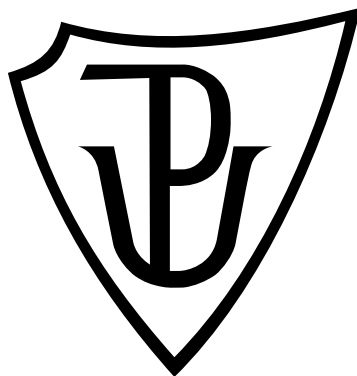


Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium selektivity klinicky testovaných inhibitorů
cyklin-dependentních kinas**

Diplomová práce

Bc. Denisa Hendrychová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Jordy, Ph.D. s použitím citovaných zdrojů.“

V Olomouci dne 2. května 2016

Podpis

SOUHRN

Inhibice cyklin-dependentních kinas (CDK) je považována za vhodnou strategii léčby rakoviny. V průběhu posledních 25 let byla vyvinuta celá řada inhibitorů CDK, přičemž některé z nich prochází klinickým testováním pro léčbu různých typů rakovin a palbociclib (PD-0332991, Ibrance) byl nedávno schválen pro léčbu metastazující rakoviny prsu. V současné době jsou nově vyvíjené inhibitory CDK testovány především vůči CDK1-CDK9 komplexům, kromě toho jsou ale také profilovány vůči širokému panelu dalších kinas pro stanovení možných nežádoucích cílů (tzv. off-targetů) v rámci kinomu. Nicméně méně známí členové CDK rodiny, CDK10-CDK20, mají také důležité biologické funkce a jejich inhibice může vést k nežádoucím vedlejším účinkům, anebo by naopak mohla být pro terapii přínosná. Teoretická část diplomové práce se zabývá důležitými vlastnostmi CDK10-CDK20 a také metodami pro stanovení inhibiční aktivity a selektivity inhibitorů proteinkinas. Praktická část práce je zaměřena na srovnání odlišných metod pro stanovení kinasové inhibiční aktivity s použitím komerčně dostupných CDK inhibitorů.

SUMMARY

Inhibition of cyclin-dependent kinases (CDKs) has been considered as a strategy for a treatment of cancer. A number of cyclin-dependent kinase inhibitors have been developed during the last 25 years. Some of them have entered clinical trials for the treatment of different types of cancer and palbociclib (PD-0332991, Ibrance) was recently approved for the therapy of metastatic breast cancer. Currently newly developed CDK inhibitors are tested especially against CDK1-CDK9 complexes. In addition, they are also profiled against broader panel of other kinases from kinome to understand their possible off-targets. However, less known members of CDK family, CDK10-CDK20, have been shown to have important biological functions so their inhibition could lead to undesirable side effects or on the contrary it could be beneficial for the therapy. The theoretical part of diploma thesis describes important properties of CDK10-CDK20 and methods for determining of inhibition activity and selectivity of protein kinases inhibitors. The experimental part is focused on the comparing of different methods for determination of kinase inhibition activity with using four commercially available CDK inhibitors.

Ráda bych na tomto místě poděkovala Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při vypracování diplomové práce. Díky patří také Mgr. Evě Řezníčkové a Mgr. Zuzaně Skráškové za podporu a cenné připomínky a především děkuji celému kolektivu pracovníků Laboratoře růstových regulátorů, zejména Janě Hudcové, Olze Hustákové, Bc. Ditě Jordové a Bc. Janě Komárkové.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Cyklin-dependentní kinasy	9
2.2	Inhibitory CDK a jejich selektivita	11
2.2.1	Studium selektivity inhibitorů CDK	15
2.3	CDK10-CDK20	17
2.3.1	CDK10	18
2.3.2	CDK11	19
2.3.3	CDK12 a CDK13	21
2.3.4	CDK14 a CDK15	23
2.3.5	CDK16, CDK17 a CDK18	25
2.3.6	CDK19	28
2.3.7	CDK20	30
2.3.8	Souhrn funkcí CDK10-CDK20	31
3	CÍL PRÁCE	32
4	MATERIÁL	33
4.1	Přístrojové vybavení	33
4.2	Použité chemikálie	33
4.3	Použité roztoky	34
4.4	Použité protilátky	35
4.5	Použité plasmidy	35
4.6	Testované inhibitory CDK	35
4.7	Kompetentní bakteriální buňky	36
4.8	Buněčné linie	36
5	METODIKA	37
5.1	Kinasová inhibiční esej s rekombinantními CDK	37
5.2	Cytometrická analýza buněčného cyklu	37
5.3	Studium fosforylace substrátů CDK	38
5.4	Lyzace, SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce	39
5.5	Buněčná termodenaturační esej (CETSA)	40
5.6	Transformace kompetentních bakterií, jejich kultivace, sklizení a izolace plasmidové DNA	40
5.7	Transfekce buněčné linie a sklizení	41

5.8	Imunoprecipitace 3xflag fúzních proteinů	41
5.9	Kinasová inhibiční esej s transkripčními CDK	42
6	VÝSLEDKY	44
6.1	Kinasová inhibiční esej s rekombinantními CDK	44
6.2	Cytometrická analýza buněčného cyklu	45
6.3	Analýza fosforylace substrátů CDK	48
6.4	Buněčná termodenaturační esej	49
6.5	Expres a imunoprecipitace 3xflag CDK12 a CDK13	51
6.6	Kinasová inhibiční esej s transkripčními CDK	53
7	DISKUSE	55
8	ZÁVĚR	60
9	POUŽITÁ LITERATURA	62
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	74

1 ÚVOD

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) plní důležitou funkci v celé řadě fyziologických procesů, zejména v regulaci buněčného cyklu, transkripce, translace a apoptosy, ale i v procesech jako je diferenciace, neurogeneze nebo spermatogeneze (Lim *et* Kaldis, 2013). Narušená aktivita CDK je spojena s vývojem celé řady nádorových onemocnění, což činí tyto kinasy atraktivním cílem pro vývoj nízkomolekulárních inhibitorů jako protinádorových léčiv (Malumbres *et* Barbacid, 2009). Jejich terapeutický potenciál však nespočívá pouze v léčbě rakoviny, ale i v léčbě diabetu, zánětlivých onemocnění, kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob, onemocnění ledvin a také infekčních chorob (Sánchez-Martínez *et al.*, 2015).

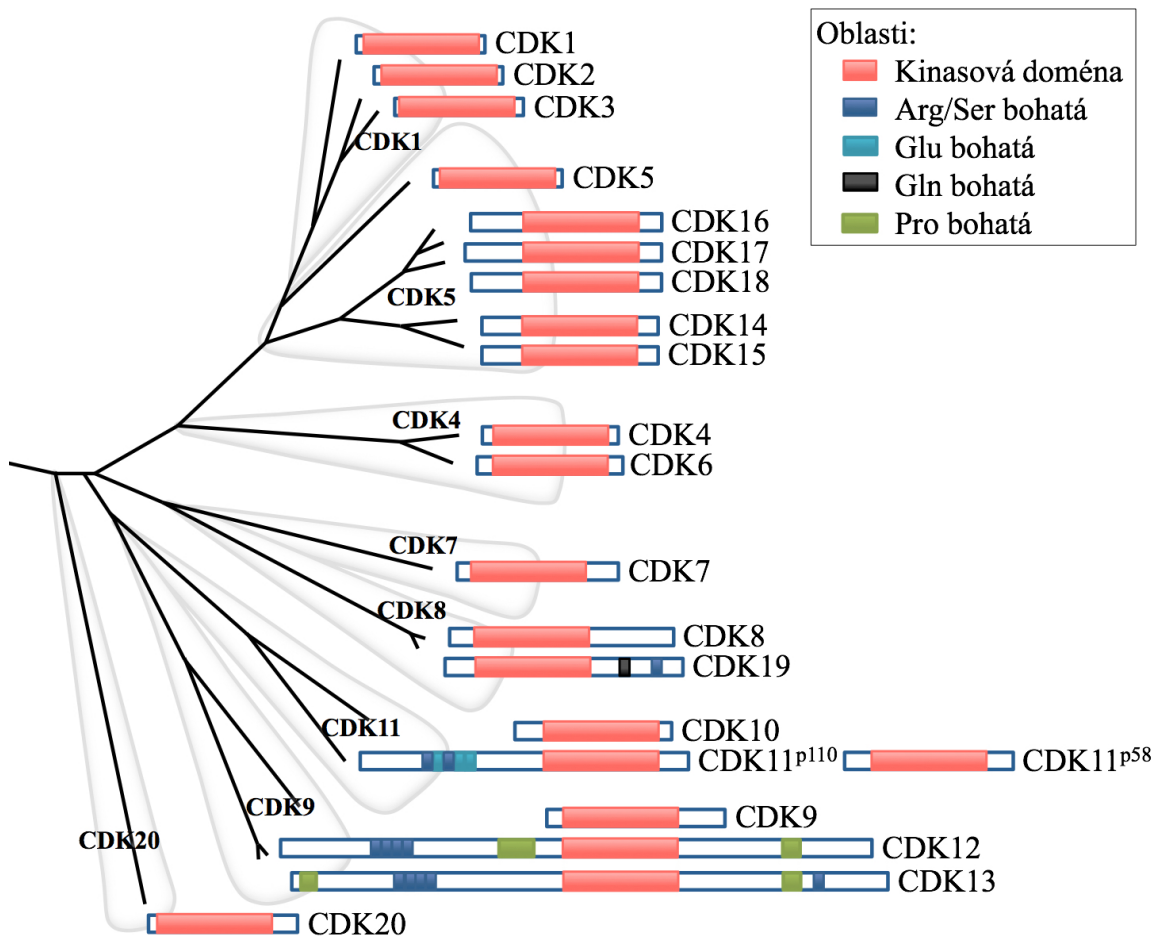
V průběhu posledních 25 let byla vyvinuta celá řada inhibitorů CDK jako protinádorových léčiv. Řada z nich úspěšně prochází klinickým testováním a palbociclib (PD-0332991, Ibrance) se stal v roce 2015 prvním schváleným léčivem ze skupiny CDK inhibitorů a to na léčbu metastazující rakoviny prsu (Beaver *et al.*, 2015). Vývoj CDK inhibitorů se v současné době snaží zaměřit na látky s užším spektrem selektivity vůči jedné nebo několika CDK. Stanovení selektivity a porozumění společným aspektům spojeným s interakcí inhibitorů s jednotlivými CDK může značně napomoci při vývoji selektivnějších inhibitorů (Smyth *et* Collins, 2009).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cyklin-dependentní kinasy

Cyklin-dependentní kinasy spadají do rodiny serin/threoninových proteinkinás. Lidský genom obsahuje 21 genů kódujících CDK1-CDK20 (CDK11 je kódována 2 geny: *CDC2L1* a *CDC2L2*) a 5 genů kódujících více vzdálenou skupinu proteinů označovaných jako CDK-like (CDKL). CDK se účastní celé řady buněčných procesů, zejména regulace buněčného cyklu a transkripce, ale i regulace translace, apoptosy, diferenciaci a neurogeneze (Lim *et al.*, 2013). Katalytická aktivita kinas je závislá především na vazbě pozitivních regulačních podjednotek, ale i na přítomnosti CDK-aktivačních kinas, CDC25 fosfatasy a na subcelulární lokalizaci CDK. Regulační podjednotky známé jako cykliny zajišťují jejich kinasovou aktivitu a substrátovou specifitu. V nepřítomnosti cyklinu jsou typicky monomerní a katalyticky neaktivní. Vazba odpovídajícího cyklinu vede ke strukturním změnám, které umožňují CDK fosforylovat cílové substráty a účastnit se tak celé řady buněčných procesů (Lim *et al.*, 2013; Malumbres, 2014). Výjimku představuje CDK5, jež je schopna interagovat s cyklinem D a E, nicméně pro její aktivaci je nezbytná vazba necyklinových proteinů p35 a p39, které jsou exprimovány především v mozku. Aktivita CDK je v buňkách regulována také negativně prostřednictvím dvou tříd endogenních inhibitorů CDK, Cip/Kip (např. p21, p27, p57) a INK4 (např. p16, p15, p18) (Kesavapany *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2013; Malumbres *et al.*, 2009).

Podle evolučních studií spadají do 8 podrodin reprezentovaných skupinami označovanými jako CDK1, CDK4 a CDK5, jejichž členové řídí buněčný cyklus, a skupiny CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20, mezi které se řadí funkční a transkripční CDK (Obr. 1). Avšak biologická funkce a regulace mnohých z nich (především CDK14-CDK20) a stejně tak funkce CDKL nejsou zcela objasněny. Jedním z důvodů je, že jejich regulační podjednotky zůstávají neznámé nebo jsou dosud málo prostudované. V průběhu několika posledních let však došlo ke značnému pokroku v jejich poznání (Cao *et al.*, 2014; Malumbres, 2014; Mikolcevic *et al.*, 2012a).



Obr. 1: Evoluční vztahy cyklin-dependentních kinas (upraveno podle Malumbres, 2014).

Podobně jako ostatní kinasy mají CDK strukturu založenou na dvou doménách. Malá N-terminální doména se skládá především z β -skládaných listů a z jediného α -helixu. Bývá označován jako C-helix a obsahuje sekvenční motiv pro vazbu příslušného cyklinu. Malá doména také obsahuje inhibiční element bohatý na glycin (G-smyčka). Velká C-terminální doména je naopak bohatá na α -helixy a obsahuje aktivační element zahrnující fosforylačně sensitivní residuum v tzv. T-smyčce. Mezi těmito doménami se nachází aktivní ATP-vazebné místo (Malumbres, 2014). Sekvenční motiv C-helixu pro vazbu cyklinu nebo podobnost s jinými CDK byly využívány pro označování tzv. „sirotčích“ kinas, pro které dosud nebyla identifikována pozitivní regulační podjednotka. V roce 1991 (Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle 1991) byla totiž sjednocena nomenklatura této kinasové rodiny, jejíž členové by měli být označováni jako CDK pouze tehdy, je-li dokázáno, že jejich aktivita je závislá na vazbě regulační podjednotky. Proto byly např. CDK14 a CDK15 dlouhou dobu označovány

jako PFTAIRE nebo CDK16-18 jako PCTAIRE (Malumbres *et al.*, 2005; Malumbres *et al.*, 2009).

Cykliny představují různorodou skupinu více než 29 proteinů klasifikovaných na základě přítomnosti konzervovaného motivu označovaného jako cyklinový box. Hladiny cyklinů se v průběhu buněčného cyklu výrazně mění a to regulací jejich exprese a proteolýzy. Degradace cyklinů je široce využívaným způsobem pro ukončení aktivity kinas. Díky těmto oscilacím v průběhu buněčného cyklu získaly název cykliny. Nicméně někteří nově objevení členové se oscilacemi nevyznačují a podílejí se na procesech nezávislých na buněčném cyklu (Evans *et al.*, 1983; Lim *et al.*, 2013; Malumbres, 2014). Cyklinový box je tvořen přibližně 100 aminokyselinami vytvářejícími 5 α -helixů. Některé cykliny mají ve své struktuře 2 cyklinové boxy. Jeden N-terminální pro vazbu a aktivaci CDK a druhý C-terminální, který obvykle zajišťuje správné složení molekuly. N- a C-terminální prodloužení vně CDK vazebné domény mají různé funkce včetně kontroly subcelulární lokalizace a stability proteinu. Cykliny jsou poměrně rigidní molekuly, které významně mění svou konformaci po vazbě kinasy. Obecně platí, že vykazují menší sekvenční podobnost než CDK (Malumbres, 2014; Mikolcevic *et al.*, 2012a).

Lze je dělit do 16 podrodin a 3 hlavních skupin (Tab. 1) označovaných jako skupina I (cyklin B skupina), skupina II (cyklin Y skupina, do které patří regulační podjednotky CDK5 podrodiny) a skupina III (cyklin C skupina, do které spadají regulační podjednotky transkripčních CDK) (Cao *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013).

Tab. 1: Rozdělení cyklinů do 3 hlavních skupin (podle Cao *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013).

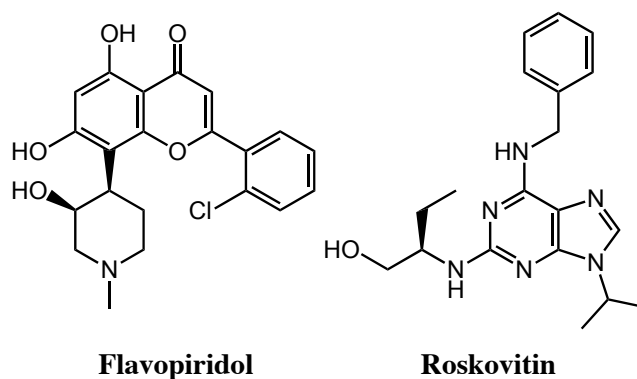
Podrodina	Členové
Skupina I (cyklin B)	Cyklin A, B, D, E, F, G, J, I, O
Skupina II (cyklin Y)	Cyklin Y
Skupina III (cyklin C)	Cyklin C, H, K, L, T, Fam58

2.2 Inhibitory CDK a jejich selektivita

V průběhu posledních 25 let byla vyvinuta celá řada inhibitorů CDK jako potenciálních protinádorových léčiv. Patří mezi ně deriváty přírodních látek i látky syntetické, které se liší chemickou strukturou, ale sdílí některé vlastnosti. Lze je dělit na vysoce selektivní preferenčně

inhibující pouze některé CDK a panselektivní inhibující širší spektrum kinas (Kryštof *et al.*, 2010; Peyressatre *et al.*, 2015).

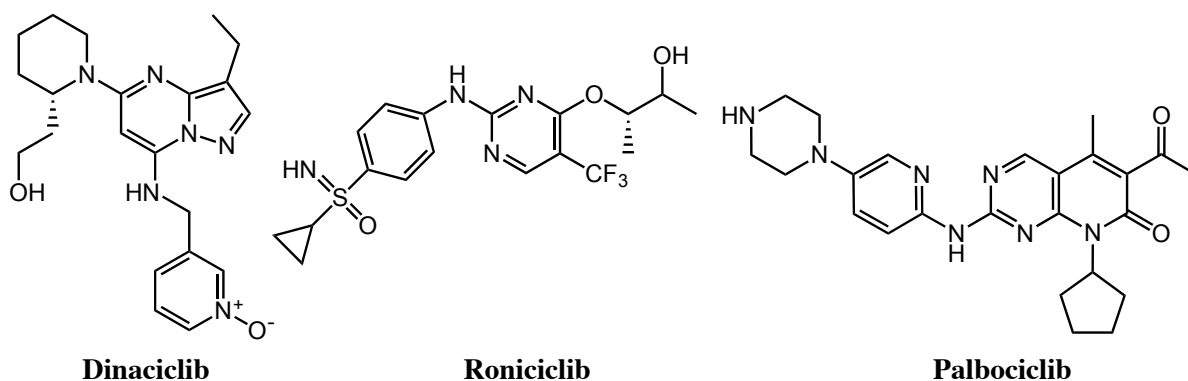
První studie z 90. let minulého století zabývající se vývojem CDK inhibitorů byly zaměřeny především na cílení CDK1 nebo CDK2. Tyto dvě kinasy byly považovány za důležité terapeutické cíle v nádorových buňkách a jejich biologie byla velmi intenzivně studována, zejména v oblasti mechanismu působení, substrátové specifity a vazebných partnerů. V roce 1993 byla také odhalena krystalová struktura CDK2 (De Bondt *et al.*, 1993), která společně se znalostí aminokyselinové sekvence kavity enzymu významně napomohla vývoji potenciálních inhibitorů CDK označovaných jako inhibitory první generace, mezi které patří např. flavopiridol (Kaur *et al.*, 1992), roskovitin (Havlíček *et al.*, 1997), CGP74514A (Imbach *et al.*, 1999), CVT313 (Brooks *et al.*, 1997) a další (Obr. 2). Z důvodu omezených znalostí o ostatních CDK a nemožnosti stanovit jejich enzymovou aktivitu v biochemickém testu, nebyla inhibiční aktivita těchto látek vůči ostatním CDK testována.



Obr. 2: Chemická struktura inhibitorů CDK z první generace.

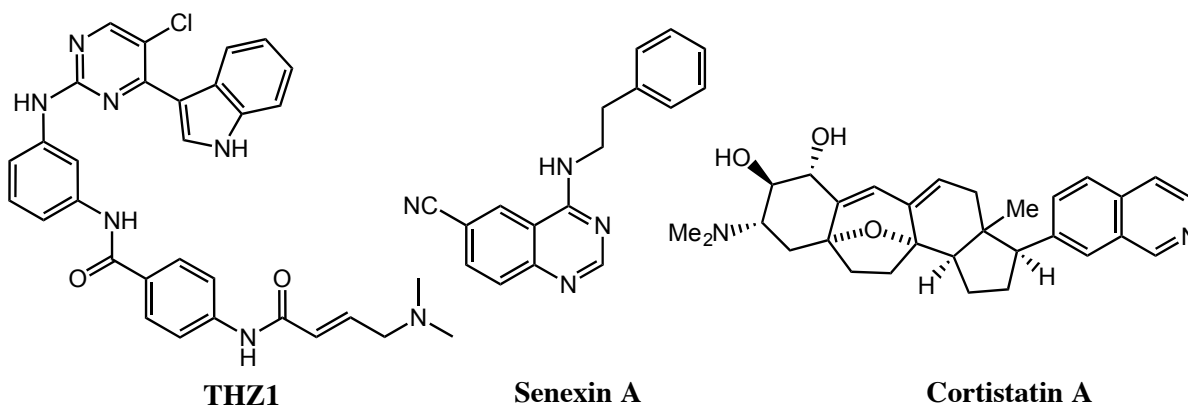
První generace inhibitorů označovaných jako panselektivní se vyznačovala relativně nízkou specifitou a určitým omezením v podobě nežádoucích vedlejších účinků (Benson *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005; Massard *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2010). Navzdory jejich slibnému potenciálu v *in vitro* testech na různých buněčných modelech se v klinických testech vyznačovaly pouze nízkou účinností. Selhání panselektivních inhibitorů v klinice je připisováno neobjasněnému a komplikovanému mechanismu účinku, který vyplývá z nízké specifity inhibitorů, a může vést k nežádoucím účinkům a toxicitě spojené s inhibicí dalších kinas (Asghar *et al.*, 2015; Smyth *et al.*, 2009). Vývoj protinádorových léčiv se proto zaměřil na inhibitory s užším spektrem selektivity vůči jedné nebo několika CDK, aby se

předešlo nepředvídatelným toxickým účinkům. Tyto sloučeniny představují druhou generaci inhibitorů CDK a mnohé z nich se nachází v různých fázích klinického testování jako např. dinaciclib (SCH-727965) (Parry *et al.*, 2010), roniciclib (BAY-1000394) (Siemeister *et al.*, 2012), AT7519 (Squires *et al.*, 2009) a další (Obr. 3). Palbociclib (PD-0332991, Ibrance) (Obr. 3) se stal v roce 2015 prvním schváleným léčivem ze skupiny CDK inhibitorů. V kombinaci s letrozolem je používán na léčbu estrogen receptor-positivního, HER2-negativního metastazujícího karcinomu prsu žen po menopauze (Beaver *et al.*, 2015).



Obr. 3: Chemická struktura klinicky testovaných inhibitorů CDK.

Velký potenciál mají také další specifické inhibitory, které jsou úspěšně zkoumány a mohly by v budoucnu vstoupit do klinických testů. Patří mezi ně např. THZ1 a jeho následník THZ2 inhibující CDK7 (Kwiatkowski *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015) nebo Senexin A (Porter *et al.*, 2012) a cortistatin A (Pelish *et al.*, 2015) inhibující CDK8 a také méně prostudovanou CDK19 (Obr. 4).



Obr. 4: Chemická struktura nových inhibitorů CDK.

Stanovení selektivity a porozumění společným aspektům spojeným s interakcí panselektivních inhibitorů může značně napomoci při vývoji selektivnějších inhibitorů CDK. Řada inhibitorů kinas klinicky používaných pro léčbu rakoviny není selektivní vůči jedné kinase, ale vyznačuje se inhibiční aktivitou vůči několika kinasám. To může být spojeno s vyšší účinností látky v případě, že tyto inhibované kinasy mají onkogenní potenciál a přispívají k progresi nádorového onemocnění, ale může také potenciálně zvyšovat riziko nežádoucích účinků a toxicity. Proto je důležité objasnit, s jakými biomolekulárními cíli může látka interagovat a které enzymy může inhibovat (Smyth *et al.*, 2009).

V současné době jsou nově vyvíjené inhibitory běžně testovány nejen vůči dostupným CDK1-CDK9 komplexům v kinasových inhibičních esejích, ale jsou také profilovány proti širokému panelu dalších kinas pro stanovení možných nežádoucích cílů (tzv. off-targetů) v rámci kinomu. Mezi takto testované CDK inhibitory patří např. PHA767491 (Montagnoli *et al.*, 2008), AT7519 (Squires *et al.*, 2009) nebo TG02 (Goh *et al.*, 2012). Postupně se zájem obrací také na kinasy CDK12 a CDK13, které nejsou běžnou součástí testů selektivity. Inhibiční aktivita vůči CDK12 byla testována např. v případě inhibitorů flavopiridol, roskovitin, RO-3306, CVT313 (Bösken *et al.*, 2014) a i-CDK9 (Lu *et al.*, 2015), vůči CDK13 pak v případě sloučeniny flavopiridol (Greifenberg *et al.*, 2016).

Některé z CDK inhibitorů jsou komerčně dostupné a využívány v řadě biologických studií. Zatímco některé inhibitory jsou precizně charakterizovány včetně jejich dalších nežádoucích cílů, velká většina včetně látek z první generace je dodávána společnostmi s nedostatečnými nebo nesprávnými informacemi o jejich selektivitě, protože v původních studiích nebyly tyto látky profilovány vůči jiným CDK. Použití inhibitorů s neznámou nebo chybně stanovenou selektivitou může vést k zavádějícím závěrům, zvláště pokud jsou použity pro studie biologických procesů spojených s funkcí některé CDK.

Roskovitin byl dříve považován za relativně specifický inhibitor CDK1, CDK2 a CDK5, nicméně pozdější studie poukázaly na to, že může inhibovat také transkripci prostřednictvím inhibice CDK7 a CDK9 (Ljungman *et al.*, 2001), a proto je dnes považován za panselektivní CDK inhibitor. Nicméně se můžeme setkat se studii, ve kterých je roskovitin brán jako specifický inhibitor určité CDK. Například při objasňování role CDK5 v procesu fosforylace androgenního receptoru byl použit jako CDK5 inhibitor bez jakékoliv zmínky o jeho aktivitě vůči ostatním CDK (Hsu *et al.*, 2011).

Jiným příkladem jsou látky CGP74514A (Imbach *et al.*, 1999) a RO-3306 (Vassilev *et al.*, 2006), které jsou prodávány jako specifické CDK1 inhibitory, ale překvapivě se vyznačují odlišným biologickým účinkem spojeným s inhibicí CDK v některých experimentech (Pernicová *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014; Jorda *et al.*, 2015). Tyto poznatky mohou vést k závěru, že specifita těchto inhibitorů by mohla být odlišná. Navíc, na rozdíl od roskovitinu, tyto dva inhibitory nikdy nebyly dále profilovány na širším panelu CDK.

2.2.1 Studium selektivity inhibitorů CDK

V současné době existuje celá řada metod, které napomáhají při studiu a vyhodnocení selektivity inhibitorů CDK. Řada z nich je založena na stanovení interakce a vazebné afinity nebo měření inhibiční aktivity látek vůči jednotlivým kinasám apod. Na základě informací získaných těmito metodami a jejich vzájemným porovnáním lze stanovit selektivitu inhibitorů. Jedna z prvních a nejčastěji používaných esejí je založena na inkorporaci radioaktivního izotopu fosfátu do substrátu, přičemž zdrojem je $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ nebo $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Díky tomu lze detekovat fosforylaci substrátu katalyzovanou příslušnou kinasou a také její případnou inhibici působením inhibitoru (Hastie *et al.*, 2009; Smyth *et al.*, 2009). Tato metoda se však vyznačuje určitými omezeními, která vyplývají z potřeby dostatečného množství radioaktivity a také nutnosti specializované likvidace. Nicméně hladinu fosforylace v kinasové esejí lze stanovit i pomocí specifických protilátek rozlišujících fosforylované formy substrátu. Využívány jsou také fluorescenční a luminiscenční eseje, které jsou snadno automatizovatelné a použitelné pro HTS. Avšak řada organických sloučenin je zbarvených nebo fluorescenčních a mohou tedy interferovat s výsledky (Gribbon *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008). Další možnost představují eseje založené na změně mobility substrátu. Fluorescenčně značený substrát se po fosforylaci vyznačuje zápornějším nábojem a tedy i odlišnou mobilitou při elektroforetické separaci na rozdíl od substrátu nefosforylovaného (Ma *et al.*, 2008). Selektivitu lze také studovat na základě stanovení vazebné afinity inhibitoru pro danou kinasu např. pomocí kompetitivní vazebné esejí nebo afinitní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Lebakken *et al.*, 2007; Slon-Usakiewicz *et al.*, 2005).

Ne všechny kinasy však lze použít v biochemických esejích v jejich plné délce. Některé například mohou vyžadovat odebrání některých sekvencí. Takto změněný protein se však může vyznačovat odlišnou aktivitou od nativního enzymu, což se může projevit ve výsledném

profilu selektivity (Smyth *et al.*, 2009). Alternativní metodou pro profilování kinas v nativním systému je „Native kinase capture immunoblot“, která využívá chemických prob založených na struktuře ATP a ADP s biotinem navázaným přes acyl-fosfátovou vazbu. Tyto chemické proby kovalentně modifikují lysinová residua v ATP-vazebném místě v podstatě všech proteinkinás a také dalších proteinů vázajících ATP. Kinasy, které nejsou po působení látky inhibovány, jsou v buněčném lyzátu naznačeny chemickou probou a mohou být vychytány streptavidinovou agarosou, eluovány a analyzovány metodou western blotting s následnou imunodetekcí. Na stejném principu je založena i metoda KiNativ (z angl. „Native kinome profiling“), která však využívá detekci hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Patricelli *et al.*, 2011; Pelish *et al.*, 2015). Tímto způsobem byla například stanovena selektivita cortistatinu A vůči CDK8 a CDK19 (Pelish *et al.*, 2015).

Interakci mezi inhibitorem a kinasami lze stanovit biofyzikálními metodami jako je např. nukleární magnetická resonance založená na stanovení rychlosti relaxace jader po působení krátkého impulsu energie, který excituje jádra specifických atomů. Další metodou je isotermická titrační kalorimetrie, při které je detekován tepelný efekt uvolněný nebo absorbovaný při vazbě molekul, nebo také povrchová plasmonová resonance (Lopez *et al.*, 2002; Patrick, 2013). MST (z angl. „MicroScale Thermophoresis“) metoda je založena na termoforéze, na řízeném pohybu molekul v mikroskopickém teplotním gradientu. Jakákoliv změna ve velikosti, náboji nebo v hydratačním obalu molekuly vede ke změně pohybu napříč teplotním gradientem a toho je využíváno pro stanovení interakcí. Pohyb molekul je detekován a kvantifikován použitím kovalentně navázaných fluoroforů a nebo je využívána vnitřní fluorescence (Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014). Poměrně zajímavou biofyzikální metodou je termodenaturační esej (TSA), která je založena na teplotní stabilizaci kinasy po vazbě inhibitoru. V této eseji byly používány převážně purifikované proteiny, nicméně nedávno byla převedena do buněčného uspořádání, ve kterém jsou zachovány postranlační modifikace, interakce s dalšími proteiny a také subcelulární lokalizace nativních kinas. V tomto uspořádání se pak označuje jako buněčná termodenaturační esej (CETSA z angl. „Cellular thermal shift assay“) (Huber *et al.*, 2015; Jafari *et al.*, 2014; Martinez Molina *et al.*, 2013; Savitski *et al.*, 2014).

V buněčném uspořádání lze sledovat pomocí specifických protilátek změnu ve fosforylaci cílových substrátů kinas. Substrát však může být fosforylován i jinými

kinasami, přičemž inhibice jedné z nich se nemusí projevit. Také např. retinoblastomový protein je fosforylován na celé řadě míst a není zcela jasné, kterým kinasám lze jednotlivé fosforylace přisuzovat. V případě látek inhibujících CDK, které regulují buněčný cyklus, lze pro ověření selektivity využít cytometrickou analýzu, při které je sledována změna distribuce buněk v jednotlivých fázích cyklu. Například inhibice CDK1 látkou RO-3306 je spojena s výrazným zablokováním buněčného cyklu v G2/M fázi (Vassilev *et al.*, 2006), zatímco inhibice CDK4 a CDK6 látkou palbociclib (PD-0332991) je spojena s výrazným G1 blokem (Fry *et al.*, 2004). Využít lze také specifických buněčných systémů, u nichž byl vyřazen gen kódující danou kinasu. Například selektivitu palbociclibu lze ověřit na základě jeho působení vůči retinoblastomový protein (Rb)-pozitivním a (Rb)-negativním nádorovým buňkám. Dle předpokládané inhibice CDK4 a CDK6 se v případě Rb-negativních buněk nevyznačuje žádnou antiproliferační aktivitou, na rozdíl od Rb-pozitivních buněk (Fry *et al.*, 2004).

Z důvodu značných omezení těchto metod se při stanovení selektivity inhibitorů nelze spoléhat pouze na jednu metodu. Aktivita stanovená v biochemických esejích by měla být také doplněna metodami využívajícími buněčné systémy, ve kterých je zachována nativní struktura proteinů, jejich postranlační modifikace, interakce i subcelulární lokalizace. Je tedy třeba použít odlišných přístupů a sledovat selektivitu k co nejširšímu spektru proteinů (Smyth *et Collins*, 2009).

2.3 CDK10-CDK20

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách při klasických testech selektivity je kladen důraz především na dobře prostudované CDK1-CDK9. Nicméně s přibývajícím znalostmi o molekulárních mechanismech probíhajících v buňkách se ukazuje, že CDK10-CDK20 mají také důležité role. Inhibice některých z nich by mohla být přínosná pro terapeutickou intervenci, anebo by naopak mohla představovat významnou komplikaci spojenou s nežádoucími vedlejšími účinky. Otázkou pak zůstává, zda se již dříve objevené a studované inhibitory nemohou vyznačovat také selektivitou vůči těmto kinasám. Například inhibice CDK10 je spojena s nežádoucí zvýšenou aktivitou MAPK kinasové dráhy (Iorns *et al.*, 2008), zatímco inhibice CDK12 vede k potlačení exprese kritických regulátorů genomové stability a podporuje tak nádorovou transformaci (Blažek, 2012). Naopak CDK20 je přímým mediátorem androgenové signalizace v buňkách hepatocelulárního karcinomu, který spouští

Wnt/ β -katenin signální dráhu a stimuluje tak progresi nádorového onemocnění. Androgenní receptor, β -katenin a CDK20 tak představují slibné cíle pro vývoj protinádorových léčiv (Feng *et al.*, 2011). Z těchto důvodů by se při vývoji inhibitorů měla sledovat také selektivita vůči těmto kinasám.

2.3.1 CDK10

CDK10 (PISSLRE) byla identifikována dvěma nezávislými studii v roce 1994. I přes to, že regulační podjednotka tohoto proteinu nebyla známa, byla původně označovaná PISLRE přejmenována na CDK10 na základě charakteristických vlastností společných pro CDK (Brambilla *et Draetta*, 1994; Graña *et al.*, 1994). Až téměř o dvacet let později bylo zjištěno, že regulačním partnerem je cyklin M. Interakce cyklinu s CDK10 pravděpodobně zvyšuje stabilitu obou proteinů a chrání kinasu před ubiquitinem zprostředkovanou degradací. V buňkách se CDK10 vyskytuje v několika isoformách, které jsou kódovány stejným genem, jehož některé transkripty podléhají alternativnímu sestřihu. Isoformy se liší lokalizací a také sekvencemi v terminálních doménách, některé dokonce postrádají kinasovou doménu. Isoformy kratší než CDK10 plné délky neinteragují s cyklinem M. Je tedy pravděpodobné, že vykonávají různé funkce (Guen *et al.*, 2013; Sergère *et al.*, 2000). Cyklin M je kódován genem *FAM58A*. Mutace vedoucí k jeho zkrácení nebo absenci jsou spojeny se STAR syndromem způsobujícím vývojové vady u člověka. U heterozygotních žen se vyznačuje abnormalitami jako je syndaktylie, telecanthus, anogenitální a renální malformace ledvin (Unger *et al.*, 2008). Mutovaný cyklin M není schopen interagovat s CDK10, což může souviset s patogenezí STAR syndromu (Guen *et al.*, 2013).

Jedny z prvních experimentů zabývajících se CDK10 poukazují na její důležitou roli v buněčném cyklu a to v progresi G2/M fáze. Zvýšená exprese neaktivní CDK10 vede k zablokování buněčného cyklu právě v G2/M fázi a k potlačení růstu (Li *et al.*, 1995).

V průměru 70 % karcinomů prsu exprimuje estrogenový receptor α (ER α) a většina z nich je plně závislá na estrogenové signalizaci (ER α^+). ER α působí jako jaderný transkripční faktor. Po vazbě ligandu, kterým je estrogen, dochází ke konformačním změnám umožňujícím dimerizaci, vazbu na DNA a expresi cílových genů. Díky této závislosti na estrogenové signalizaci mohou být karcinomy prsu efektivně léčeny anti-estrogeny jako je tamoxifen nebo inhibitory aromatasy, které zabraňují syntéze estrogenů. Tamoxifen blokuje vazbu estrogenu

na ER α a představuje tak účinný prostředek pro omezení hlavní dráhy odpovědné za aberantní proliferaci buněk rakoviny prsu. Účinnost tamoxifenu je však limitována vývojem lékové resistance nádorových buněk, která spočívá v potlačení exprese CDK10 pravděpodobně aberantní methyloací v promotorové oblasti. Tato suprese umožňuje nádorovým buňkám obejít závislost na estrogenové signalizaci a proliferovat i v přítomnosti tamoxifenu (Iorns *et al.*, 2008; Guen *et al.*, 2013). Nicméně novější studie tento způsob umlčení nepotvrdila (Heller *et al.*, 2009). Transkripční faktor ETS2, který je důležitým regulátorem genové exprese v průběhu proliferace, diferenciaci a vývoje, interaguje s CDK10 a je jejím přímým substrátem. Fosforylace dvou sousedních serinů ETS2 indukuje jeho degradaci proteasomem. Umlčení CDK10 umožňuje transkripčnímu faktoru ETS2 pozitivně regulovat expresi c-RAF a vede tedy k jeho zvýšené expresi. Proteinkinasa c-RAF následně aktivuje komponenty MAPK dráhy včetně MEK1, 2 a p42/p44 MAPK zvyšující expresi cyklinu D1. Tento mechanismus je odpovědný za resistenci rakoviny prsu vůči endokrinní terapii (Bagella *et al.*, 2006; Guen *et al.*, 2013; Iorns *et al.*, 2008; Kasten *et al.*, 2001).

Role CDK10 v karcinogenezi byla studována také v případě hepatocelulárního karcinomu (HCC), který se vyznačuje její sníženou hladinou. Pokud se obnoví exprese CDK10 dochází k potlačení buněčné proliferace, k G0/G1 bloku buněčného cyklu a inhibici migrace buněk HCC. Obnovení exprese také zvyšuje sensitivitu buněk HCC vůči chemoterapeutikům (cisplatina, epidoxorubicin) (Zhong *et al.*, 2012). Podobné výsledky byly pozorovány také v případě rakoviny varlat a žlučových cest a také u karcinomu nosohltanu (Leman *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012; You *et al.*, 2013). Tato data poskytují přesvědčivé důkazy o tom, že CDK10 může být nádorovým supresorem a nabízí se tak jako potenciální terapeutický cíl pro léčbu některých typů rakovinných onemocnění (Lim *et al.*, 2013).

2.3.2 CDK11

Krátká isoforma CDK11 (PITSLRE, CDC2L1, CDC2L2) o velikosti 58 kDa byla identifikována a charakterizována v roce 1990 (Bunnell *et al.*, 1990). V následujících letech pak bylo identifikováno několik dalších isoform včetně dlouhé isoformy o velikosti 110 kDa (Xiang *et al.*, 1994). Duplikací na chromozomu 1 vznikly dva blízké příbuzné geny *CDC2L1* a *CDC2L2* kódující nejméně 20 isoform této kinasy. Dvě hlavní isoformy představují identické proteiny plné délky o velikosti 110 kDa, CDK11^{p110}. Oba geny se však vyznačují

také přítomností sekvence IRES v kódující oblasti transkribované mRNA, která umožňuje translaci kratších alternativních proteinů o velikosti 58 kDa, CDK11^{p58}. Ačkoliv s CDK11^{p58} sdílí stejné sekvence včetně kinasové domény, isoformy mají odlišné funkce. CDK11^{p110} interaguje s cykliny typu L a lze ji detekovat ve všech fázích buněčného cyklu. Vazebným partnerem CDK11^{p58} je cyklin D3 a tato kinasová je převážně exprimována v G2/M fázi buněčného cyklu iniciací translace ze sekvence IRES. Maximální hladina CDK11^{p58} je dosažena krátce před vstupem buňky do mitosy (Cornelis *et al.*, 2000; Petretti *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). Při apoptose indukované TNF α , staurosporinem nebo Fas ligandem dochází k proteolytickému štěpení CDK11^{p58} a CDK11^{p110} kaspasami. Vzniká tak isoforma o velikosti 46-50 kDa, která obsahuje katalytickou doménu a je zapojena do apoptotické signalizace (Hao *et al.*, 2011; Mikolajczyk *et Nelson*, 2004).

Dlouhá isoforma CDK11^{p110} interagující s cyklinem L koordinuje transkripci. Vyskytuje se ve velkém multiproteinovém komplexu obsahujícím RNA polymerasu II a nejméně 4 transkripční elongační faktory. Také se podílí na zpracování RNA prostřednictvím fosforylace a interakce se sestřihovacími faktory (např. RNPS1, SC35 a 9G8) (Hu *et al.*, 2003; Loyer *et al.*, 2008; Trembley *et al.*, 2002). CDK11^{p110} je fosforylována kinasou CHK2 na pozici Ser737. Tato modifikace je nezbytná pro homodimerizaci CDK11^{p110}, ta však neovlivňuje její kinasovou aktivitu a ani vazbu cyklinu L. Vyřazení CHK2 z funkce však výrazně redukuje sestřihovací aktivitu (Choi *et al.*, 2014). Umlčení CDK11^{p110} potlačuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptosu buněk liposarkomu i osteosarkomu. Z tohoto důvodu může být slibným terapeutickým cílem pro léčbu těchto nádorových onemocnění (Feng *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2014).

CDK11^{p58} patří mezi mitotické CDK. Její kinasová aktivita je důležitá pro duplikaci centriol, maturaci centrosomů, pro formování bipolárního vřeténka a kromě toho také pro udržení koheze sesterských chromatid. Umlčení této kinasy vede k mitotickým abnormalitám a k aktivaci mitotického kontrolního bodu. Mitotické buňky se vyznačují krátkými nebo monopolárními vřeténky a také sníženou centrosomální hladinou γ -tubulinu, PLK1 a Aurory A, tedy proteinů důležitých pro nukleaci mikrotubulů a stabilizaci vřeténka. CDK^{p58} také pravděpodobně souvisí s lokalizací proteinů Bub1 a Sgo1 na centromerách pro udržení koheze sesterských chromatid (Franck *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2007; Petretti *et al.*, 2006; Rakkaa *et al.*, 2014). Kromě toho se krátká isoforma CDK11 podílí také na hormon-

receptorové signalizaci. V komplexu s cyklinem D3 reguluje transkripční aktivitu steroidních receptorů, androgenového (AR), estrogenového receptoru (ER) a receptoru pro vitamín D (VDR). CDK11^{P58} fosforyluje Ser308 AR a inhibuje tak jeho transkripční aktivitu, zatímco v případě ER a VDR receptorů podněcuje jejich ubiquitin-proteasomovou degradaci. Ztráta aktivity CDK11^{P58} a tedy i schopnosti potlačit funkci těchto steroidních receptorů může vést k abnormální proliferaci a k vývoji nádorových onemocnění jako je rakovina prostaty nebo prsu. Zvýšená exprese této isoformy je obvykle spojena s lepší prognózou onemocnění (Chi *et al.*, 2009; Chi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009; Zong *et al.*, 2007).

2.3.3 CDK12 a CDK13

CDK13 (CHED, CDC2L5) byla identifikována v roce 2000, zatímco CDK12 (CRKRS, CRKR, CRK7) až o rok později (Ko *et al.*, 2001; Marqués *et al.*, 2000). Jde o neobvykle velké kinasy, jejichž doménové složení je velmi podobné. Kinasové domény obou proteinů jsou tvořeny přibližně 300 aminokyselinami a jejich sekvence se vyznačují vysokou similaritou (více než 93 %). Obě CDK obsahují PITAIRE motiv a mimo jiné také na arginin a serin bohaté motivy, které se vyskytují u sestřihových faktorů a regulátorů sestřihu (Kohoutek *et Blažek*, 2012). Protože regulační podjednotky těchto CDK nebyly zpočátku známy, byly označovány jako CRKRS a CDC2L5 (Ko *et al.*, 2001; Marqués *et al.*, 2000). Na základě interakce s cyklinem L při jeho exogenně zvýšené expresi, byl tento cyklin mylně považován za regulační podjednotku CDK12 i CDK13 (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007), avšak novější studie odhalily, že regulačním partnerem těchto kinas je cyklin K (Bartkowