke studiu zastupitelnosti jednotlivých CDK spojených s buněčným cyklem vznikaly diskrepance v interpretaci získaných dat. Jelikož nebyl k dispozici silně specifický inhibitor vůči jedné CDK a výsledky studií zahrnující umlčování genů byly protichůdné, musel být zvolen jiný postup.

Nakonec bylo pomocí bioinformatického přístupu a matematického modelu inhibice několika CDK ve fyziologickém systému zjištěno, že právě CDK2 je rychlost-limitujícím faktorem průchodu buněčným cyklem a samotné mitosy (Echalier *et al.*, 2012) a je i přímo nepostradatelná pro meiotické dělení u myších buněk (Ortega *et al.*, 2003). Tato skutečnost potvrzuje CDK2 jako dobrý terapeutický cíl pro ovlivnění buněčného cyklu, avšak zjištění že při inhibici CDK2 může docházet ke zvýšení aktivity CDK1 (Echalier *et al.*, 2012), která kompenzuje sníženou aktivitu CDK2, podporuje tzv. kvantitativní model.



Obr. 2 Schéma buněčného cyklu a jeho jednotlivých fází. V modrých oválech jsou zobrazeny komplexy CDK/Cyc, nutné pro danou fázi. Naopak v šedých kruzích jsou zobrazeny inhibiční p-proteiny blokující aktivitu daných komplexů.

2.1.2 Cyklin-dependentní kinasy regulující transkripci

Transkripce je mimo jiných mechanismů ovlivňována především třemi páry CDK/Cyc, jenž jsou součástí větších komplexů: CDK7/CycH součástí obecného transkripčního faktoru (TFIIH), CDK8/CycC mediátorového komplexu a CDK9/CycT pozitivního transkripčního elongačního faktoru b (P-TEFb). Všechny zmíněné komplexy regulují transkripci prostřednictvím fosforylace C-terminální domény RNA-polymerasy II a dalších transkripčních regulátorů. Zatímco komplexy CDK7 a CDK8 regulují iniciaci transkripce, CDK9 je důležitá pro regulaci transkripční elongace (Fisher *et al.*, 2005).

2.2 Struktura cyklin-dependentní kinasy 2 a její objevování

První známá 3D struktura CDK, a to konkrétně CDK2, byla objasněna pomocí rentgenové krystalografie kolektivem Hendrika L. De Bondta (1993). V té době byla nově známá struktura CDK2 porovnávána se strukturou myší cAMP-dependentní proteinkinasy (EC 2.7.11.11) (Knighton *et al.*, 1991). Konkrétně byly objasněny struktury apoenzymu monomerní CDK2 a komplexu CDK2-ATP-Mg²⁺, na základě mnohonásobné isomorfnní výměny s několika těžkými kovy.

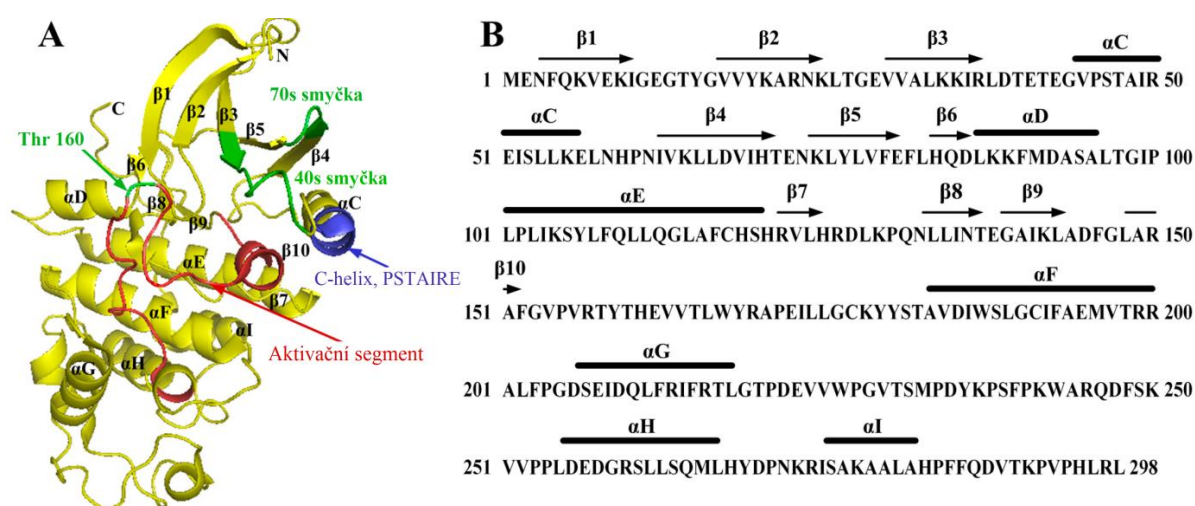
Kolektivu Ursuly Schulze-Gahmen (1996) se podařilo získat krystalové struktury CDK2 v rozlišení 1,8 Å a CDK2-ATP- Mg²⁺ v rozlišení 1,9 Å, což dovolilo detailně analyzovat aktivní centrum enzymu a vliv vazby molekul vody na vazbu přirozeného ligandu, ATP. Zároveň byla publikována myšlenka, že pozice molekul vody by mohla pomoci v budoucím designování inhibitorů CDK.

Páteřní struktura CDK2 je shodná s obecnou strukturou CDK, je tvořena dvěma laloky, přičemž menší N-terminální lalok je tvořen listem 5 antiparalelních β-vláken a jedním velkým α-helixem, zatímco větší C-terminální lalok je tvořen svazkem 4 α-helixů, smyčkou zahrnující 3 β-vlákná a navíc další dva α-helisy. N-terminální lalok obsahuje inhibiční smyčku bohatou na glycin (G-smyčka) a jediný velký α-helix, tzv. C-helix (De Bondt *et al.*, 1993) (Obr. 3). V tomto helixu se nachází důležitá sekvence Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu, tzv. sekvence PSTAIRE, klíčová pro vazbu cyklinu (Jeffrey *et al.*, 1995). V C-terminálním laloku je umístěn aktivační segment, v jehož tzv. T- smyčce se vyskytuje aktivační residuum Thr 160, citlivé na fosforylaci. Vazebné místo pro ATP a katalytická residua se nachází mezi dvěma doménami, přičemž ATP interaguje s několika aminokyselinovými residui lemujícími šterbinu mezi nimi (De Bondt *et al.*, 1993). Celkem bylo nalezeno 93 meziatomových interakcí mezi

CDK2, molekulami vody a ATP, jmenovitě 26 interakcí s adeninovou bází, 15 s ribosou a 52 s fosfáty ATP. Adeninová báze je umístěna v hydrofobní kapse mezi β -listem malého laloku a smyčkou spojující oba laloky (Schulze-Gahmen *et al.*, 1996).

Pozice fosfátů ATP je stabilizována iontovými a vodíkovými vazbami s několika residui, zahrnující Lys 33, Asp 145 i Glu 51 a amidy inhibiční G-smyčky. Z každého fosfátu ATP se jeden kyslíkový atom zapojuje do tvorby koordinačního komplexu, dále tvořeného residui Asp 145, Asn 132 a molekulou vody, v jehož středu je vázán hořečnatý ion (De Bondt *et al.*, 1993). Důležitá je i přítomnost a pozice molekul vody, kdy se před vazbou ATP nachází v okolí 4,2 Å od vazebného místa 12 molekul vody, zatímco po vazbě ATP zůstává v blízkosti pro interakci jediná molekula vody. Dvě nejvíce konzervovaná residua aktivního místa (Lys 33 a Asn 132) jsou rovněž signifikantně odlišně orientovaná v přítomnosti a nepřítomnosti ATP (Schulze-Gahmen *et al.*, 1996).

Vazebné místo pro proteinový substrát se nachází ve štěrbině mezi dvěma laloky tak, aby bylo umožněno přiblížení hydroxylové skupiny serinu ke γ -fosfátu ATP, avšak jádro této vazebné kapsy je u monomerní CDK2 téměř úplně blokováno T-smyčkou, tvořenou residui 152 – 170, obsahující na fosforylaci citlivý Thr 160, tzv. aktivační segment. Vzhledem k blokaci přístupu se T-smyčka chová jako autoinhibitor, avšak je to velmi dynamická a flexibilní struktura (De Bondt *et al.*, 1993).



Obr. 3 (A) Schematická struktura cyklin-dependentní kinasy 2 s vyznačenými strukturními prvky, vytvořená podle souřadnic struktury uložené v PDB pod přístupovým kódem 4KD1. (B) Aminokyselinová sekvence CDK2 se strukturními prvky sekundární struktury (převzato a upraveno z Li *et al.*, 2015).

Analýza nejvíce konzervovaných residuí přístupných pro rozpouštědlo ukázala místa, ve kterých může docházet k interakci CDK2 s dalšími proteiny, ať už substráty, regulačními podjednotkami nebo jinými kinasami a fosfatasami. Katalytická kinasová doména vykazuje vysoký stupeň konzervace, odlišnosti mezi jednotlivými CDK byly nalezeny ve větší vzdálenosti od aktivního místa (Jeffrey *et al.*, 1995).

Inhibiční fosforylační residua Thr 14 a Tyr 15 se obě nachází uprostřed tzv. inhibiční G-smyčky bohaté na glycin, která slouží jako kotva pro fosfáty ATP. U první známé monomerní struktury CDK byla tato residua pozorována nefosforylovaná a postranní řetězce nepřístupné pro rozpouštědlo. Hydroxylová skupina Thr 15 se nachází velmi blízko ke γ -fosfátu ATP a jeho fosforylace přímo narušuje potřebnou konformaci fosfátů, zatímco Tyr 14 je vzdálenější a jeho fosforylace neinterferuje přímo, avšak snižuje afinitu CDK k substrátům (Welbum *et al.*, 2007). V každém případě fosforylace jednoho nebo obou těchto residuí vede k inhibici kinasové aktivity z důvodu interference s vazbou proteinového substrátu nebo nepřímého ovlivnění orientace fosfátů ATP. Inhibice CDK touto fosforylací je velmi důležitá pro udržení koloběhu buněčného cyklu a slouží k zastavení buněčného cyklu v odpovědi na kontrolní body (Donzelli a Draetta, 2003).

Struktura CDK2 v komplexu s cyklinem a rozdíly mezi monomerní CDK2 a komplexem CDK2/Cyc byly objasněny v roce 1995 kolektivem Philipa D. Jeffreyho (Jeffrey *et al.*, 1995) díky analýze krystalů komplexu CDK2/CycA. Tím byly potvrzeny předchozí předpoklady o indukovaných strukturních změnách po vazbě cyklinové podjednotky a vysvětlen mechanismus aktivace kinasy.

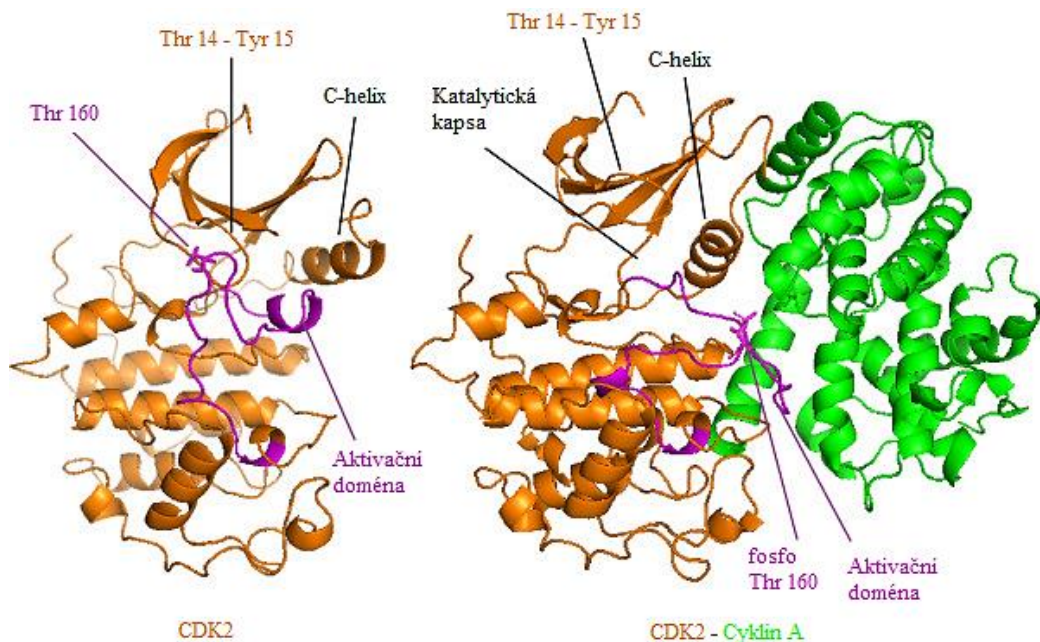
2.2.1 Aktivace cyklin-dependentní kinasy 2 vazbou cyklinu A

Již před objasněním struktury komplexu CDK2/CycA bylo *in vitro* zjištěno, že vazbou cyklinové podjednotky k CDK2 dochází k zisku částečné katalytické aktivity a následná fosforylace Thr 160 katalyzovaná CAK vede k plné aktivitě. Následně bylo také zjištěno, že vazba cyklinu moduluje substrátovou specifitu dané kinasy (Fisher a Morgan, 1994).

Cykliny jsou proteiny o relativní molekulové hmotnosti 30 kDa – 45 kDa, sdílející homologní úsek asi 100 aminokyselin s 30 - 50% shodou mezi cykliny A, B, D a E, nazývaný jako cyklinový box (Pines, 1994). Pro krystalizaci a stanovení první známé struktury byl pro snížení agregace použit fragment cyklinu A zahrnující residua 173-432, tedy základní sekvenci společnou pro celou celou cyklinovou rodinu, se

stejnými vazebnými a aktivačními vlastnostmi, jako má cyklin A v celé délce (Jeffrey *et al.*, 1995).

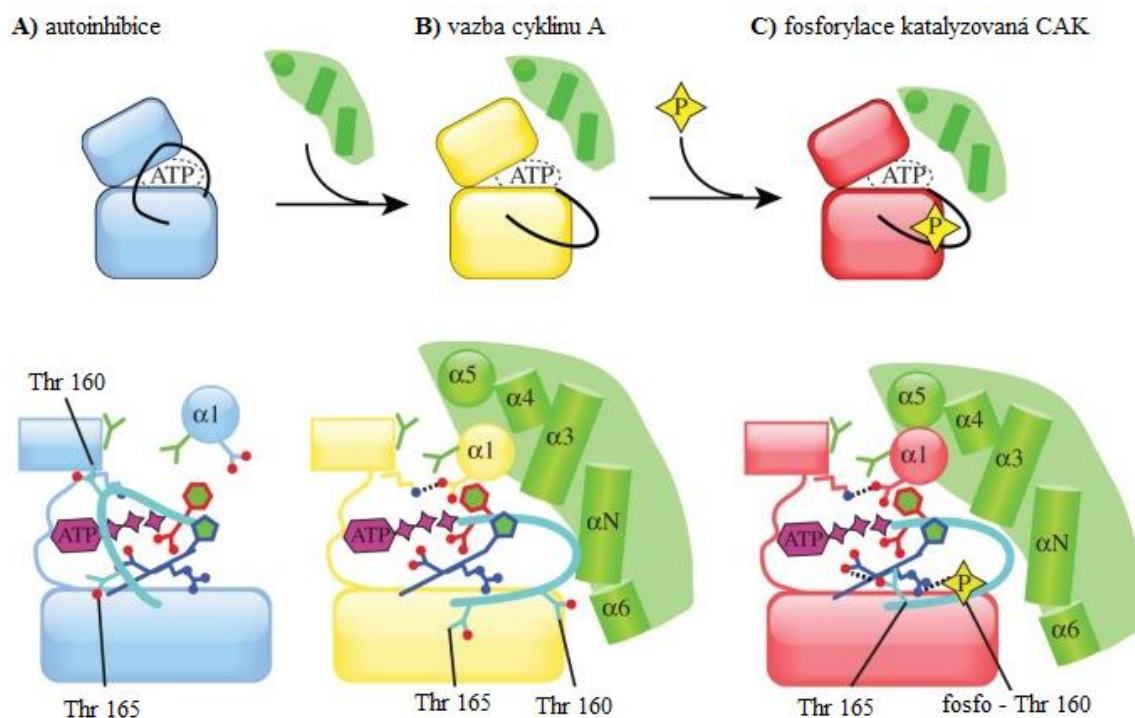
Cyklin A je tvořen dvěma helikálními doménami, se shodným uspořádáním řetězců, tzv. strukturální repeticí. Obě domény tvořící molekulu, jsou reprezentovány sekvencemi o 90 aminokyselinách, které mají shodné prostorové uspořádání a obě jsou složeny ze svazku tří pravotočivých α -helixů a dvou dalších α -helixů, orientovaných zrcadlově proti druhé, shodné doméně. Tato velmi podobná struktura obou domén, kde 78 z 90 Ca atomů má stejnou pozici nebyla předpokládána, vzhledem k pouze 12% shodě v sekvenci. Zmíněné domény jsou spojeny spojkou tvořenou 5 aminokyselinami a uspořádané těsně k sobě, kde v místě styku jsou uzavřeny tři nedostupné molekuly vody. Celá struktura cyklinu je dotvořena jedním N-terminálním helixem a prodlouženým C-koncem. Strukturální motiv 5 helixů ve dvou opakováních je společný i pro ostatní členy cyklinové rodiny, ve kterých jsou, podobně jako u cyklinu A, pozorovány velké úhly svírané mezi helixy, způsobené krátkými interhelikálními vzdálenostmi. N-terminální doména cyklinu A je shodná s tzv. cyklinovým boxem (konkrétně residua 209-310) a je klíčovým motivem interagujícím s CDK2 (Jeffrey *et al.*, 1995)



Obr. 4 Trojrozměrná struktura monomerní CDK2 (vlevo) a komplexu CDK2/CycA (vpravo). Ve struktuře monomerní CDK2 (souřadnice z PDB pod kódem 1HCL) je aktivační doména (fialově) blízko C-helixu a aktivní místo nedostupné. Naopak ve struktuře komplexu s cyklinem A (zeleně) (souřadnice z PDB pod kódem 1JST) je aktivační doména odtažena od C-helixu a tato konformace je stabilizována fosforylovaným Thr 160, aktivní místo je dostupné. Dále jsou vyznačeny inhibiční residua Thr 14 a Tyr 15 (převzato a upraveno z Malumbres, 2014).

Spojení CDK2 a cyklinu A je tvořeno řadou propletených strukturních motivů obou proteinů zahrnující právě C-helix s PSTAIRE sekvencí, T-smyčku a části N-terminálního β -skládaného listu a C-terminálního laloku na straně CDK2 a helixy $\alpha 3 - \alpha 5$ spolu s N-terminálním helixem na straně cyklinu. Ačkoli hustota postranních řetězců v místě kontaktu není jednotná (nejvyšší je okolo C-helixu a nejnižší v místě kontaktu koncových laloků), interakce proteinů tvoří rozsáhlou nepřístupnou styčnou plochu o obsahu 3550 \AA^2 . Cyklinový box svírá a obklopuje střední část C-helixu, kde $\alpha 5$ helix cyklinu A leží paralelně k C-helixu na jedné straně a $\alpha 3$ helix přidrží C-helix z druhé strany kolmo. V této části se vyskytují především hydrofobní interakce, obzvláště Ile 49 CDK2 těsně zapadá do hydrofobní kapsy tvořené alifatickými residui cyklinu A. Přesná sekvence ve střední části C-helixu koreluje s preferencí cyklinu k jednotlivým CDK. Dalším hlavním vazebným cílem cyklinu A je tzv. T-smyčka (residua 146-166), u monomerní CDK2 blokuje vstup do katalytické kapsy. Smyčka interaguje s helixy $\alpha 1 - \alpha 3$ a s N-terminálním helixem domény cyklinu A, jeho vazba zde vyvolává rozsáhlé konformační změny. Posledními místy interakce jsou N-terminální β -skládaný list CDK2 a $\alpha 5$ helix cyklinu. Přestože poslední zmíněné interakce nejsou tak rozsáhlé, jako interakce v okolí C-helixu a T-smyčky, efektivně odpuzují molekuly rozpouštědla, čímž zvětšují nedostupnou plochu a stabilizují komplex (Jeffrey *et al.*, 1995) (Obr. 4).

Vazbou cyklinu A na CDK2 dochází k rozsáhlým konformačním změnám C-helixu a T-smyčky CDK2 a vzájemné orientace N- a C- laloku. Po vazbě cyklinu dochází v C-helixu obsahující sekvenci PSTAIRE k tvorbě rozsáhlých vodíkových interakcí. Ty vyvolávají změny spojené s přesunem helixu do katalytické kapsy, směrem k ATP, a jeho rotaci o 90° okolo své osy. U monomerní CDK2 je C- helix umístěn očividně tak, aby umožnil i související změny vzájemného uspořádání laloků, které je volné, avšak po vazbě cyklinu je protein sbalen o mnoho těsněji díky intenzivní tvorbě nových interakcí (De Bondt *et al.*, 1993) (Obr. 4). Na základě změn dochází k dalšímu přeskupování, přičemž mnohá residua dříve směřující své postranní řetězce do roztoku se přeorientují a tvoří vazby uvnitř komplexu.

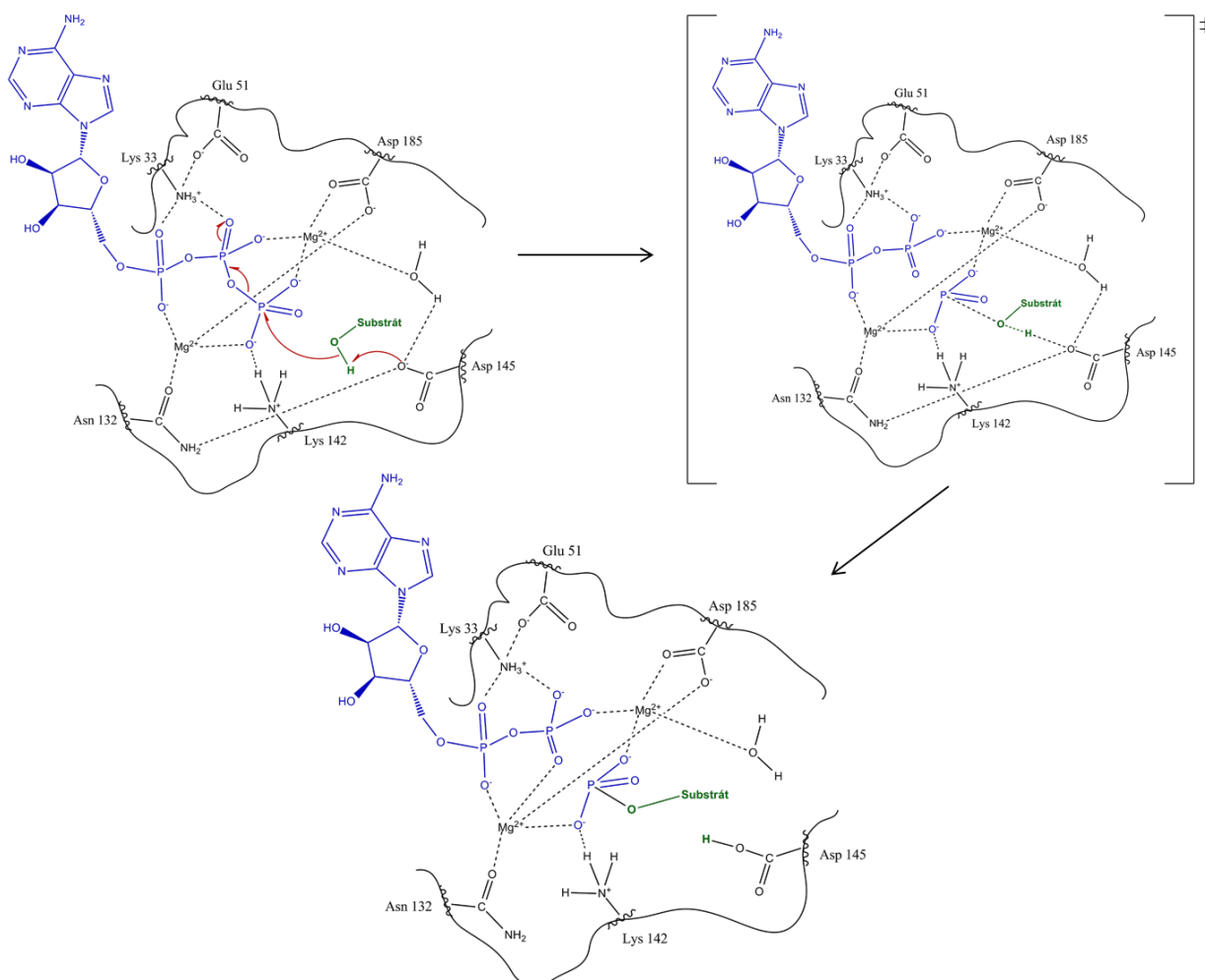


Obr. 5 Schéma aktivace CDK2 a změn v okolí aktivního místa. A) neaktivní CDK2 ve stavu tzv. autoinhibice (souřadnice z PDB struktury 1HCK). B) po vazbě cyklinu A dochází ke strukturálním změnám a zisku částečné aktivity, uvolněním aktivního místa (souřadnice z PDB struktury 1FIN). C) fosforylovaný komplex CDK2/CycA. (souřadnice z PDB struktury 1JST) vykazující plnou aktivitu (převzato a upraveno z Bayliss *et al.*, 2012).

V místě T-smyčky dochází také k rozsáhlým změnám, kde vlivem rozpletení $\alpha L12$ helixu vzniká reverzní očka (residua 146-149) následovaná β -skládaným listem, což umožňuje C-helixu pohyb a přesun blíže do aktivního místa. V konečném důsledku vedou konformační změny k odsunutí T-smyčky ze vstupu do aktivního místa (poziční posuny residuí T-smyčky dosahují až k rozdílu o 21 Å), dále ke změně orientace postranního řetězce Glu 51 ze směru do roztoku směrem přímo do aktivního místa a nakonec ke zpřístupnění Thr 160 do roztoku. Postranní řetězec Glu 51 patří spolu s Lys 33 a Asp 145 do triády katalytických residuí, jež je konzervovaná u všech eukaryotních kinas a zapojená do orientace fosfátů ATP a koordinace Mg^{2+} . Absence Glu 51 v aktivním místě u monomerní kinasy dále vysvětluje její neaktivitu. Zpřístupnění Thr 160 pro roztok je následováno fosforylací katalyzovanou CAK, která zajišťuje stabilizaci konformace komplexu CDK2/CycA a vazbě fosfo-Thr 160 do kationtové kapsy tvořené řetězcí Arg 50, Arg 126 a Arg 150, čímž komplex dosahuje maximální katalytické kinasové aktivity (Jeffrey *et al.*, 1995) (Obr. 5).

2.2.2 Kinasová reakce

Mechanismus kinasové reakce byl navržen a následně potvrzen v následujícím znění: Hlavní báze katalytické smyčky, u CDK2 Asp 145, deprotonizuje hydroxylovou skupinu serinu (nebo threoninu) na proteinovém substrátu, katalyzujíc nukleofilní atak hydroxylové skupiny na γ -fosfát ATP. Další postranní řetězce residuí v aktivním místě (především Glu 51, Lys 33 a Lys 142) vytvářejí vodíkové interakce s fosfáty ATP, které je udržují v příznivé konformaci (Obr. 6). Aby mohl proběhnout přenos fosfátu, musí být γ -fosfát ATP srovnaný v jedné linii se serinovým hydroxylem substrátu, což bylo již dříve sledováno u aktivní cAMP-dependentní proteinkinasy (Jeffrey *et al.*, 1995). Naopak u neaktivního komplexu CDK2-ATP-Mg²⁺ byla pozice fosfátů ATP téměř kolmá (De Bond *et al.*, 1993), vzhledem k pozici u aktivní kinasy, což znemožňovalo vstup serinového hydroxylu a přenos fosfátu, a tak byla vysvětlena absence kinasové aktivity monomerní CDK2.



Obr. 6 Schéma kinasové reakce (přenosu fosfátu) a aktivního centra CDK2

CDK2, tak jako ostatní CDK, vykazuje preferenci vůči specifickým místům pro fosforylaci na peptidovém substrátu. Silná preference byla popsána pro substráty, které hned vedle fosforylovatelného residua (S/T) obsahují prolin. Tato preference pramení z přítomnosti hydrofobní kapsy blízko katalytickému centru, do kterého přesně zapadne postranní řetězec prolinu (Songyang *et al.*, 1994). CDK2 dále vykazuje preferenci vůči substrátům, které obsahují bazické residuum v pozici S/T + 3, z důvodu interakce s cyklinovým residuem Ile 270 u cyklinu A (Brown *et al.*, 1999). Stejná preference byla zjištěna u všech CDK spojených s buněčným cyklem, avšak komplexy CDK1 jsou schopny tolerovat i jiná residua a transkripční CDK tuto preferenci postrádají úplně (Brown *et al.*, 2007).

2.3 Nové poznatky o struktuře a regulaci cyklin-dependentních kinas

Poslední získaná strukturní data ukazují, že v kontextu formace komplexu s cyklinem, aktivace a maximální katalytické aktivity je velice důležitá plasticita, jež CDK vykazují, na rozdíl od rigidní cyklinové podjednotky (Echalier *et al.*, 2010). I přes vysoce konzervovanou sekvenci a strukturu kinasové domény byly nalezeny zásadní rozdíly mezi jednotlivými CDK a to především mezi rodinou CDK spojenou s buněčným cyklem a rodinou zapojenou do regulace transkripce.

2.3.1 Interakce kinasové a cyklinové podjednotky

Markantní rozdíly byly nalezeny např. ve styčných plochách mezi CDK a cyklinem. Největší styčnou plochu vykazuje komplex CDK2/CycA nebo CDK2/CycE, kde dochází k interakci na obou lalocích kinasové domény, zatímco např. u komplexu CDK9/CycT dochází k redukci na asi 60% plochy CDK2/CycA a interakce je v tomto případě lokalizovaná pouze v N-terminálním laloku CDK. Klíčová část residuí zapojených do této interakce se u CDK nachází před a v rámci tzv. C-helixu, a i přes rozdíly v rozsahu interakce cyklinů s CDK dochází tvorbou komplexu k dosažení signifikantní katalytické aktivity (Honda *et al.*, 2005). Výjimku zde tvoří CDK4, u níž po vazbě partnerského cyklinu D k aktivaci nedochází, což narušuje celkový model aktivace CDK, vypracovaný na základě strukturních analýz komplexů s CDK2. Pro plnou aktivaci CDK4 v komplexu s cykliny je nejdříve zapotřebí fosforylace CDK4 na aktivačním residuu Thr 172 (Colleoni *et al.*, 2017).

2.3.2 Regulace aktivity fosforylací

Fosforylace aktivační smyčky je dalším rozdílným znakem, přičemž CDK spojené s buněčným cyklem vyžadují fosforylaci aktivačního residua, která vede k dosažení aktivní konformace a její stabilizaci. U transkripčních CDK se však role aktivační smyčky různí, např. u CDK9/CycT dochází k auto-fosforylaci na několika místech, včetně aktivačního residua a následné stabilizaci aktivní konformace, ale ne tak silně jako u CDK2/CycA (Echalier *et al.*, 2010).

Naopak fosforylace ve smyčce bohaté na glycin vede zpravidla k inhibici CDK, způsobené znepřístupněním aktivního místa (Welbum *et al.*, 2007). Výjimkou z tohoto pravidla je fosforylace neuronální CDK5 na residuu Tyr 15 (katalyzovaná Abl tyrosin kinasou). Tato fosforylace vede k zisku katalytické aktivity, což bylo vysvětleno pomocí struktury komplexu CDK5 s vazebným partnerem p25, kde je fosforylovaný Tyr 15 ideálním residuem pro interakci s bazickým residuem peptidového substrátu a může být zapojen do rozeznávání substrátu velmi podobně jako je to u fosforylovaného Thr 160 CDK2 (Mapelli *et al.*, 2005).

2.3.3 Inhibice cyklin-dependentních kinas

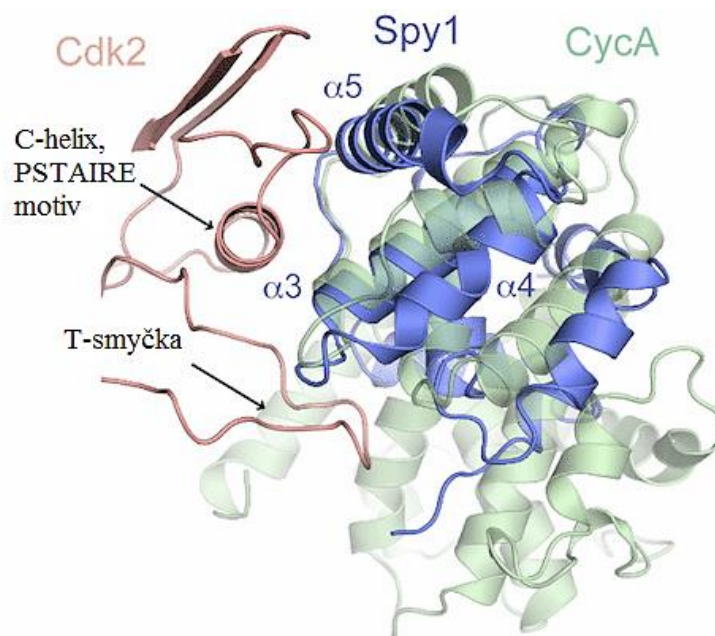
Proteiny p21 a p27, které jsou zařazeny do rodiny Cip/Kip kinasových inhibitorů, způsobují vazbou na CDK spojené s buněčným cyklem inhibici aktivity. Konkrétně p27 využívá vazebné místo pro ATP a cyklinové rozpoznávací místo pro substrát k vazbě na komplex CDK2/CycA (Russo *et al.*, 1996). Po vazbě způsobuje inhibici prostřednictvím vnoření svého Tyr 88 do aktivního místa a jeho následné deformace, zabraňujíc vazbě ATP (James *et al.*, 2008). Zajímavým faktem a výjimkou je, že proteiny p21 a 27 mohou pozitivně i negativně ovlivňovat aktivitu komplexů CDK4, na základě stechiometrie jejich vazby ke komplexům CDK4 a míře jejich fosforylace, což jsou další, nově objevené mechanismy regulace CDK (Day *et al.*, 2009).

Zatímco princip inhibice aktivity CDK2 vazbou p27 je znám už delší dobu, poměrně nedávno bylo zjištěno, že po fosforylaci některých tyrosinových residuí p27 dochází k obnovení kinasové aktivity. Po fosforylaci Tyr 88 (katalyzované např. Abl kinasou) dochází k rozpadu β -skládaného listu tvořeného kontaktem β -vláken CDK2 a p27. Po přeskupení p27 jsou obnoveny styčné plochy CDK2/CycA a konformace G-smyčky do podoby aktivního komplexu, kde je pozice ATP příznivá pro přenos fosfátu (Rath a Senapati, 2016).

2.3.4 Aktivace cyklin dependentní kinasy 2 obcházející kanonický model

Dalšími nově prozkoumanými regulátory aktivity CDK2 jsou tzv. Speedy proteiny, konkrétně Speedy protein A (Spy1). Tento protein reguluje průchod G1/S fází buněčného cyklu (aktivací CDK1 a CDK2), přežití buněk po poškození DNA a je zásadní při mitose, jak u spermie, tak u vajíčka (Porter *et al.*, 2003). Expres nedegradovatelných forem proteinu Spy1 může vést k proliferaci buněk a tumorogenezi. Na základě strukturní analýzy byl objasněn mechanismus, kterým Spy1 uděluje resistenci vůči klasickým kontrolním regulačním mechanismům buněčného cyklu.

Po vazbě Spy1 na CDK2 dochází k velmi podobným strukturním změnám jako po vazbě cyklinu a fosforylaci aktivační smyčky, kterým se však CDK2 takto vyhne (Obr. 7). Spy1 postrádá vazebné místo, kterým disponuje cyklin A, jež zprostředkovává vazbu p27 a substrátovou specifitu. Tím je vysvětlena jen velmi slabá inhibice CDK2/Spy1 proteinem p27 a absence specifity k substrátu s cyklin-vazebnou sekvencí. Pomocí struktur byly identifikovány mutace odstraňující schopnost Spy1 aktivovat CDK2 a také mechanismy použitelné pro cílené ovlivnění Spy1 (McGrath *et al.*, 2017).



Obr. 7 Porovnání vazby CycA a Spy 1 vytvořené překrytím struktur kinasové domény CDK2 v komplexu s CycA (přístupový kód v PDB 1FIN) a se Spy 1 (kód v PDB 5UQ2). Spy 1 je tvořen pouze jedním opakováním, oproti dvěma opakováním v cyklinu A, avšak helixy Spy 1 které vytvářejí kontakt s CDK2 mají stejnou orientaci jako v cyklinu A. T-smyčka je v obou případech odsunutá a komplex je aktivní (převzato a upraveno z McGrath *et al.*, 2017).

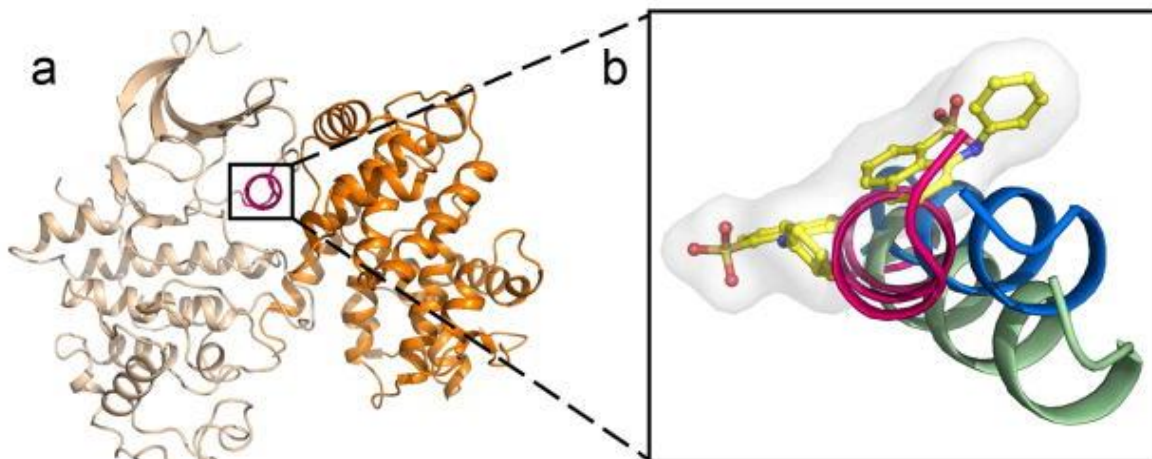
2.3.5 Další regulační místa v molekule cyklin dependentní kinasy 2

Zatím byla v molekule CDK2 popsána čtyři vazebná regulační místa, a to velmi detailně prozkoumané ATP-vazebné místo (vazebné místo I), dále dvě nekompetitivní vazebná místa (místa II a III) a allosterické vazebné místo (místo IV) (Li *et al.*, 2015).

Kompetitivní vazebné místo pro ATP je umístěno hluboko na spojnici N- a C-terminální domény CDK2 a obsahuje nezbytná katalytická residua. (De Bond *et al.*, 1993). Toto místo má tendenci vázat vysoce polární nebo nabitě heterocyklické molekuly inhibující CDK2 kompeticí s ATP. Byly zjištěny tři vazebné módy inhibitorů do tohoto místa, reprezentované strukturními motivy Roskovitinu, Flavopiridolu a 4-anilinochinazolinu (Huang *et al.*, 2010). Avšak vzhledem k vysoké míře konzervace v této oblasti jsou mnohé inhibitory velmi účinné, avšak málo selektivní. Výjimkou jsou zatím inhibitory CDK4/6 vykazující signifikantní selektivitu, a to Palbociclib a Abemaciclib, které jsou (zatím jako jediní zástupci CDK inhibitorů) schváleny jako léčiva. Selektivita vůči těmto kinasám je způsobena přítomností histidinového residua (His 95 u CDK4 a His 100 u CDK6) nesoucího náboj a umožňujícího tvorbu vodíkové vazby, na rozdíl od Phe 81 v ekvivalentní pozici u CDK2 (Shafiq *et al.*, 2012). Co se týče specifické inhibice CDK2, byl zatím popsán jako nejvíce specifický (i přes ovlivnění dalších tří enzymových cílů) inhibitor NU6300. Jedná se však o ireverzibilní inhibitor, tvořící kovalentní vazbu s ϵ -aminoskupinou Lys 89 v CDK2. Konkrétně je to první popsáný kovalentní inhibitor CDK2, ilustrující potenciál strukturně cílených ireverzibilních inhibitorů, jako účinných a selektivních látek (Anscombe *et al.*, 2015).

V molekule CDK2 byly objeveny další dvě vazebná místa (II a III), která nejsou spojena s katalytickou kapsou, proto jsou označována jako nekompetitivní místa. O vazebném místě II jsou informace zatím omezené a vazebná afinita neznámá. Naopak u vazebného místa III bylo zjištěno, že interaguje s krátkými peptidy jako TAALS, FAALS, LAALS, jež částečně separují CDK2 od cyklinu A/E, čímž snižují kinasovou aktivitu. Aminokyselinové složení vazebného místa III není mezi CDK silně konzervováno, proto by mohlo být lepším cílem pro specifické inhibitory CDK2 a dalších kinas.

Poslední, allosterické regulační místo bylo objeveno při interakci CDK2 s 8-anilino-1-naftalensulfonovou kyselinou (ANS), proto bylo pojmenováno ANS-vazebné místo. Nachází se mezi ATP-vazebným místem a C-helixem, v objasněné struktuře obsahuje dvě molekuly ANS vedle sebe (Betzi *et al.*, 2011).



Obr. 8 Celková struktura komplexu CDK2/CycA (kód v PDB 2CCI), CDK2 je zobrazena béžově, C-helix fialově a cyklin A oranžově (a). Superpozice zobrazující různé konformace C-helixu: zeleně v komplexu CDK2 s ANS (vazba do alosterického místa), fialově v komplexu CDK2 s cyklinem A a modře v monomerní CDK2 (b) (převzato z Betzi *et al.*, 2011).

Vazba je doprovázena strukturními změnami vedoucími ke změně konformace C-helixu a jeho inkompatibilitě pro vazbu s cyklinem (Obr. 8). Avšak jelikož konkrétně ANS má vazebnou afinitu mnohem nižší než cyklin, po interakci s cyklinem A je vytěsněna. Pokud bude nalezen inhibitor s vysokou afinitou vázající se do toho místa, mohl by být silným, specifickým inhibitorem CDK (Li *et al.*, 2015).

2.4 Stav struktur cyklin-dependentních kinas v proteinové databance (PDB)

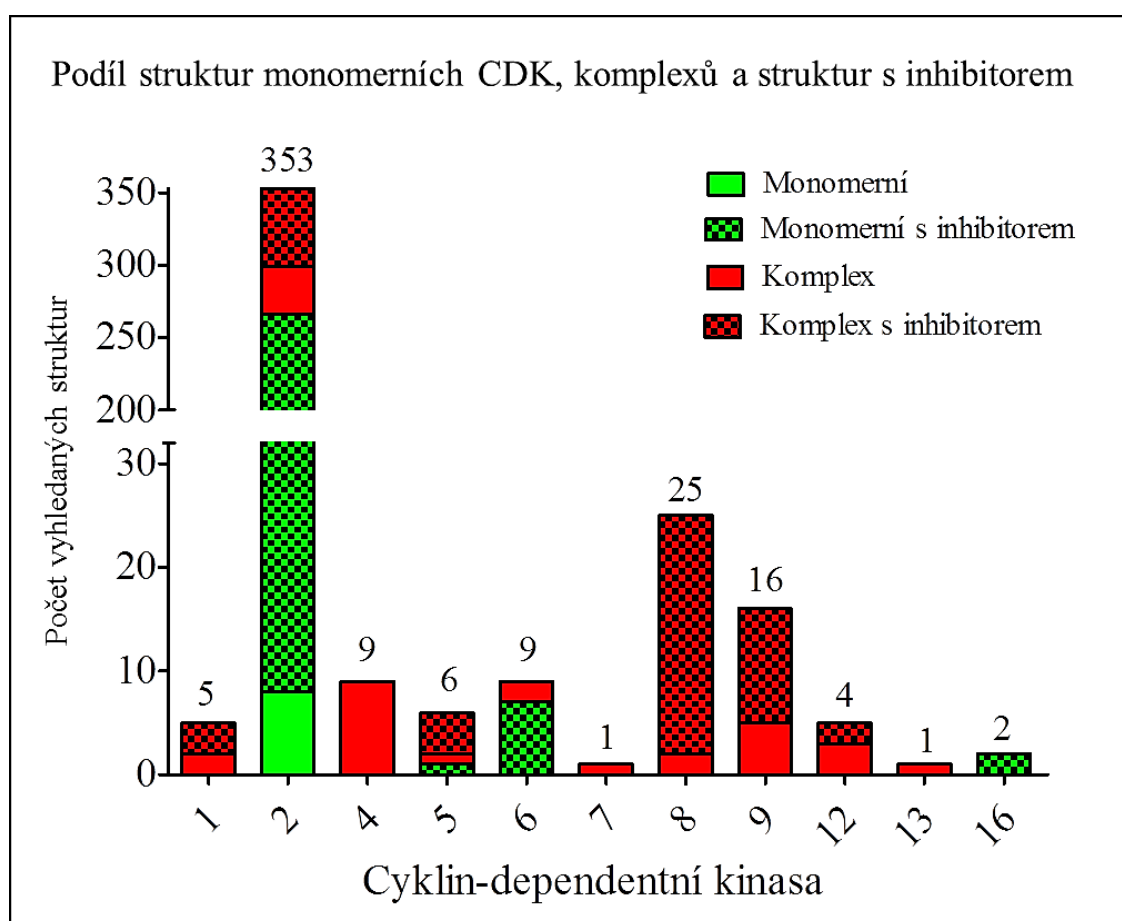
Ke dni 1. 3. 2018 bylo v proteinové databance Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB; dostupná na stránce <http://www.rcsb.org/pdb/>) nalezeno 470 trojrozměrných struktur obsahujících lidskou CDK. Z toho 38 struktur obsahovalo i proteiny jiných organismů, např. myši a tura, nebo virů herpes či HIV. Tyto struktury nebyly zahrnuty do rešerše, a proto nejsou zahrnuty v grafech zobrazujících počty struktur. Celkem bylo prozkoumáno 432 struktur lidských CDK samotných nebo v komplexech s dalšími lidskými proteiny.

Jelikož první objasněnou strukturou CDK byla struktura monomerní CDK2 a právě její analýza má velkou tradici, největší počet vyhledání v PDB vykazují struktury CDK2. Další nejvíce zastoupené jsou CDK8 a CDK9, naopak struktury CDK3, CDK10-11, CDK14-15 a CDK17-20 nebyly dosud objasněny (Obr. 9).

Při studiu známých struktur CDK byly tyto rozděleny na monomerní CDK a komplexy s jinými proteiny, obsahující alespoň jednoho jiného vazebného partnera,

dále byla studována přítomnost navázaného inhibitoru. U některých CDK jsou totiž známy pouze struktury monomerní kinasy, u jiných jsou známy i komplexy (s cykliny nebo dalšími vazebnými partnery). U většiny kinas je známa i struktura s inhibítoem, v počtu struktur s inhibítoem je opět na prvním místě CDK2 (Obr 9.).

Ze všech známých struktur CDK byly následně vybrány reprezentativní a především jedinečné struktury. A to tak, aby byl nastíněn charakter objasněných struktur. U jednotlivých CDK byly vybrány struktury, které se od ostatních lišily fosforylací aktivačního residua, vazebným partnerem, přítomností jedinečného ligandu nebo inhibitoru. Ze struktur, jejichž charakteristiky se shodovaly, byly poté vybrány struktury s nejlepším rozlišením. Na ukázkou byly charakteristiky reprezentativních struktur známých CDK byly zpracovány ve formě tabulky (Tab. 1).



Obr. 9 Počet struktur monomerních lidských CDK, komplexů s alespoň jedním vazebným proteinem a struktur obsahujících navázaný inhibitor uložených v PDB ke dni 1. 3. 2018. Nad sloupci jsou uvedeny celkové počty známých struktur jednotlivých CDK.

Tab. 1 Výběr reprezentativních struktur CDK a jejich charakteristiky z databáze PDB.

CDK1						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,6	ne	CKS1			4YC6	Brown <i>et al.</i> , 2015
2,06	ne	CKS2	Cyklin B2	NU6102	5LQF	Coxon <i>et al.</i> , 2017
CDK2						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
1,9	ne			ATP	1HCK	Schulze-Gahmen <i>et al.</i> , 1996
2,3	ne	Cyklin A		ATP	1FIN	Jeffrey <i>et al.</i> , 1995
2,3	ano	Cyklin A	p27 (Kip1)		1JSU	Russo <i>et al.</i> , 1996
2,15	ano	Cyklin E1			1W98	Honda <i>et al.</i> , 2005
1,96	ne			pyrazolo-pyrimidinový	3PJ8	Jorda <i>et al.</i> , 2011
2,7	ne	Spy1			5UQ2	McGrath <i>et al.</i> , 2017
1,3	ne			purin-pyridinový	5MHQ	Whittaker <i>et al.</i> , 2017
CDK4						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,3	ano	Cyklin D1			2W96	Day <i>et al.</i> , 2009
3,0	ne	Cyklin D3			3G33	Takaki <i>et al.</i> , 2009
3,9	ne	HSP90	CDC37	ATP	5FWK	Verba <i>et al.</i> , 2016
CDK5						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,65	ne	p 25			1H4L	Tarricone <i>et al.</i> , 2001
1,95	ne	p 25		3O0 (thiazolový)	3OOG	Ahn <i>et al.</i> , 2005
1,9	ne			Z3R (benzothiazol-thiofenový)	4AU8	Malmstrom <i>et al.</i> , 2012
CDK6						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
3,4	ne	p 16 ^{INK4A}			1BI7	Russo <i>et al.</i> , 1998
2,8	ne	p 19 ^{INK4D}			1BI8	Russo <i>et al.</i> , 1998
2,31	ne			benzimidazol-pyrrolový	4AUA	Cho <i>et al.</i> , 2012
2,27	ne			Abemaciclib	5L2S	Chen <i>et al.</i> , 2016

Tab. 1 Výběr reprezentativních struktur CDK a jejich charakteristiky z databáze PDB (pokračování).

CDK7						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
3,02	ano			ATP	1UA2	Lolli et al., 2004
CDK8						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,2	ne	Cyklin C			3RGF	Schneider et al., 2011
2,1	ne	Cyklin C		pyrazol- močovinový	4F6U	Schneider et al., 2013
2,18	ne	Cyklin C		pyrrolidin- imidazolový	5ICP	Czodorowski et al., 2016
2,04	ne	Cyklin C		pyridyl-pyrrolový	5XS2	Han et al., 2018
CDK9						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,8	ano	Cyklin T1		Flavopiridol	3BLR	Baumli et al., 2008
2,9	ano	Cyklin T1		ATP	3BLQ	Baumli et al., 2008
2,94	ano	Cyklin T1	AFF4	AMP	4IMY	Schulze-Gahmen et al., 2013
CDK12						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,2	ano	Cyklin K		ADP-AIF ₃	4NST	Bosken et al., 2014
3,15	ano	Cyklin K			4UNO	Dixon-Clarke et al., 2015
2,7	ano	Cyklin K		indol-pyrimidin- piperidinový	5ACB	Zhang et al., 2016
3,06	ano	Cyklin K		purin- piperidinový	6B3E	Johannes et al., 2017
CDK 13						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,0	ano	Cyklin K		ADP-AIF ₃	5EFQ	Greifenberg et al., 2016
CDK 16						
Rozlišení (Å)	Fosforylace akt. residua	Vazebný partner 1	Vazebný partner 2	Ligand/ Inhibitor	PDB kód	Reference
2,4	ne			Indirubin	3MTL	Dixon-Clarke et al., 2017
2,2	ne			pyrazol- pyridinový	5G6V	Dixon-Clarke et al., 2017

2.5 Přístupy vedoucí ke stanovení struktury proteinu

Pro objasnění trojrozměrné struktury analyzovaného proteinu je v první řadě potřeba získat dostatečné množství proteinu. Po získání velkého množství proteinu jsou používány biotechnologie a technologie exprese rekombinantních proteinů v hostitelských organismech. Rekombinantní proteiny jsou definovány jako proteiny vytvořené na základě rekombinantní DNA, což je taková DNA, která byla vytvořena úpravou a spojením genových úseků z různých organismů. Tato DNA musí být schopna replikace v hostitelské buňce, popř. může být inkorporována do chromosomu buňky. Cílový rekombinantní protein je tvořen stejným mechanismem jako protein buňce vlastní, tedy pomocí proteosyntetického aparátu, na ribosomech. Cílový protein je nakonec z hostitelských buněk izolován a přečišťován. Při srovnání rekombinantní technologie s izolací proteinů z buněk přirozeného výskytu převyšují pozitiva rekombinantní exprese mnohonásobně nad drobnými negativy.

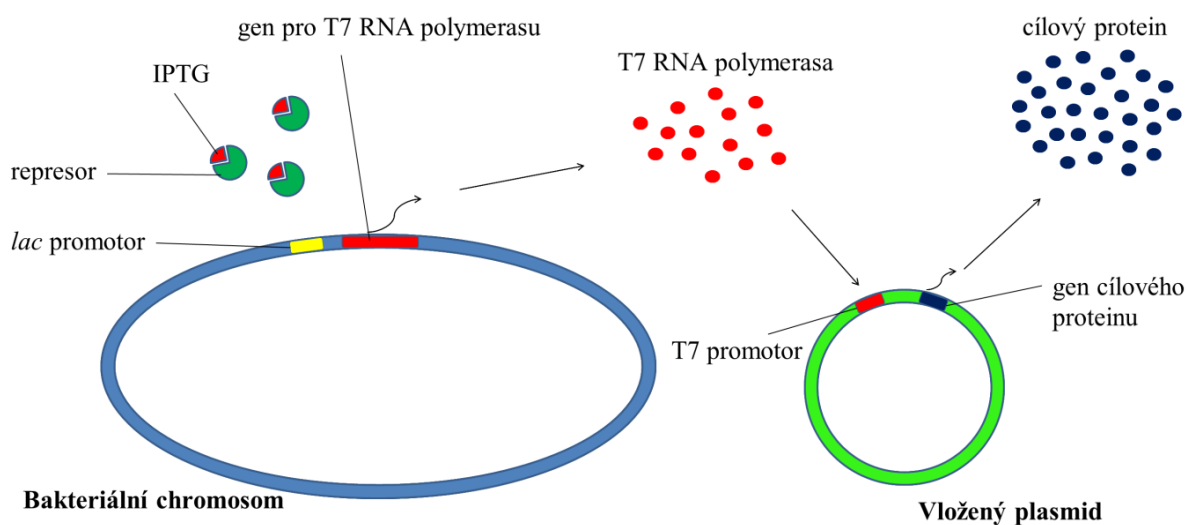
Na rozdíl od technologicky i časově velmi náročné izolace z přirozených zdrojů (s nutností velkého množství vstupního materiálu a s rizikem infekce), je díky snadné kultivaci buněk expresních organismů a možnosti přidání proteinové značky pro purifikaci možné získat jednoduchým, maximálně dvou-krokovým postupem velké množství proteinu o vysoké čistotě. Jediným limitem exprese v hostitelských buňkách jsou posttranslační modifikace, přičemž např. u lidských nebo živočišných proteinů je nutno post-translačně např. glykosylovat cílový protein. V takovém případě nemůže být použita exprese v bakteriálních buňkách, avšak existuje alternativa v možnosti exprese v kvasinkách, hmyzích nebo savčích buňkách, disponujících eukaryotickým post-translačním aparátem (Yin *et al.*, 2007)

Co se týče známých struktur komplexů lidských CDK z databáze PDB, ze 432 objasněných struktur (ke dni 1. 3. 2018) byl u 218 struktur připraven protein ve hmyzích buňkách (z nich u 194 v buňkách *Spodoptera frugiperda* a u 24 v buňkách *Trichopulsia ni*), u 188 struktur v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* a u 26 struktur byly proteiny připraveny jak v hmyzích, tak v bakteriálních buňkách. Možnost exprese CDK a cyklinů v bakteriálních buňkách pramení z jejich lokalizace, jsou to intracelulární proteiny, které není nutné post-translačně modifikovat, pouze v případě fosforylace za účelem dosažení plné katalytické aktivity, kterou zajišťuje ko-exprimovaná CAK. Z tohoto důvodu se popis expresních systémů věnuje právě bakteriálním a hmyzím buňkám.

2.5.1 Expresní systémy

Prvním syntetizovaným funkčním peptidem za pomoci exprese v hostitelském systému byl lidský somatostatin, savčí peptid tvořený 14 aminokyselinami, jenž byl vytvořen v bakteriálních buňkách *Escherichia coli*. DNA sekvence genu pro somatostatin byla chemicky syntetizována a vložena do plasmidu pBR322 pod kontrolou laktosového promotoru (Itakura *et al.*, 1977). Následoval velmi rychlý a intenzivní rozvoj biotechnologií produkujících různé další lidské hormony, např. insulin, terapeutika atd.

Bakteriální expresní systémy jsou velmi často používány, jejich výhodou je především rychlá generační doba, možnost kultivace velkých objemů, poměrně malá finanční náročnost a jednoduché provedení. Nevýhodou bývá absence posttranslačních modifikací a nutnost optimalizace za účelem zisku rozpustného proteinu. Nejpoužívanějším bakteriálním systémem je *E. coli*, od které je odvozeno mnoho používaných kmenů, kompatibilních se širokým spektrem plasmidů, např. pET (Novagen), pGEX (GST Gene Fusion System) atd. Některé kmeny jsou uzpůsobeny expresi eukaryotických nebo cytotoxických proteinů, umožňující tvorbu disulfidových můstků v eukaryotních proteinech. Chromosom bakterie obsahuje *lac* promotor, za nímž je umístěn gen bakteriofága T7 pro RNA polymerasu. Při indukci exprese se používá isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), jenž se váže na represor *lac* promotoru, čímž spouští expresi virové T7 RNA polymerasy, která se váže na promotor vloženého plasmidu a umožňuje transkripci genu cílového proteinu (Yin *et al.*, 2007) (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma exprese rekombinantních proteinů (jejich geny jsou vloženy do bakteriálního expresního systému využívající T7 RNA polymerasu, jež pochází z bakteriofága λ).

Tab. 2 Srovnání bakteriálního, hmyzího a savčího expresního systému pro tvorbu rekombinantních proteinů (převzato a upraveno z Yin *et al.*, 2007).

Expresní systém	Rychlost nárůstu	Finanční náklady	Míra exprese	Poskládání proteinu	Post-translační modifikace
<i>E. coli</i> (bakterie)	Velmi rychlá	Nízké	Vysoká	Často nutné opravit	Chybí
<i>S. frugiperda</i> (hmyzí)	Pomalá	Vysoké	Nízká - vysoká	Většinou správné	Téměř jako savčí buňky
Savčí buňky	Pomalá	Vysoké	Nízká	Správné	Všechny

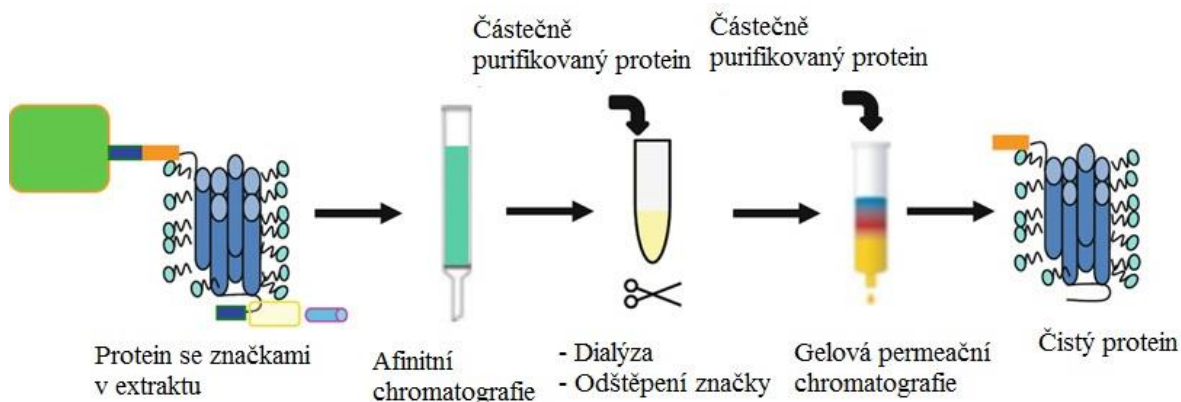
Hmyzí expresní systémy jsou spojeny s transfekcí bakuloviry, které vykazují vysokou specifitu ke hmyzím hostitelským buňkám, nemohou např. napadnout lidské buňky. V současné době jsou používány rekombinantní viry připravené na základě tzv. virů jaderné polyedrie, konkrétně viru jaderné polyedrie bource morušového nebo kovoletské kalifornského. Rekombinantní virová DNA s genem pro cílový protein je nejdříve připravena v *E. coli*, poté dochází k přechodné transfekci hostitelských buněk vnesením genu prostřednictvím bakuloviru. Hostitelskými buňkami jsou kultivované ovariální buňky motýlů *Spodoptera frugiperda* (kmeny Sf21 a Sf9) nebo *Trichopulsia ni*. Tento typ exprese je ve srovnání s bakteriální mnohem náročnější, navíc nedochází ke stabilní transfekci, tedy buňky jsou schopné jen dočasné produkce proteinu a pokaždé je nutno provádět novou transfekci. Naopak je tento systém vhodný pro proteiny vyšších eukaryot, díky svému post-translačnímu aparátu, který byl u speciálně vytvořeného kmene Mimic™ Sf9 vylepšen několika geny savčích glykosyltransferas, pro bezchybnou tvorbu savčích glykoproteinů (Jarvis, 1998). Zásadní rozdíly mezi hmyzími, bakteriálními a savčími buňkami používanými pro expresi proteinů shrnuje Tab. 2.

2.5.2 Purifikace rekombinantních proteinů

Po úspěšné expresi cílových proteinů v hostitelských buňkách je nutné získat dostatečně čistý protein, pro další účely analýzy. V případě bakteriálních a hmyzích buněk je nutné nejprve provést homogenizaci buněk, ať už fyzikálními, chemickými nebo enzymatickými metodami. Často je používána sonikace ultrazvukem, French press nebo různé typy homogenizátorů. Při tomto procesu je nutné efektivně udržovat nízkou teplotu, pro zamezení denaturaci a také je potřeba přidat inhibitory proteas, jež by mohly při homogenizaci hydrolyzovat cílový protein.

Následuje purifikace cílového proteinu, nejčastěji metodami chromatografickými (afinitní chromatografie, gelová permeační chromatografie či iontoměničová chromatografie), v prostředí vhodného pufru. Druh chromatografické metody použité pro purifikaci závisí na konstrukci rekombinantní DNA, kdy se k sekvenci genu pro cílový protein přidává sekvence purifikační značky, tzv. tagu, a v naprosté většině jsou tyto sekvence odděleny specifickou sekvencí rozpoznávanou endoproteasami, které jsou nakonec schopny značku odštěpit.

Purifikační značky rozeznáváme proteinové a peptidové, přičemž proteinové (např. glutathion-S-transferasa (GST) nebo maltosu-vázající protein (MBP) vzhledem ke své velikosti výrazně ovlivňují konformaci cílových proteinů a musí být odštěpeny, zatímco peptidové (His-tag, Strep-tag) mohou v některých případech na proteinu zůstat. Purifikační značky umožňují jednokrokovou či dvoukrokovou afinitní chromatografii prostřednictvím vazby na ligand imobilizovaný na matici (agarosa). Po navázání a propláchnutí cílového proteinu následuje jeho eluce, případné odštěpení značky a finální gelová permeační chromatografie (Obr. 11). Tyto metody umožňují poměrně jednoduše získat velké množství vysoce čistého proteinu, v případě enzymů použitelného pro studium katalyzovaných reakcí, nebo pro krystalizaci a následnou rentgenovou krystalografickou analýzu (Terpe, 2006).



Obr. 11 Schéma purifikace rekombinantního proteinu zahrnující afinitní chromatografii, odštěpení purifikační značky a gelovou permeační chromatografii (převzato a upraveno z Locatelli-Hoops a Yeliseev, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- 1- thioglycerol (MTG) ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- 2-merkptoethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol (Triton X-100) (Roche, Německo)
- adenosin-5'-trifosfát (ATP) ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- agar ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Mexiko)
- agarosa ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (AA) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- ampicilin ($\geq 99\%$, Serva, Německo)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- butanol ($\geq 99\%$, Lach-ner, ČR)
- dithiotreitol (DTT) (Roche, Německo)
- DNA barvivo: EZ-Vision® DNA dye (VWR, USA)
- DNA-standardní marker: 1 kb DNA marker (25 μg , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Central European Biosystems, ČR)
- DNA-standardní marker: Quick-Load® Purple (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, New England Biolabs, Velká Británie)
- dodecylsírán sodný (SDS) ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- ethanol (96%, Lach-ner, ČR)
- fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- glutathion-agarosa (GSH-agarosa) (Sigma-Aldrich, USA)
- glycin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- histon (kvalita substrátu proteinkinas, Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid sodný ($\geq 98\%$, Penta, ČR)
- chloramfenikol ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid hořečnatý (hexahydrát, $\geq 98\%$, Lach-Ner, ČR)
- chlorid sodný ($\geq 99\%$, Penta, ČR)
- inhibitor LGR4455

- inhibitory proteas bez EDTA: cOmplete™, EDTA free (Roche, Německo)
- isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Izrael)
- kvasničný extrakt (Yeast) (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES) (≥ 98%, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (≥ 98,5% Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA) (≥ 97%, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková (35%, Lach-ner, ČR)
- kyselina octová (99%, Lach-ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná (85%, Lach-ner, ČR)
- L-glutathion redukovaný (GSH) (≥ 98%, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (≥ 99%, Sigma-Aldrich, Čína)
- N,N'-metylenbisakrylamid (BIS) (≥ 98%, Sigma-Aldrich, Čína)
- peroxidisíran amonný (APS) (≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- radioaktivní [γ -³³P]ATP - 10,0 MBq (Hartmann, Německo)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (≥ 99% Serva, Německo)
- trypton (Sigma-Aldrich, Mexiko)

3.1.2 Biologický materiál

- CONTROLLER BL21(DE3) – chemicky kompetentní expresní kmen bakterií *E. coli* (40 μl, Sigma-Aldrich, USA)
- Rosetta™ 2 (DE3) pLysS - chemicky kompetentní expresní kmen bakterií *E. coli* (100 μl Novagen, Německo)
- TOP 10 - chemicky kompetentní expresní kmen bakterií *E. Coli* (50 μl, ThermoFisher, USA)
- Plasmidy: pGEX-6P-1 s inserty genů pro CDK2-GST, CAK a genem pro resistenci vůči ampicilinu a pET-21-D s insertem genu pro CycA a genem pro resistenci vůči ampicilinu získané od Dr. Daniel Fisher (IGMM, CNRS, Montpellier)
- DNAsa I (EC 3.1.21.1, 10 000 U, Roche, Německo)
- proteasa lidského viru rýmy (HRV-3C proteasa) (EC 3.4.22.28, 500 U, Novagen, Německo)
- fosfocelulosoový papír P-81 (Whatman, Velká Británie)

3.1.3 Roztoky

- CDK2-pufr: 40 mmol·l⁻¹ HEPES, 200 mmol·l⁻¹ NaCl, pH = 7,5, a před použitím přidání 0,02% MTG a 5 mmol·l⁻¹ DTT
- CycA-pufr: 50 mmol·l⁻¹ Tris, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, pH = 8,0
- Eluční pufr: 20 mmol·l⁻¹ glutathion v CDK2-pufu o upraveném pH = 7,5
- Tris-glycinový elektrodový pufr: 25 mmol·l⁻¹ Tris, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3
- SDS – vzorkovací pufr (5x): 3,1 ml 1 mol·l⁻¹ Tris, 5 ml glycerolu, 1 g SDS, 0,5 ml 2-merkaptoethanolu, 0,5 ml 1% bromfenolové modři, pH = 6,8
- Kinasový pufr (2x): 20 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 5 mmol·l⁻¹ EGTA, 20 mmol·l⁻¹ 2-glycerolfosfát, 2 mmol·l⁻¹ NaF, 0,1 mol·l⁻¹ HEPES
- TE pufr: 10 mmol·l⁻¹ Tris, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, pH = 7,4
- TAE pufr: 40 mmol·l⁻¹ Tris, 20 mmol·l⁻¹ kyselina octová, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, pH = 8
- LB médium – 0,5% kvasničný extrakt, 1% Trypton, 1% NaCl, pH = 7,0
- Krystalizační roztok č. 21 (10% polyethylenglykol (PEG) Mr 20000, 20% PEG Mr 550, 0.03 mol·l⁻¹ NaF, 0.03 mol·l⁻¹ NaBr, 0.03 mol·l⁻¹ NaI a 0.1 mol·l⁻¹ Bicin/Trizma pufr, pH 8.5 (kit Morpheus (Molecular Dimensions))
- Barvicí roztok InstantBlue™ Protein Stain (Expedeon, Velká Británie)

3.2 Přístrojové vybavení a příslušenství

- laminární box OS-N (Merci, Česká republika)
- centrifuga Thermo megafuge 16-R (ThermoFisher, USA)
- centrifuga ROTINA 420 / 420 R (HETTICH, Německo)
- minicentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- třepačka Biosan MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- kultivační třepačka Excella E24-R (New Brunswick Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- váhy ABT 120 - 5DM (Kern, Německo)
- biologický termostat BT 120 M (Labo-MS, ČR)
- autokláv MLS-3750 (Sanyo, Japonsko)

- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- souprava pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad, USA)
- souprava pro horizontální elektroforézu Mini electrophoresis (VWR, USA)
- autoradiografická deska, součást FLA 7000 (FUJIFILM, Japonsko)
- magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- pH metr pH 50 (XS instruments, Itálie)
- předvážky KERN-PCB (Kern, Německo)
- ultrazvukový sonikátor Sonoplus UW 2200 (Bandelin, Německo)
- lednice Liebherr 5413 prosklená (Liebherr, Německo)
- chromatografická kolona HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE, Velká Británie)
- chromatografický systém ÄKTA pure 25 L (G. E, Velká Británie)
- míchačka na 96-jamkovou destičku s termostatem ThermoMixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- kit pro purifikaci DNA: Plasmid DNA purification NucleoBond® PC 100 (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Německo)
- koncentrátoři pro ultrafiltraci Amicon® Ultra-15 10 kDa

Další běžné laboratorní příslušenství: automatické pipety (Eppendorf, Německo) se špičkami, kádinky, zkumavky, stříčky, stojan na zkumavky, mikrozukavky, stojan na mikrozukavky, odměrné válce, špachtle, centrifugační kyvety, Erlenmeyerovy baňky, mikrovlnná trouba, Petriho misky.

3.3 Metody

3.3.1 Transformace klonovacích bakterií, kultivace a izolace plasmidové DNA

Chemicky kompetentní klonovací bakterie *E. coli* (kmen TOP 10) byly transformovány metodou tepelného šoku. 100 μ l suspenze kompetentních bakteriálních buněk uchovávaných při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo rozmrazeno na ledu, následně bylo přidáno 100 ng jednoho z plasmidů. Po 10 minutách inkubace byl proveden teplotní šok, mikrozukavka s bakteriální suspenzí byla vložena do termobloku nahřátého na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 sekund. Poté byla mikrozukavka vložena na 2 minuty do ledu. K suspenzi bylo přidáno 500 μ l LB média předem zahřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, následovala regenerace

bakterií v kultivační třepačce při 210 otáčkách·min⁻¹ (RPM) a 37 °C po dobu 1 hodiny. Bakteriální suspenze byla následně napipetována na plotny 1% agaru v LB médiu, obsahujícího antibiotikum ampicilin. Bakterie byly kultivovány přes noc při 37°C v inkubátoru. Izolovaná kolonie bakterií byla přeočkována do 25 ml tekutého LB média obsahujícího ampicilin, následovaná inkubací v kultivační třepačce při 210 RPM a 37 °C po dobu 18 hodin. Nakultivované bakteriální buňky byly sklizeny centrifugací po dobu 30 minut při 7000 g. Buněčný pelet byl použit pro izolaci plasmidové DNA.

Izolace plasmidové DNA byla provedena za pomoci kitu (Macherey Nagel), podle návodu výrobce přiloženého ke kitu. Získaná plasmidová DNA byla nakonec rozpuštěna v 50 µl TE pufru a byla provedena kontrolní horizontální elektroforéza v agarosovém gelu.

3.3.2 Horizontální elektroforéza plasmidů v agarosovém gelu

Nejprve byla připravena 1% agarosa v TAE pufru, rozeřáta v mikrovlnné troubě až do rozpuštění a po ochladnutí byla nalita do plastového podnosu ze sady Mini Electrophoresis. Do agarosy byl zasunut hřebínek a byla ponechána 30 minut do ztuhnutí. Následně byla i s plastovým podnosem přenesena do elektroforetické cely a zalita TAE puftrem, tak aby byl gel překryt. Do jamek gelu byly nanесeny připravené vzorky plasmidů a DNA markery, poté probíhala elektroforéza po dobu asi 1 hodiny při napětí 80 V. Poté, co čelo doputovalo ke spodní straně gelu, byla elektroforéza ukončena, gel byl vyjmut a výsledek byl zobrazen pomocí UV transiluminátoru.

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny následovně. 10 µl DNA markeru (Quick-Load® Purple 2-Log DNA Ladder nebo 1 kb DNA marker) bylo smícháno v mikrozkuhavce s 5 µl DNA barviva EZ-Vision® DNA dye a inkubováno po dobu 10 minut. 0,1 – 0,5 µl plasmidu (50 ng) bylo smícháno s 9,9 – 9,5 µl TAE pufru, tak aby byl celkový objem 10 µl, ke kterým bylo přidáno 5 µl DNA barviva EZ-Vision® DNA dye a inkubováno po dobu 10 minut.

3.3.3 Transformace kompetentních expresních bakterií, kultivace, sklizení

Transformace expresních bakterií byla provedena stejně jako transformace klonovacích bakterií. Pro expresi CDK2 byly použity nejdříve bakterie *E. coli*, kmen Rosseta DE3 pLysS (Novagen), po optimalizacích však byly používány *E. coli*, kmen BL21 DE3

CONTROLLER (Sigma), které byly transformovány plasmidem pGEX-6P-1 s inserty genů pro CDK2-GST a CAK a genem pro resistenci vůči ampicilinu. Pro expresi CycA byly použity bakterie *E. coli*, kmen Rosseta DE3 pLysS (Novagen), ty byly transformovány plasmidem pET-21-D s insertem genu pro CycA a genem pro resistenci vůči ampicilinu, tento použitý kmen již netransformovaný vykazuje resistenci vůči chloramfenikolu. Transformované bakterie byly kultivovány na 1% agarových LB plotnách s příslušnými selekčními antibiotiky při 37 °C v inkubátoru. Izolované kolonie byly přeočkovány do 50 ml tekutého LB média obsahujícího v případě exprese CDK2 pouze ampicilin a v případě exprese CycA ampicilin i chloramfenikol. Bakterie byly kultivovány přes noc (asi 18 hodin) v třepačce při 210 RPM a 37 °C. Následující den byla bakteriální suspenze 50 krát zředěna (10 ml suspenze bylo doplněno LB médiem s antibiotiky do objemu 500 ml). Kultivace poté dále probíhala za stejných podmínek, až do dosažení OD_{600} (optická densita) = 0,5, měřené spektrofotometrem. Následná indukce exprese pomocí $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ IPTG a kultivace byla optimalizována ve smyslu délky kultivace a teploty.

Expresе cyklinu A byla optimální i za intenzivnějších podmínek, transformované bakterie Rosetta™ 2 (DE3) pLysS nesoucí plasmid s genem pro cyklin A byly přes noc nakultivovány a po zředění byly kultivovány při 37°C do $OD_{600} = 0,5$. V tomto momentu byla teplota snížena na 27°C, přidán IPTG na celkovou koncentraci $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a následná kultivace trvala 4 hodiny.

Sklizení bakterií proběhlo centrifugací při 7000 g a 4 °C po dobu 35 minut. Bakteriální pelet získaný z 500 ml kultury byl na ledu důkladně rozsuspendován v 45 ml pufru obsahujícím polovinu tablety inhibitorů proteas (Roche). V případě exprese CDK2 se jednalo o CDK2-pufr, v případě exprese CycA o CycA-pufr (viz použité roztoky). Rozsuspendovaný pelet byl ve zkumavce zamražen v tekutém dusíku a uchováván při – 20 °C.

3.3.4 Purifikace komplexu cyklin-dependentní kinasy 2 s cyklinem A

Pro purifikaci komplexu CDK2/CycA byla nejdříve na ledu rozmrazena zkumavka obsahující bakteriální suspenzi s CDK2, po rozmražení bylo přidáno 50 µl DNasy I. Na ledu byla provedena lýza buněk a to pomocí ultrazvukového ponorného sonikátoru ve 4 cyklech (20 s sonikace, 100% pulz) se 40 s pauzou. Po sonikaci byla provedena centrifugace při 18000 g a 4 °C po dobu 30 minut, supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr. Mezitím byla připravena kolonka naplněná afinitní glutathion-agarosou

(GSH-agarosa), jež je dodávána ve formě lyofilizovaných kuliček, které je potřeba před použitím hydratovat a ekvilibrovat proteinovým pufrům. V tomto případě byla plastová kolonka naplněna asi z 1/3 a to přibližně 2 ml hydratované GSH-agarosy a byla ekvilibrována nanesením 20 ml CDK2-pufru pomalým průtokem. Kolona byla umístěna na stojanu v lednici a celý proces probíhal při 4 ° C. Následně byl na kolonu pomocí pipety nanášen supernatant obsahující CDK2, odtok z kolony byl velmi pomalý, proteklý supernatant byl znovu sbírán do zkumavky k elektroforetické analýze.

Stejným způsobem jako při přípravě lyzátu obsahujícího CDK2 byl ze zmražené suspenze připraven lyzát obsahující CycA. Přečištěný supernatant byl nanášen na promytou GSH-agarosu opět velmi pomalým průtokem a proteklý supernatant byl taktéž sbírán do zkumavky. Poté bylo provedeno promytí GSH-agarosy nanesením 5 ml CDK2-pufru dvakrát po sobě, z proteklého pufru byly odebrány vzorky, taktéž k pozdější analýze. Nakonec proběhla eluce pomocí elučního pufru ($20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glutathion v CDK2-pufru o $\text{pH} = 7,5$), který byl po 10 ml nanesen na kolonu, kolona byla z obou stran uzavřena a protřepána, po samovolné sedimentaci agarosy byla kolona samovolným průtokem vypuštěna a eluát byl sbírán do zkumavky. Tato procedura byla opakována pětkrát, aby celkový objem elučního pufru činil 50 ml.

Ze všech frakcí získaných při purifikaci byly odebrány vzorky, které byly analyzovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy za denaturujících podmínek (SDS-PAGE), pro ověření přítomnosti CDK2/CycA, výtěžku purifikace a v prvních fázích také pro optimalizaci kultivace bakterií. V případě příznivého výsledku purifikace bylo následně provedeno stanovení koncentrace proteinů v eluátu na základě Bradfordovy metody.

Podle koncentrace proteinů v eluátu byl přidán potřebný objem HRV 3C proteasy, (1 μl proteasy na 200 μg značkováného proteinu) se specifickým štěpícím místem na GST-značce. Štěpení probíhalo v lednici, při 4 ° C, přes noc, asi 16 hodin. Úspěšnost štěpení a uvolnění volné GST byla ověřena pomocí SDS-PAGE. V případě úspěšného štěpení byl roztok obsahující CDK2/CycA zakoncentrován pomocí koncentrátorů Amicon Ultra 15 (s póry pro průchod proteinů o maximální hmotnosti 10 kDa), centrifugací při 10 000 g a 4 ° C až na objem asi 4,5 ml. Následně byl roztok převeden do mikrozkuvek a znovu centrifugován při 20 000 g a 4 ° C po dobu 10 minut. Supernatant byl nanášen na kolonu pro gelovou permeační chromatografii ekvilibrovanou na CDK2-pufru. Pomocí chromatografického systému byl nastaven průtok $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a tlak 0,3 MPa. Roztok prošel kolonou byl analyzován UV

detektorem při 280 nm, díky kterému byly sledovány a průběžně sbírány frakce do zkumavek na ledu. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a frakce obsahující čistý komplex CDK2/CycA spolu s volnou GST byla znovu přečištěna.

Frakce byla třikrát za sebou nanášena na kolonku s GSH-agarosou, čímž byla zbavena volné GST. Roztok čistého komplexu CDK2/CycA byly rozdělen na alikvoty, které byly zmrazeny v kapalném dusíku a uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně použity pro kinetickou analýzu kinasové aktivity komplexu a pro analýzu inhibice studovaným inhibitorem. Větší část roztoku komplexu byla dále zakoncentrována na koncentraci 13 mg/ml a použita pro krystalizaci.

3.3.5 Polyakrylamidová elektroforéza za denaturujících podmínek

Elektroforetická separace proteinů probíhala v 1 mm silných polyakrylamidových gelech připravených ve skleněných deskách, v diskontinuálním uspořádání podle Laemmliho (1970) za denaturujících podmínek (SDS-PAGE). Pro analýzu studovaného komplexu byl použit 12,5% separační gel, spolu s 5% zaostřovacím gelem. Složení roztoků pro přípravu gelů zobrazuje Tab. 3. Nejprve byly ve zkumavce smíchány všechny roztoky pro přípravu separačního gelu kromě APS, který byl přidán pro nastartování polymerace a směs byla okamžitě napipetována do skleněných desek a převrstvena pár kapkami butanolu. Po 30 minutách tuhnutí byl gel propláchnut destilovanou vodou a byla na něj nanesa směs roztoků pro přípravu zaostřovacího gelu a nakonec byl mezi skla vložen hřebínek. Po dalších 30 minutách tuhnutí byl gel připraven k použití a přenesen do elektroforetické komůrky.

Do elektroforetické komůrky a vany byl nalit Tris-glycinový elektrodotový pufr, separace probíhala nejdříve při napětí 120 V a po průchodu čela zaostřovacím gelem při 180 V. Po separaci byly proteiny v gelu vizualizovány pomocí barvicí směsi Instant blue.

Tab. 3 Objemy jednotlivých složek použité na přípravu 1 mm silných gelů pro SDS-PAGE.

Složka	Separací gel 12,5% (2 gely)	Zaostřovací gel 5% (2 gely)
AA/BIS (30% T, 2,66% C)	3,90 ml	0,84 ml
Destilovaná voda	1,94 ml	3,51 ml
Tris pH 8,8	3,50 ml	
Tris pH 6,8		0,63 ml
SDS (10%)	94,00 μl	50,00 μl
TEMED	6,25 μl	5,00 μl
APS (10%)	7,50 μl	30,00 μl

3.3.6 Kinasová reakce – stanovení aktivity a inhibice komplexu

Kinasový test je založený na inkorporaci radioaktivního izotopu fosforu ve formě fosfátu, který je přenášen z $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ na proteinový substrát, za katalýzy aktivní kinasou. Kinasový test byl proveden v 96 jamkové mikrotitrační destičce, v celkovém objemu 10 μl . Nejprve byla připravena koncentrační řada reakčního pufru, obsahujícího ATP i $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$, pomocí postupného ředění v 2x kinasovém pufru. Dále byly připraveny roztoky inhibitoru, roztok histonu a roztok CDK2/CycA. Poté byly roztoky postupně napipetovány do jamek destičky, čímž byla nastartována reakce. Konečná koncentrace ATP v reakci v koncentrační řadě byla 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 666,66 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 222,22 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 74,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 24,69 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 8,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,74 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (nejvyšší koncentrace $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ byla 60 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (3 μCi) a v řadě se snižovala ve stejném poměru). Koncentrace inhibitoru dosahovala v jednotlivých řadách 240 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 120 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 60 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 30 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (bez inhibitoru). Konečná hmotnost komplexu CDK2/CycA v reakci činila 1 ng. Koncentrace histonu (substrát) se rovnala 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Reakce probíhala v třepačce s termostatem za konstantních 30 °C při 300 RPM po dobu 30 minut. Následně byla reakce zastavena přidávkem 5 μl 3% kyseliny trihydrogenfosforečné ve stejném pořadí, jako byla reakce startována. Z každé jamky bylo 6,5 μl napipetováno na fosfocelulosu s předkreslenou mřížkou, po zaschnutí byl fosfocelulosový papír 3x promyt 0,5% kyselinou trihydrogenfosforečnou, vždy po dobu 5 minut. Následně byl opláchnut 96% ethanolem a dosušen na vzduchu. Fosfocelulosový papír byl vložen do kazety s citlivou deskou na radiaci a byl exponován přes noc. Další den byla citlivá deska naskenována ve skeneru FLA 7000 a míra fosforylace byla kvantifikována v programu Multigauge (verze 2.2). Pomocí programu GraphPad Prism (verze 5.0) byly sestrojeny křivky závislosti míry fosforylace na koncentraci ATP při jednotlivých koncentracích inhibitoru, podle kinetiky Michaelise-Mentenové. V tomto programu byly také sestrojeny dvojité reciproké závislosti, zjištěny hodnoty K_M a K_I .

3.3.7 Krystalizace a získání difrakčních dat

Krystalizace probíhala ve spolupráci s Mgr. Janou Škerlovou, Ph.D. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. Pro krystalizaci byly použity alikvoty komplexu CDK2/CycA o koncentraci 13 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, koncentrace inhibitoru LGR4455

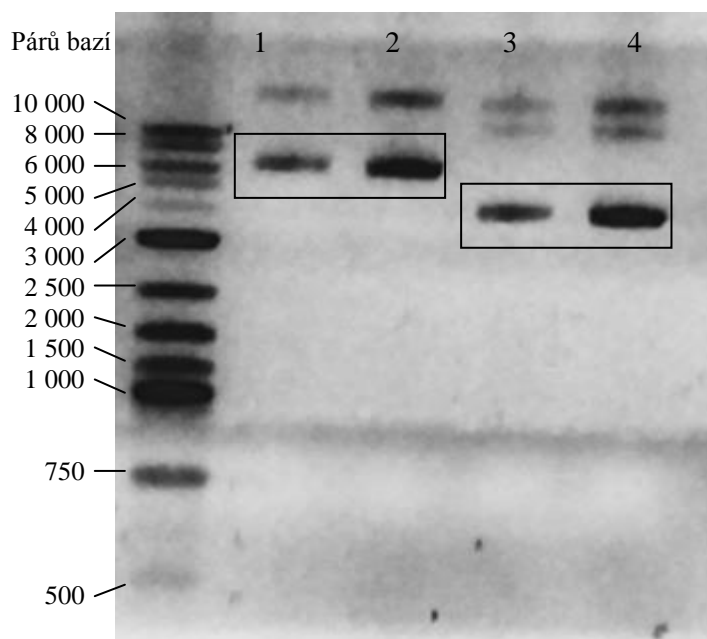
byla v krystalizačních kapkách $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Krystaly byly připraveny metodou sedící kapky, přičemž složení roztoku v zásobní nádržce odpovídalo roztoku č. 21 z kitu Morpheus (Molecular Dimensions).

Krystalizační kapky tvořilo 130 nl roztoku proteinového komplexu s inhibitorem a 170 nl roztoku zásobní nádržky, krystalizace probíhala při $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Připravené krystaly byly zachyceny do nylonových oček (Hampton Research) a rychle ochlazeny v kapalném dusíku. Difrakční data byla získána z měření na synchrotronu Berlin Electron Storage Ring Society for Synchrotron Radiation (BESSY), v Německu. Měření probíhalo za chlazení krystalu při $-173 \text{ }^\circ\text{C}$ na svazku MX 14.2. Struktura byla vyřešena pomocí molekulárního nahrazení v programu MOLREP, za použití struktury CDK2/CycA (kód v PDB 1JST) jako modelu. Modelování ligandu a vylepšení rozlišení struktury bylo provedeno v programu MOLPROBITY.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Horizontální elektroforéza plasmidů

Po amplifikaci plasmidů v klonovacích bakteriích a jejich purifikaci byla provedena horizontální elektroforéza, pro ověření úspěšného namnožení plasmidu a jeho purifikace. Na elektroferogramu (Obr. 12) je možné vidět, že jak v případě plasmidu pGEX-6P-1 obsahujícího gen pro CDK2-GST, tak v případě plasmidu pET-21-D s genem pro CycA došlo k úspěšné amplifikaci a purifikaci a byly získány roztoky s větším množstvím plasmidů, používané pro následné transformace. U plasmidu pGEX-6P-1 s genem pro CDK2-GST a CAK byla očekávaná velikost 7978 párů bází, avšak proužek na elektroferogram se vyskytuje okolo 7000 párů bází. U plasmidu pET-21-D s genem pro CycA byla očekávaná velikost 6106 párů bází, proužek elektroferogramu však odpovídá přibližně 4000 párů bází. U obou plasmidů byly sledovány i další, zpožděné proužky, které mohou odpovídat rozvolněné kruhové struktuře plasmidu, nebo linearizovanému plasmidu. Diskrepance mezi předpokládanou a stanovenou velikostí tedy plynou z různých struktur DNA plasmidu. Po štěpení endonukleasou s jedním štěpicím místem došlo k linearizaci plasmidu a zisku proužků o předpokládané velikosti (data nezobrazena).



Obr. 12 Elektroferogram zobrazující separaci plasmidové DNA. Zleva: 1kB marker počtu párů bází, **1** – zásobní roztok plasmidu pGEX-6P-1 s genem pro CDK2-GST, **2** – amplifikovaný a purifikovaný plasmid pGEX-6P-1 s genem pro CDK2-GST, **3** – zásobní roztok plasmidu pET-21-D s genem pro CycA, **4** - amplifikovaný a purifikovaný plasmid pET-21-D s genem pro CycA. Černými obdélníky jsou vyznačeny cílové plasmidy, pravděpodobně v nadšroubovicové formě.

4.2 Optimalizace exprese a purifikace CDK2/CycA

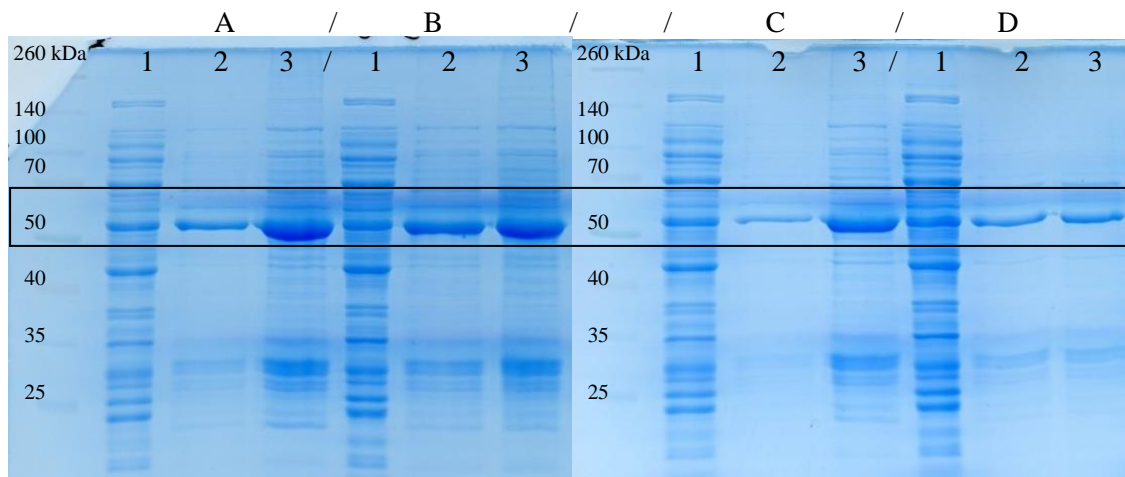
Za účelem získání co největšího množství rozpustného komplexu v eluci (při jeho afinitní purifikaci) byla nejdříve optimalizována exprese CDK2-GST. V případě prvních experimentů probíhala exprese CDK2-GST v bakteriích *E. coli*, Rosetta™ (DE3) pLysS nesoucích plasmid s příslušným genem. V první řadě byl optimalizován růst transformovaných bakterií ve smyslu hustoty suspenze před indukcí exprese a doby exprese. Přes noc nakultivovaná suspenze bakterií byla zředěna a kultivována při 37°C do $OD_{600} = 0,5$ nebo do $OD_{600} = 0,8$. Po nárůstu na danou hodnotu OD byla suspenze ochlazená na 18°C a byl přidán IPTG do koncentrace $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následná kultivace trvala 24 hodin. Výsledky získané po purifikaci (není zobrazeno) jasně ukázaly, že produkce proteinu je mnohem vyšší u kultury, jež dosahovala $OD_{600} = 0,5$.

Proto byly v dalších experimentech kultivovány buněčné kultury do $OD_{600} = 0,5$ a optimalizovány byly další parametry. Ačkoliv se celkové množství proteinu zdálo být dostatečné, purifikace byla značně neefektivní, jelikož větší část proteinu zůstávala i po eluci navázaná na afinitní GSH-agarosu a podíl proteinu v eluci byl mnohem menší.

V následujícím optimalizačním kroku byl sledován vliv chlazení bakteriální suspenze před indukcí exprese a vliv délky samotné exprese. Proto byly nejdříve opět nakultivovány bakterie do $OD_{600} = 0,5$, v tom momentu byla suspenze ochlazená na 18°C a buď byl přidán ihned anebo až po 1 hodině od ochlazení. Následná kultivace trvala buď 16, nebo 24 hodin.

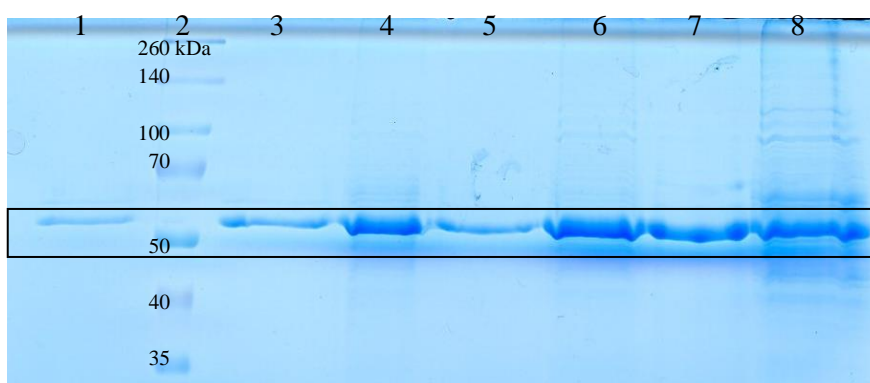
Po purifikaci bylo zjištěno, že kultivace 16 hodin vede k většímu celkovému výtěžku CDK2-GST než kultivace 24 hodin a navíc, že při přidání IPTG až po 1 hodině od ochlazení je větší podíl CDK2-GST v eluátu. Ve všech případech však značná část CDK2-GST stále zůstala navázaná na GSH-agarose. Proužky na gelu ve srovnání s markerem molekulové hmotnosti odpovídaly molekulové hmotnosti přibližně 55 kDa, přičemž předpokládaná hmotnost byla 60 kDa (Obr. 13).

Aby byla zvýšena účinnost eluce, byla eluce provedena elučním pufrem o zvyšující se koncentraci glutathionu. Složení CDK2 pufru bylo převzato z publikace Echaliere *et al.*, (2012). Tento pufr obsahoval $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES, $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a 0,02% MTG, při pH = 7,5. První eluce byla provedena $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, druhá $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a třetí $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glutathionem v CDK2 pufru. Vyšší koncentrace glutathionu nevedly k většímu výtěžku, stále byla větší část CDK2-GST navázaná na GSH agarosu (není zobrazeno). Proto byla uvažována hydrofobní interakce proteinu s agarosou.

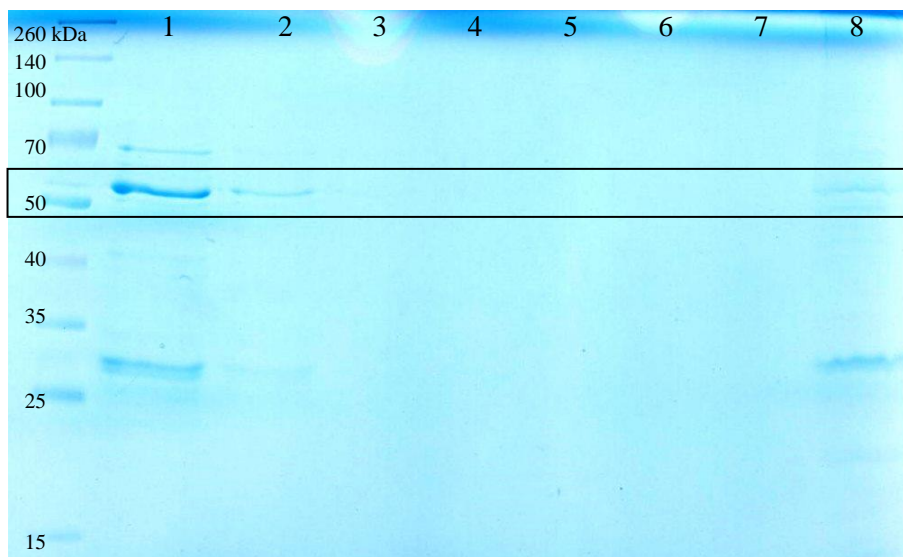


Obr. 13 Elektroferogram z SDS-PAGE jednotlivých vzorků odebraných při purifikaci CDK2-GST, purifikované ze sklizených bakteriálních kultur (0,5 l) kultivovaných za různých podmínek. Zleva: marker molekulové hmotnosti Spectra Multicolor Broad Range, **A** – 16 hodin kultivace, IPTG přidáno hned, **B** – 16 hodin kultivace IPTG přidáno po 1 hodině chlazení, marker molekulové hmotnosti, **C** – 24 hodin kultivace, IPTG přidáno hned, **D** – 24 hodin kultivace, IPTG přidáno po 1 hodině chlazení. U každého druhu kultivace jsou tři vzorky: **1** – lyzát bakterií, **2**- první eluce, **3**- vzorek GSH-agarosy z kolony po elucích. Proužky odpovídající CDK2-GST jsou ohraničeny černým obdélníkem, v pásu molekulových hmotností přibližně 55 kDa.

V následujícím experimentu byl přidán do pufru detergent Triton X-100. Ten měl omezit hydrofobní interakce a zvýšit rozpustnost proteinu. Byla provedena eluce $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glutathionem v CDK2-pufu, s přidavkem 0,1%, 0,5% a 1% Tritonu X-100. Vzrůstající koncentrace detergentu v elučním pufru měla pozitivní vliv na eluci, došlo ke zvýšení podílu CDK2-GST v eluci, avšak i při nejvyšší koncentraci Tritonu X-100 zůstávala velká část proteinu navázaná na GSH-agarose (Obr. 14).



Obr. 14 Elektroferogram z SDS-PAGE vzorků odebraných při purifikaci CDK2-GST, ze sklizené bakteriální kultury (0,5 l) při s přidavkem detergentu Triton X-100. Zleva: **1** - kontrolní eluce bez detergentu, **2** - marker molekulové hmotnosti Spectra Multicolor Broad Range, **3** – eluce elučním puftrem s 0,1% Tritonem X-100, **4** - vzorek GSH agarosy po předchozí eluci, **5** – eluce elučním puftrem s 0,5% Tritonem X-100, **6** - vzorek GSH agarosy po předchozí eluci, **7** – eluce elučním puftrem s 1% Tritonem X-100, **8** – vzorek GSH agarosy po přechodí eluci. Proužky odpovídající CDK2-GST jsou ohraničeny obdélníkem, v pásu molekulových hmotností přibližně 55 kDa.

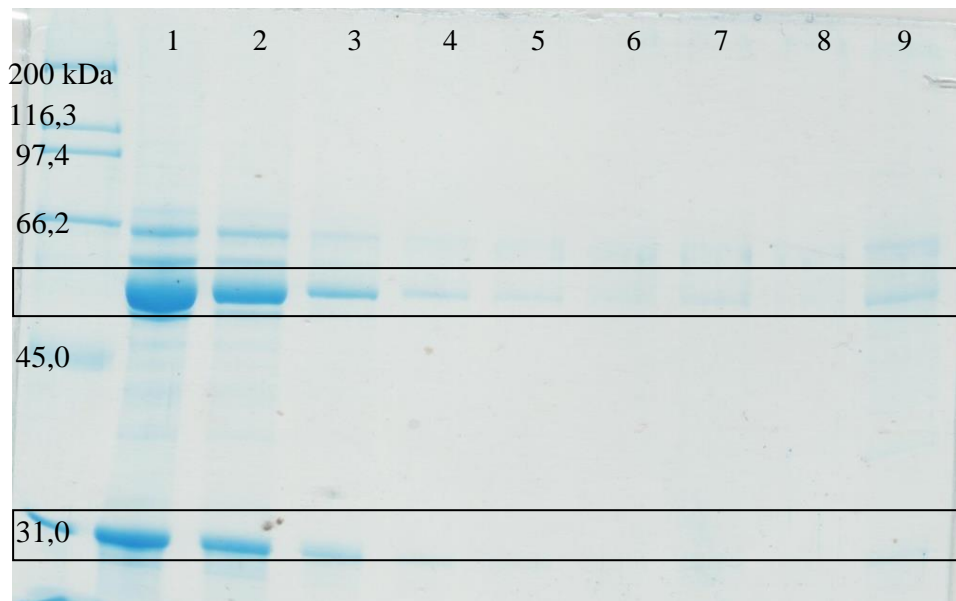


Obr. 15 Elektroferogram z SDS-PAGE vzorků odebraných při purifikaci CDK2-GST, purifikované ze sklizené kultury bakterií (0,5 l) CONTROLLER. Zleva: marker molekulové hmotnosti Spectra Multicolor Broad Range, **1** – eluce č. 1, **2** – eluce č. 2, **3-7** - eluce č. 3 – eluce č. 7, **8** – vzorek GSH agarosy po předchozích elucích. Proužky odpovídající CDK2-GST jsou ohraničeny černým obdélníkem, v pásu molekulových hmotností přibližně 55 kDa.

Na základě získaných poznatků z purifikací bylo zjištěno, že použité bakterie nejsou pro expresi CDK2-GST vhodné. Proto byla následně exprese vyzkoušena v jiných bakteriích, konkrétně *E. coli*, kmenu CONTROLLER BL21(DE3). Pro expresi byly použity předem optimalizované podmínky, tedy kultivace do $OD_{600} = 0,5$, po jejím dosažení ochlazení na 18°C , po 1 hodině chlazení indukce exprese přidáním IPTG do koncentrace $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následná kultivace probíhala 16 hodin. Po purifikaci bylo zjištěno, že ačkoliv je hladina exprese nižší a tím i výtěžek CDK2-GST nižší, protein se beze zbytku vyskytuje v eluci a na GSH-agarose po eluci nezůstává navázán (Obr. 15).

Po několika dalších purifikacích (výsledky nezobrazeny) bylo ještě upraveno složení CDK2 pufru, do kterého byl přidán $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT, který ještě zlepšil rozpustnost cílového proteinu a omezil jeho ztráty při afinitní purifikaci (složení tohoto pufru poté již odpovídalo pufru uvedenému v kapitole 3.1.3. Roztoky).

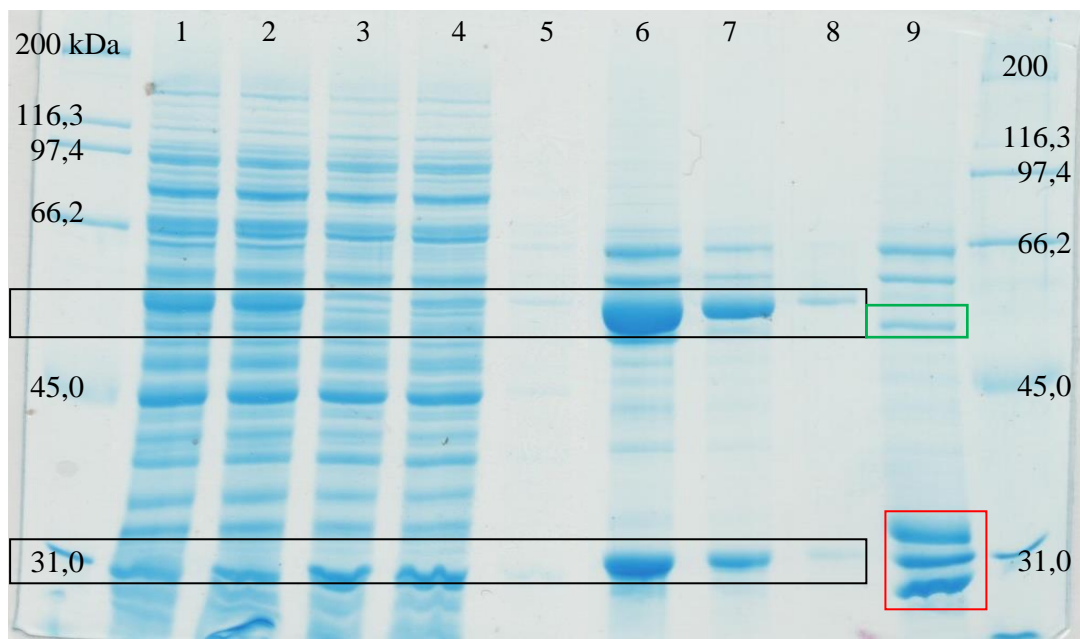
Následovaly purifikace, ve kterých byl zahrnut i cyklin A. Expese cyklinu A byla optimální i za intenzivnějších podmínek, nebyla optimalizovaná a její postup byl převzat z publikace Echaliere *et al.*, (2012). Při následné purifikaci proteinu z většího objemu bakteriální kultury a použití CDK2-pufu s MTG a DTT byla ověřena tvorba komplexu CDK2/CycA. V elucích byly pozorovány proužky odpovídající CDK2-GST i cyklinu A a zároveň došlo ke snížení podílu kontaminujících proteinů (Obr. 16).



Obr. 16 Elektroferogram z SDS-PAGE vzorků odebraných při purifikaci komplexu CDK2-GST/CycA ze sklizené bakteriální kultury (2 l) kultivované za optimalizovaných podmínek. Zleva: marker molekulových hmotností Broad Range, **1 – 8** – eluce č. 1 – eluce č. 8, **9** – vzorek GSH-agarosy z kolony po elucích. Proužky odpovídající CDK2-GST jsou ohraničeny horním obdélníkem v pásu molekulových hmotností přibližně 56 kDa, proužky odpovídající CycA jsou ohraničeny spodním obdélníkem v pásu molekulových hmotností přibližně 30 kDa.

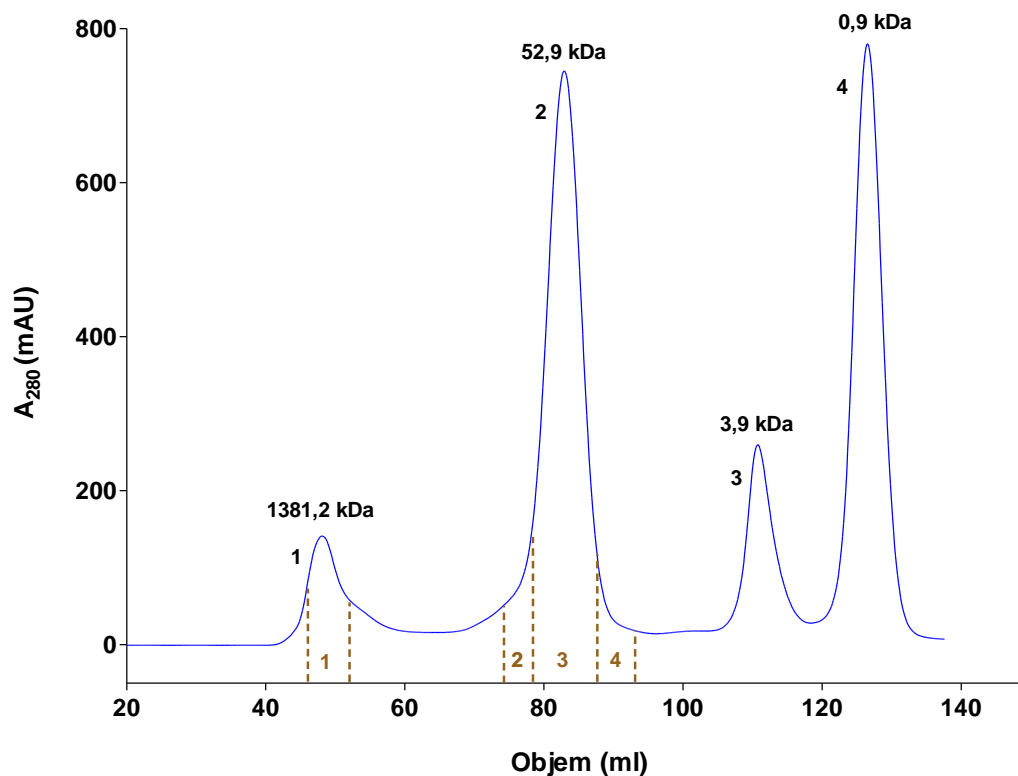
Nejdůležitějším zjištěním bylo potvrzení tvorby komplexu a především vysoký výtěžek purifikace. Proužky na gelu ve srovnání s markerem molekulové hmotnosti odpovídaly molekulové hmotnosti CDK2-GST přibližně 56 kDa, přičemž předpokládaná hmotnost byla 60 kDa, proužky CycA odpovídaly molekulové hmotnosti 30 kDa, což byla i předpokládaná hmotnost. (Obr. 16).

Pro získání většího množství komplexu CDK2-GST/CycA musel být sklizen bakteriální pelet alespoň ze 4 litrů bakteriální kultury exprimující CDK2-GST a 4 litrů kultury exprimující CycA. Vzorovou purifikaci popisuje elektroferogram na Obr. 17. Po úspěšné purifikaci bylo provedeno odštěpení GST-značky pomocí HRV 3C proteasy, které bylo úspěšné. Ve sloupci č. 9. elektroferogramu je možné vidět proužek odpovídající HRV 3C protease, který odpovídal molekulové hmotnosti přibližně 48 kDa, její skutečná hmotnost je 47,8 kDa. Zároveň je možné vidět úspěšně odštěpenou GST-značku, jelikož jsou ve sloupci č. 9 viditelné tři proužky. Proužek odpovídající hmotnosti 33 kDa patřil CDK2 o předpokládané hmotnosti 34 kDa, proužek odpovídající hmotnosti 30 kDa patřil CycA o stejné předpokládané hmotnosti a proužek odpovídající hmotnosti 27 kDa patřil volné GST o předpokládané hmotnosti 26 kDa (Obr. 17).



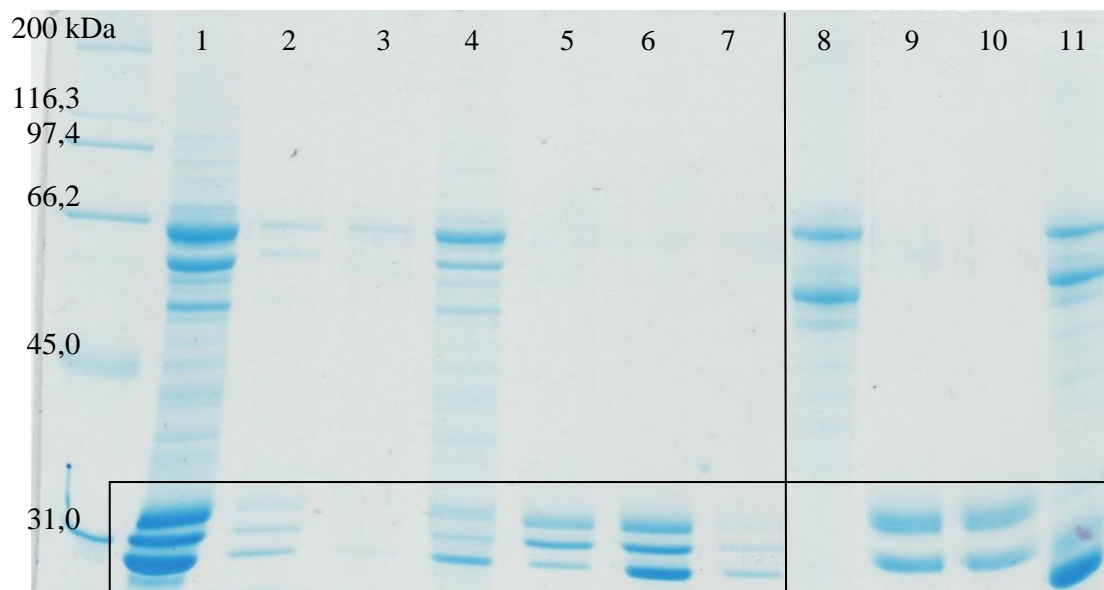
Obr. 17 Elektroferogram z SDS-PAGE všech vzorků jedné z purifikací komplexu z bakteriální suspenze získané ze 4 l kultury exprimující CDK2-GST a 4 l kultury exprimující CycA. Zleva: marker molekulových hmotností Broad Range, **1** – lyzát obsahující CDK2-GST, **2** – průtok vzorku 1 přes GSH-kolonu, **3** – lyzát obsahující CycA, **4** – průtok vzorku 3 přes GSH kolonu, **5** – proplach GSH-kolony, **6** – eluce č. 1, **7** – eluce č. 2, **8** – vzorek GSH-agarosu po elucích, **9** – vzorek komplexu po štěpení HRV 3C proteasou přes noc, marker molekulových hmotností Broad Range. Proužky odpovídající CDK2-GST jsou ohraničeny horním obdélníkem v pásu hmotností 56 kDa, proužky odpovídající CycA ohraničeny spodním obdélníkem v pásu hmotností 30 kDa., Červený obdélník ohraničuje naštěpený komplex, ve kterém jsou shora CDK2 (33 kDa), CycA (30 kDa) a volná GST (27 kDa) V zeleném obdélníku ve sloupci č. 9 je označen proužek odpovídající HRV 3C protease v pásu hmotností 48 kDa.

Roztok proteinů s úspěšně odštěpenou GST-značkou (jeho vzorek byl nanesen do sloupce č. 9 na Obr. 17) byl následně frakcionován pomocí gelové permeační chromatografie, kterou popisuje chromatogram na Obr. 18. Tento chromatogram ukazuje, že bylo dosaženo optimální separace, díky čemuž byly od směsi komplexu CDK2/CycA a volné GST odděleny jak větší (agregované) proteiny, tak i menší proteiny a volný glutathion. Na chromatogramu je možné vidět 4 píky, přičemž první pík odpovídá větším kontaminujícím proteinům o průměrné molekulové hmotnosti 1381,2 kDa, druhý pík odpovídá komplexu CDK2/CycA spolu s volnou GST a proteasou o průměrné hmotnosti 52,9 kDa, třetí pík odpovídá kontaminujícím peptidům o průměrné hmotnosti 3,9 kDa a poslední, čtvrtý pík odpovídá glutathionu o hmotnosti 0,9 kDa. Získané molekulové hmotnosti byly vypočítány na základě kalibrační závislosti hmotnosti proteinu na retenčním objemu dané kolony.



Obr. 18 Chromatogram zobrazující záznam z UV detektoru (při 280 nm) v průběhu gelové chromatografie. Jednotlivé píky jsou na levé straně označeny čísly a nad nimi je uvedena průměrná molekulová hmotnost. Pík č. 1 odpovídá agregátům a větším kontaminujícím proteinům, pík č. 2 odpovídá směsi komplexu CDK2/CycA a volné GST, pík č. 4 odpovídá malým kontaminujícím peptidům a pík č. 4 odpovídá glutathionu. Hnědými přerušovanými čarami a číslem jsou označeny odběry jednotlivých frakcí, dále analyzovaných SDS-PAGE.

Elektroforetickou separaci jednotlivých frakcí odebraných v průběhu gelové permeační chromatografie zobrazuje elektroferogram na Obr. 19. Z něj je patrné, že vzorek nanášený na kolonu obsahoval značné množství kontaminujících proteinů a píky chromatogramu odpovídají proteinům popsáným výše. Zároveň je na elektroferogramu na Obr. 19 možné vidět, že frakce 2, 3 a 4 odebrané při chromatografické separaci obsahují přečištěný komplex CDK2/CycA spolu s volnou GST. Na základě tohoto zjištění bylo provedeno přečištění pomocí spojených frakcí 2, 3 a 4 afinitní chromatografií na GSH agarose. Spojené frakce byly naneseny na kolonku s pomalým průtokem, roztok protékající kolonkou byl sbírán a následně takto znovu dvakrát nanášen. Tím bylo dosaženo trojnásobného přečištění od volné GST. Stav GSH agarosy před nanášením a po trojnásobném nanášení roztoku ukazuje, že došlo k navázání veškeré volné GST, roztok protéknuvší kolonou obsahoval již pouze přečištěný komplex CDK2/CycA (sloupec 9) stejně jako oplach kolony (sloupec 10). Tyto dva roztoky byly finálně zahuštěny a použity ke krystalizačním experimentům.



Obr. 19 Elektroferogram z SDS-PAGE vzorků z gelové permeační chromatografie a finálního afinitního přečištění. Zleva: marker molekulových hmotností Broad Range, **1** – zakoncentrovaný vzorek nanášený na kolonu pro gelovou chromatografii, **2** – permeát odebraný na začátku zakoncentrovávání, **3** – permeát odebraný na konci zakoncentrovávání, **4** – frakce č. 1, **5** – frakce č. 2, **6** – frakce č. 3, **7** – frakce č. 4, **8** – vzorek GSH-agarosy před nanesením spojených frakcí č. 2, 3 a 4, **9** – průtok GSH-kolony po trojnásobném nanesení spojených frakcí, **10** – proplach GSH-kolony, **11** – vzorek GSH-agarosy po trojnásobném nanesení spojených frakcí. Obdélník ohraničuje proužky odpovídající shora CDK2 (33 kDa), CycA (30 kDa) a volné GST. Vzorky ve sloupcích **9** a **10** odpovídají finálním roztokům přečištěného komplexu, který byl po zahuštění použit ke krystalizaci.

Pro získání dostatečného množství komplexu CDK2/CycA stejné šarže pro krystalizační experiment byl použit protein získaný z 8 l bakteriální kultury exprimující CDK2-GST a 8 l bakteriální kultury exprimující CycA. Množství získaného proteinového komplexu z těchto objemů činilo průměrně 2 mg, celkem byla provedena produkce dvou takovýchto proteinových šarží.

Na základě afinitních purifikací, jejichž průběh byl sledován pomocí SDS-PAGE, byly určeny neoptimálnější podmínky exprese studovaných proteinů. Pro expresi CDK2-GST musely být zvoleny mírné podmínky, tedy teplota 18°C, a z toho plynoucí delší čas exprese po indukci, přibližně 16 h. Delší a intenzivnější exprese vedla k menšímu výtěžku rozpustného proteinu, z důvodu ukládání proteinu do nerozpustných inkluzí. Tento postup byl odvozen z dřívějších publikací, kde autoři provedli expresi při 18°C po dobu 24 hodin (Echalier *et al.*, 2012; Mc Grath *et al.*, 2017) nebo při 18°C po dobu 20 hodin (Honda *et al.*, 2005). Co se týče použitých expresních bakterií kolektiv Honda *et al.*, (2005) použil pro produkci CDK2-GST bakterie *E. coli* kmen B834(DE3) pLysS, zatímco kolektiv McGrath *et al.*, 2017 *E. coli* kmen BL21. Výběr expresních

bakterií se v této práci ukázal být klíčový pro úspěšnou produkci většího množství rozpustného proteinu.

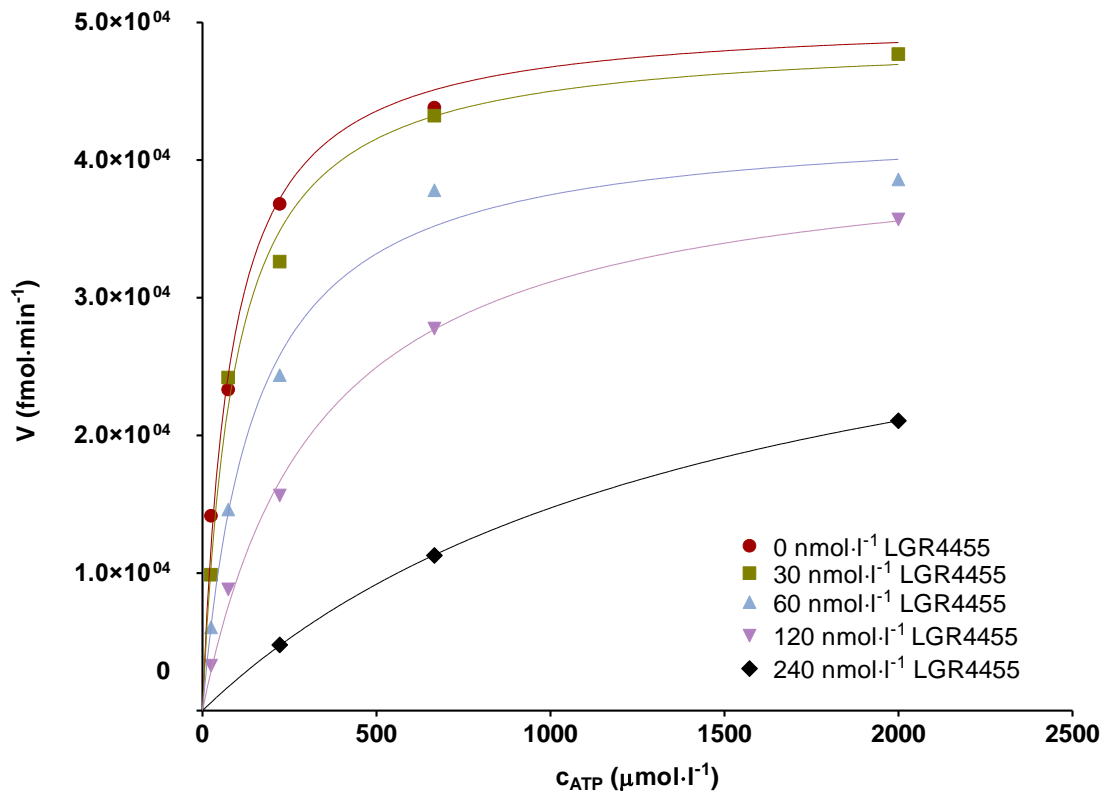
Expresce cyklinu A mohla probíhat za vyšší teploty (27°C) a tedy i po kratší čas (4 h), probíhala u všech experimentů za stejných podmínek a nebyla optimalizována. Tyto podmínky se shodují s dříve publikovanými metodami, přičemž exprese probíhala např. při 30°C po dobu 3 hodin (Brown *et al*, 1995).

Složení CDK2-pufu bylo optimalizováno za účelem zvýšení rozpustnosti proteinů, především CDK2, při purifikaci a následné manipulaci. Základní složení CDK2-pufu použitého pro homogenizaci bakteriálního materiálu a purifikaci bylo převzato z článku Echalié *et al.*, (2012). Tento pufir obsahoval 40 mmol·l⁻¹ HEPES, 200 mmol·l⁻¹ NaCl a 0,02% MTG, při pH = 7,5. V průběhu purifikací byl sledován vliv přídavku DTT a detergentů k pufiru, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo přidáním DTT do koncentrace 5 mmol·l⁻¹. Přídavek DTT použil i kolektiv McGrath *et al* (2017), v tomto případě do koncentrace 1 mmol·l⁻¹.

4.3 Kinasová reakce

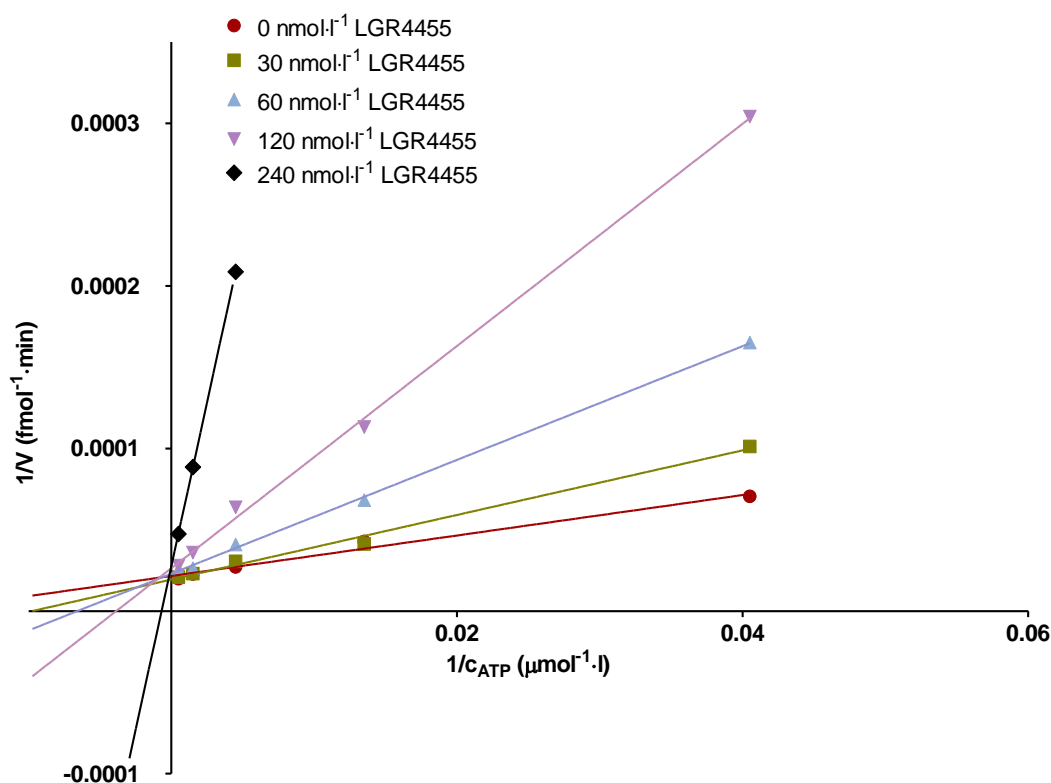
Na základě nelineární regrese provedené metodou nejmenších čtverců v programu Prism 5 z dat získaných detekcí radioaktivity vzorků byly sestrojeny křivky enzymové kinetiky Michaelise-Mentenové (Obr. 20). Ze získaných dat bez přítomnosti inhibitoru byly stanoveny hodnoty kinetických parametrů charakterizujících komplex CDK2/CycA bez inhibitoru, a to Michaelisovy konstanty (K_M) pro ATP a limitní rychlosti (V_{lim}). Hodnota K_M (ATP) = 79,38 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, hodnota $V_{lim} = 50,47\cdot 10^3$ fmol·min⁻¹ = 50,47 pmol·min⁻¹. Tato hodnota odpovídá aktivitě enzymu, a jelikož v reakci byl přítomen 1 ng enzymu, je specifická aktivita rovna 50,47 pmol·min⁻¹·ng⁻¹.

Hodnota K_M pro ATP ukazuje vysokou afinitu enzymu k jeho přirozenému substrátu a řádově se shoduje s daty publikace Echalié *et al* (2012), ve které byla hodnota K_M pro ATP 46,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Specifická aktivita rovna 50,47 pmol·min⁻¹·ng⁻¹ se taktéž řádově shoduje s dřívějšími daty, konkrétně s hodnotou 15,94 pmol·min⁻¹·ng⁻¹ (Jeffrey *et al*, 1995), která je však asi 3 krát nižší než byla stanovena v předkládané práci.



Obr. 20 Křivky enzymové kinetiky podle Michaelise-Mentenové (závislost V_0 na koncentraci substrátu ATP) při daných koncentracích inhibitoru LGR4455.

Na základě dvojité reciproké závislosti podle Lineweavera a Burka byl sestrojen graf (Obr. 21), v němž došlo k protnutí přímek na ose odpovídající $1/V$, čímž byl určen kompetitivní charakter inhibice. Prostřednictvím lineární regrese reciprokých dat byly určeny směrnice přímek odpovídající zlomku $K_M(\text{ATP})/V_{\text{lim}}$ při jednotlivých koncentracích inhibitoru. Následně byl vytvořen sekundární graf závislosti směrnic na koncentraci inhibitoru (včetně nulové koncentrace) a určen průsečík přímky s osou x . Jeho hodnota, korespondující s hodnotou inhibiční konstanty (K_I) činila $13,98 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnota v jednotkách nebo desítkách $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ukazuje na vysokou účinnost tohoto inhibitoru vůči CDK2/CycA. Ve srovnání s jinými inhibitory CDK je tato hodnota nízká podobně jako hodnoty u schválených inhibitorů nebo inhibitorů v klinickém testování (Whittaker 2017).

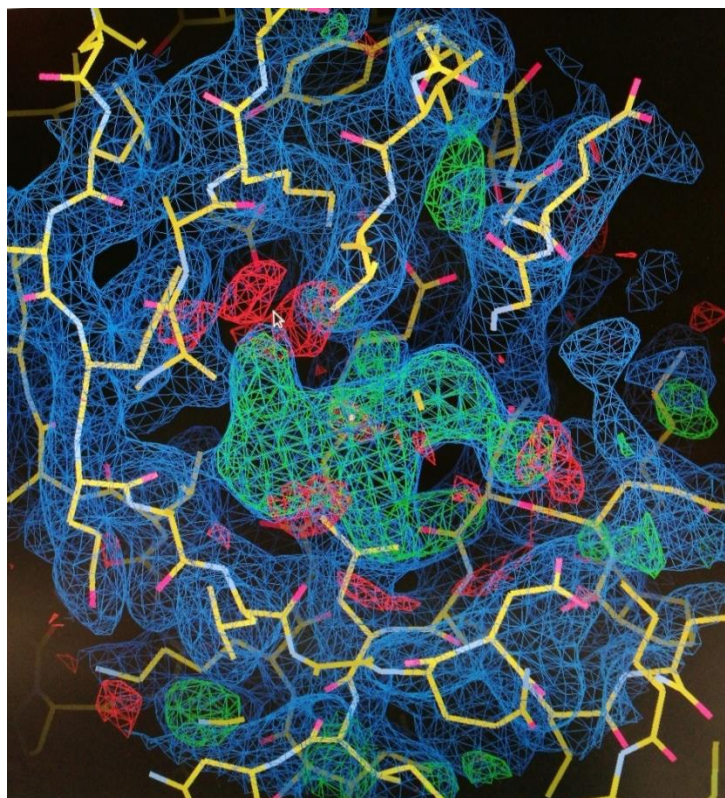


Obr. 21 Graf dvojitě reciproká závislost enzymové inhibice podle Lineweavera a Burka ($1/V$ ku $1/\text{konzentrace substrátu (ATP)}$) při jednotlivých koncentracích inhibitoru LGR 4455.

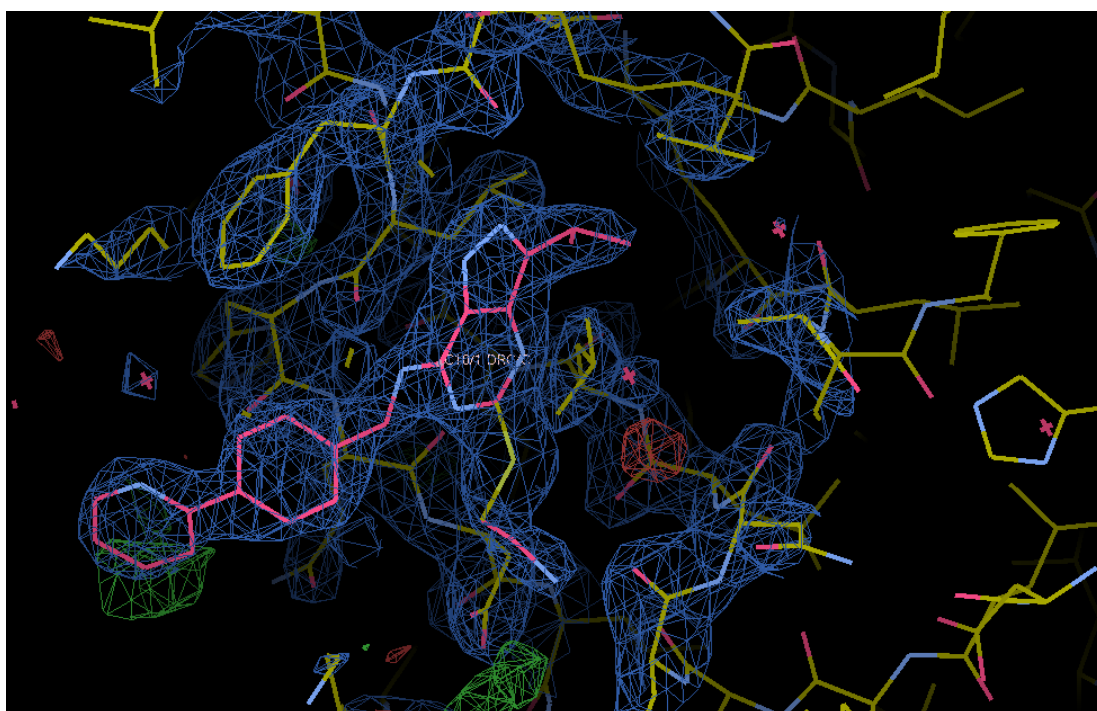
4.4 Struktura komplexu cyklin-dependentní kinasy 2 s cyklinem A

Byla objasněna struktura komplexu CDK2/CycA s novým inhibitorem LGR4455, jehož přítomnost a vazba v aktivním místě byla potvrzena (Obr. 22). Jelikož inhibitor LGR4455 je novou, doposud nepatentovanou látkou, nebylo možné publikovat finální konkrétní strukturu, proto jsou struktury zobrazeny ve formě mapy elektronové hustoty získané z difrakčních dat a aminokyselinové kostry odpovídající primární sekvenci proteinů.

Objasněný vazebný mód látky LGR4455 (Obr. 23) se shoduje s vazebnými módy již dříve charakterizovaných purinových molekul Roskovitinu (PDB kód 3DDQ) a inhibitoru CR8 (PDB kód 3DDP) (Bettayeb *et al.*, 2008). Těmto látkám z již objasněných struktur je inhibitor LGR4455 nejvíce podobný a na základě shody vazebného módu byly potvrzeny předpoklady o jeho vazbě v aktivním místě CDK2.



Obr. 22 Struktura komplexu ve formě mapy elektronové hustoty a aminokyselinové kostry. V aktivním centru je zelenou sítí zobrazena elektronová hustota inhibitoru.



Obr. 23 Struktura inhibitoru v aktivním centru a okolní aminokyselinová residua ve formě mapy elektronové hustoty a aminokyselinové kostry

5 ZÁVĚR

V předkládané bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma cyklin-dependentních kinas, struktury CDK2 a jejího postupného objevování a přístupů používaných pro produkci rekombinantních proteinů, využívaných v případě komplexů CDK/Cyc.

V experimentální části práce byly nejdříve namnoženy používané plasmidy a byla provedena jejich elektroforéza, za účelem potvrzení amplifikace a přítomnosti. Následně byly plasmidy transformovány kompetentní bakterie, jež byly kultivovány pro produkci cílových proteinů CDK2-GST a CycA. Z důvodu optimalizace exprese probíhaly kultivace v prvních fázích při různých podmínkách a při následné afinitní purifikaci byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Nakonec se podařilo expresi i samotnou purifikaci optimalizovat tak, aby docházelo k tvorbě co největšího množství cílových proteinů, za omezení agregace a tvorby nerozpustných inkluzí. Po dvoukrokové purifikaci komplexu CDK2/CycA bylo získáno dostatečné množství pro další analýzy.

Byly stanoveny kinetické parametry enzymové aktivity komplexu CDK2/CycA, jež se shodují s předchozími publikacemi. Dále byla sledována inhibice komplexu novým inhibítorem LGR4455. Byl potvrzen kompetitivní charakter této inhibice a byla stanovena inhibiční konstanta, v řádu $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což ukazuje na vysokou účinnost studovaného inhibítora vůči CDK2/CycA. Nakonec byla provedena i krystalizace proteinového komplexu s inhibítorem, po úspěšném vyřešení trojrozměrné struktury byla potvrzena přítomnost inhibítora v aktivním místě a jeho interakce s aminokyselinovými residui aktivního místa.

Získaná data ukazují, že zkoumaný inhibitor je účinný vůči CDK2/CycA při nízkých koncentracích a mohl by být použit pro klinické testování. Zároveň je možno na základě struktury zhodnotit vazbu inhibítora a v budoucnu použít data pro vývoj dalších, účinných a např. i selektivních inhibitorů CDK.

6 LITERATURA

- Ahn J. S., Radhakrishnan M. L., Mapelli M., Choi S., Tidor B., Cuny G. D., Musacchio A., Yeh L. A., Kosik K. S. (2005): Defining Cdk5 ligand chemical space with small molecule inhibitors of tau phosphorylation. *Chemistry & Biology* **12**, 811-823.
- Anscombe E., Meschini E., Mora-Vidal R., Martin M. P., Staunton D., Geitmann M., Danielson U. H., Stanley W. A., Wang L. Z., Reuillon T., Golding B. T., Cano C., Newell D. R., Noble M. E., Wedge S. R., Endicott J. A., Griffin R. J. (2015): Identification and Characterization of an Irreversible Inhibitor of CDK2. *Chemistry & Biology* **22**, 1159-1164.
- Baumli S., Lolli G., Lowe E. D., Troiani S., Rusconi L., Bullock A. N., Debreczeni J. E., Knapp S., Johnson L. N. (2008): The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO Journal* **27**, 1907-1918.
- Bayliss R., Fry A., Haq T., Yeoh S. (2012): On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biology* **11**:120136
<http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/2/11/120136>
- Becker K. A., Ghule, P. N., Therrien J. A., Lian J. B., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S. (2006): Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of Cellular Physiology* **209**, 883-893.
- Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J. A., Galons H., Meijer L. (2008): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**, 5797-5807.
- Bösken C. A., Farnung L., Hintermair C., Merzel Schachter M., Vogel-Bachmayr K., Blazek D., Anand K., Fisher R. P., Eick D., Geyer M. (2014): The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature Communications* **5**:3505
<http://www.nature.com/articles/ncomms4505>
- Brown N. R., Korolchuk S., Martin M. P., Stanley W. A., Moukhametzianov R., Noble M. E. M., Endicott J. A. (2015): CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nature Communications* **6**:6769
<http://www.nature.com/articles/ncomms7769>
- Brown N. R., Lowe E. D., Petri E., Skamnaki V., Antrobus R., Johnson L. N. (2007): Cyclin B and cyclin A confer different substrate recognition properties on CDK2. *Cell Cycle* **6**, 1350-1359.
- Brown N. R., Noble M. E. M., Endicott J. A., Garman E. F., Wakatsuki S., Mitchell E., Rasmussen B., Hunt T, Johnson L. N. (1995): The crystal structure of cyclin A. *Structure* **3**, 1235-1247.
- Brown N. R., Noble M. E., Lawrie A. M., Morris M. C., Tunnah P., Divita G., Johnson L. N., Endicott J. A. (1999): Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *Journal of Biological Chemistry* **13**, 8746-8756.
- Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014): Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology* **14**, 10.
- Coudreuse D. a Nurse P. (2010): Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* **468**, 1074–1079.
- Coxon C. R., Anscombe E., Harnor S. J., Martin M. P., Carbain B., Golding B. T., Hardcastle I. R., Harlow L. K., Korolchuk S., Matheson C. J., Newell D. R., Noble M. E., Sivaprakasam M., Tudhope S. J., Turner D. M., Wang L. Z., Wedge S. R., Wong C., Griffin R. J., Endicott J. A., Cano C. (2017): Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylamino-purines. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 1746-1767.
- Czodrowski P., Mallinger A., Wienke D., Esdar C., Pöschke O., Busch M., Rohdich F., Eccles S.A., Ortiz-Ruiz M. J., Schneider R., Raynaud F. I., Clarke P. A., Musil D., Schwarz D., Dale T., Urbahns K., Blagg J., Schiemann K. (2013): Structure-Based Optimization of Potent, Selective, and Orally Bioavailable CDK8 Inhibitors Discovered by High-Throughput Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 9337-9349.

- D'Angiolella V., Esencay M., Pagano M. (2013): A cyclin without cyclin-dependent kinases: cyclin F controls genome stability through ubiquitin-mediated proteolysis. *Trends in Cellular Biology* **23**, 135-140.
- Day P. J., Cleasby A., Tickle I. J., O'Reilly M., Coyle J. E., Holding F. P., McMenamin R. L., Yon J., Chopra R., Lengauer C., Jhoti H. (2009): Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4166-4170.
- De Bondt H. L., Rosenblatt J., Jancarik J., Jones H. D., Morgan D. O., Kim S. H. (1993): Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595 - 602.
- Dixon-Clarke S. E., Elkins J. M., Cheng S. W., Morin G. B., Bullock A. N. (2015): Structures of the CDK12/CycK complex with AMP-PNP reveal a flexible C-terminal kinase extension important for ATP binding. *Scientific reports* **5**:17122
<http://www.nature.com/articles/srep17122>
- Dixon-Clarke S. E., Shehata S. N., Krojer T., Sharpe T. D., von Delft F., Sakamoto K., Bullock A. N. (2017): Structure and inhibitor specificity of the PCTAIRE-family kinase CDK16. *The Biochemical Journal* **474**, 699-713.
- Donzelli M. a Draetta G. F. (2003): Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Reports* **4**, 671-677.
- Echalier A., Endicott J. A., Noble M. E. (2010): Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et Biophysica acta* **3**, 511-519.
- Echalier A., Hole A. J., Lolli G., Endicott J. A., Noble M. E. M. (2014): An Inhibitor's-Eye View of the ATP-Binding Site of CDKs in Different Regulatory States. *ACS Chemical Biology* **9**, 1251 – 1256.
- Endicott J. A., Noble M. E. (2013): Structural characterization of the cyclin-dependent protein kinase family. *Biochemical Society transactions* **14**, 1008 - 1016.
- Fisher D. L. a Nurse P. (1996): A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO Journal* **15**, 850–860.
- Fisher R. P. (2005): Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science* **118**, 5171–5180.
- Fisher R. P. a Morgan D. O. (1994): A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**, 713-724.
- Greifenberg A. K., Hönig D., Pilarova K., Düster R., Bartholomeeusen K., Böskén C. A., Anand K., Blazek D., Geyer M. (2016): Structural and Functional Analysis of the Cdk13/Cyclin K Complex. *Cell reports* **14**, 320-331.
- Han X., Jiang M., Zhou C., Zhou Z., Xu Z., Wang L., Mayweg A. V., Niu R., Jin T. G., Yang S. Discovery of potent and selective CDK8 inhibitors through FBDD approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, 4488-4492.
- Hanse E. A., Mashek D. G., Becker J. R., Solmonson A. D., Mullany L. K., Mashek M. T., Towle H. C., Chau A. T., Albrecht J. H. (2012): Cyclin D1 inhibits hepatic lipogenesis via repression of carbohydrate response element binding protein and hepatocyte nuclear factor 4 α . *Cell Cycle* **11**, 2681-2690.
- Honda R., Lowe E. D., Dubinina E., Skamnaki V., Cook A., Brown N. R., Johnson L. N. (2005): The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *The EMBO Journal* **24**, 452 – 463.
- Honda R., Lowe E. D., Dubinina E., Skamnaki V., Cook A., Brown N. R., Johnson L. N. (2005): The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO Journal* **24**, 452-463.
- Huang D., Zhou T., Lafleur K., Nevado C., Caflisch A. (2010): Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: A network analysis. *Bioinformatics* **26**, 198–204.
- Chen P., Lee N. V., Hu W., Xu M., Ferre R. A., Lam H., Bergqvist S., Solowiej J., Diehl W., He Y. A., Yu X., Nagata A., VanArsdale T., Murray B. W. (2016): Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Molecular Cancer Therapeutics* **15**, 2273-2281.

- Cho Y. S., Angove H., Brain C., Chen C. H., Cheng H., Cheng R., Chopra R., Chung K., Congreve M., Dagostin C., Davis D. J., Feltell R., Giraldez J., Hiscock S. D., Kim S., Kovats S., Lagu B., Lewry K., Loo A., Lu Y., Luzzio M., Maniara W., McMenamin R., Mortenson P. N., Benning R., O'Reilly M., Rees D. C., Shen J., Smith T., Wang Y., Williams G., Woolford A. J., Wrona W., Xu M., Yang F., Howard S. (2012): Fragment-Based Discovery of 7-Azabenzimidazoles as Potent, Highly Selective, and Orally Active CDK4/6 Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **3**, 445-449.
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1977): Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056-1063.
- James M. K., Ray A., Leznova D., Blain S. W. (2008): Differential modification of p27^{Kip1} controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 498-510.
- Jarvis D. L., Kowar Z. S., Hollister J. R. (1998): Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 528-533.
- Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massagué J., Pavletich N. P. (1995): Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 312-320.
- Jirawatnotai S., Hu Y., Michowski W., Elias J. E., Becks L., Bienvenu F., Zagodzón A., Goswami T., Wang Y. E., Clark A. B., Kunkel T. A., van Harn T., Xia B., Correll M., Quackenbush J., Livingston D. M., Gygi S. P., Sicinski P. (2011): A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* **474**, 230-234.
- Johannes J. W., Denz C. R., Su N., Wu A., Impastato A. C., Mlynarski S., Varnes J. G., Prince D. B., Cidado J., Gao N., Haddrick M., Jones N. H., Li S., Li X., Liu Y., Nguyen T. B., O'Connell N., Rivers E., Robbins D. W., Tomlinson R., Yao T., Zhu X., Ferguson A. D., Lamb M. L., Manchester J. I., Guichard S. (2018): Structure-Based Design of Selective Noncovalent CDK12 Inhibitors. *ChemMedChem* **13**, 231-235.
- Jorda R., Havlíček L., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Voller J., Sturc A., Navrátilová J., Kuzma M., Mistrík M., Bártek J., Strnad M., Kryštof V. (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 2980-2993.
- Knighton D. R., Zheng J. H., Ten Eyck L. F., Ashford V. A., Xuong N. H., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1991): Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li L., Wang J., Hou J., Wu Z., Zhuang Y., Lu M., Zhang Y., Zhou X., Li Z., Xiao W. et al. (2012): Cdk1 interplays with Oct4 to repress differentiation of embryonic stem cells into trophectoderm. *FEBS Letters* **586**, 4100-4107.
- Li Y., Zhang J., Gao W., Zhang L., Pan Y., Zhang S., Wang Y. (2015): Insights on Structural Characteristics and Ligand Binding Mechanisms of CDK2. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 9314-9340.
- Liu J., Kipreos E. T. (2000): Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1061-1074.
- Locatelli-Hoops S. C., Yeliseev A. A. (2014): Use of Tandem Affinity Chromatography for Purification of Cannabinoid Receptor CB₂. *Methods in Molecular Biology* **1177**, 107-120.
- Lolli G., Lowe E. D., Brown N. R., Johnson L. N. (2004): The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Structure* **12**, 2067-2079.
- Lu X. Y., Liu J., Legerski R. J. (2009): Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S phase arrest. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35325-35337.

- Malmström J., Viklund J., Slivo C., Costa A., Maudet M., Sandelin C., Hiller G., Olsson L. L., Aagaard A., Geschwindner S., Xue Y., Vasänge M. (2012): Synthesis and structure-activity relationship of 4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-thiophene-2-sulfonamides as cyclin-dependent kinase 5 (cdk5)/p25 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 5919-5923.
- Malumbres, M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**, 122.
- Mapelli M., Massimiliano L., Crovace C., Seeliger M. A., Tsai L. H., Meijer L., Musacchio A. (2005): Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 671–679.
- McGrath D. A., Fifield B. A., Marceau A. H., Tripathi S., Porter L. A., Rubin S. M. (2017): Structural basis of divergent cyclin-dependent kinase activation by Spy1/RINGO proteins. *EMBO Journal* **36**, 2251-2262.
- Mikolcevic P., Sigl R., Rauch V., Hess M. W., Pfaller K., Barisic M., Pelliniemi L. J., Boesl M., Geley S. (2012): Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 868-879.
- Norbury C., Nurse P. (1992): Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 441 – 470.
- Ortega S., Prieto I., Odajima J., Martín A., Dubus P., Sotillo R., Barbero J. L., Malumbres M., Barbacid M. (2003): Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature Genetics* **35**, 25-31.
- Pavletich N. P. (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors, *Journal of Molecular Biology* **287**, 821–828.
- Porter L. A., Kong-Beltran M., Donoghue D. J. (2003): Spy1 interacts with p27Kip1 to allow G1/S progression. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3664 – 3674.
- Rath S. L. a Senapati S. (2016): Mechanism of p27 Unfolding for CDK2 Reactivation. *Scientific reports* **6**:26450 <http://www.nature.com/articles/srep26450>
- Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massagué J., Pavletich N. P. (1996): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-331.
- Russo A. A., Tong L., Lee J. O., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1998): Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**, 237-243.
- Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., Caceres J. F., Dubus P., Malumbres M., Barbacid M. (2007): Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811–815.
- Shafiq M. I., Steinbrecher T., Schmid R. (2012): Fascaplysin as a specific inhibitor for CDK4: Insights from molecular modelling. *PLoS ONE* **7**, e42612. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042612>
- Sherr C. J., Roberts J. M. (2004): Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* **18**, 2699–2711.
- Schang L. M., Bantly A., Knockaert M., Shaheen F., Meijer L., Malim M.H., Gray N. S., Schaffer P. A. (2002): Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *Journal of virology* **76**, 7874-7882.
- Schneider E. V., Böttcher J., Blaesse M., Neumann L., Huber R., Maskos K. (2011): The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder. *Journal of Molecular Biology* **412**, 251-266.
- Schneider E. V., Böttcher J., Huber R., Maskos K., Neumann L. (2013): Structure-kinetic relationship study of CDK8/CycC specific compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 8081-8086.
- Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H. D., Morgan D. O., Meijer L., Vesely J., Kim S. H. (1995): Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins* **22**, 378-391.

- Schulze-Gahmen U., De Bondt H. L., Kim S. H. (1996): High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 4540-4546.
- Schulze-Gahmen U., Upton H., Birnberg A., Bao K., Chou S., Krogan N. J., Zhou Q., Alber T. (2013): The AFF4 scaffold binds human P-TEFb adjacent to HIV Tat. *eLife* **2**:e00327 <https://elifesciences.org/articles/00327>
- Su S. C. a Tsai, L. H. (2011): Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**, 465-491.
- Takaki T., Echaliier A., Brown N. R., Hunt T., Endicott J. A., Noble M. E. (2009): The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4171-4176.
- Tarricone C., Dhavan R., Peng J., Areces L. B., Tsai L. H., Musacchio A. (2001): Structure and regulation of the CDK5-p25(ncK5a) complex. *Molecular Cell* **8**, 657-669.
- Terpe K. (2006): Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 211-222.
- Verba K. A., Wang R. Y., Arakawa A., Liu Y., Shirouzu M., Yokoyama S., Agard D. A. (2016): Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase. *Science* **352**, 1542-1547.
- Walker R. G., Thomson G., Malone K., Nowicki M. W., Brown E., Blake D. G., Turner N. J., Walkinshaw M. D., Grant K. M., Mottram J. C. (2011): High throughput screens yield small molecule inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. *PLoS neglected tropical diseases* **5**:1033 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001033>
- Welburn J. P., Tucker J. A., Johnson T., Lindert L., Morgan M., Willis A., Noble M. E., Endicott J. A. (2007): How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 3173-3181.
- Whittaker S. R., Barlow C., Martin M. P., Mancusi C., Wagner S., Self A., Barrie E., Te Poele R., Sharp S., Brown N., Wilson S., Jackson W., Fischer P. M., Clarke P. A., Walton M. I., McDonald E., Blagg J., Noble M., Garrett M. D., Workman P. (2018): Molecular profiling and combinatorial activity of CCT068127: a potent CDK2 and CDK9 inhibitor. *Molecular Oncology* **12**, 287-304.
- Yin J., Li G., Ren X., Harrler G. (2007): Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* **127**, 335 - 347.
- Zeng X., Chen S., Huang H. (2011): Phosphorylation of EZH2 by CDK1 and CDK2: a possible regulatory mechanism of transmission of the H3K27me3 epigenetic mark through cell divisions. *Cell Cycle* **10**, 579-583.
- Zhang T., Kwiatkowski N., Olson C. M., Dixon-Clarke S. E., Abraham B. J., Greifenberg A. K., Ficarro S. B., Elkins J. M., Liang Y., Hannett N. M., Manz T., Hao M., Bartkowiak B., Greenleaf A. L., Marto J. A., Geyer M., Bullock A. N., Young R. A., Gray N. S. (2016): Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nature Chemical Biology* **12**, 876-884.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	akrylamid
AFF4	protein č.4 asociovaný s elongačním faktorem
ANS	kyselina 8-anilino-1-naftalensulfonová
APS	peroxodisíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
CAK	CDK-aktivační komplex (kinasa)
CDK	cyklin-dependentní kinasa
Cip/Kip	s CDK-interagující proteiny/kinasové inhibiční proteiny
Cyc	cyklin
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraoctová
GSH	glutathion
GSH-agarosa	glutathion-agarosa
GST	glutathion-S-transferasa
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HRV 3-C	proteasa lidského viru rýmy 3-C
Hsp	protein teplotního šoku
INK4	inhibitory třídy CDK4
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
MBP	maltosu-vázající protein
MTG	1- thioglycerol
pBR	retinoblastomový protein
P-TEFb	pozitivní transkripční elongační faktor b
RPM	otáčky·min ⁻¹
SDS	dodecylsírán sodný
Spy1	Speedy protein 1
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFIIH	obecný transkripční faktor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan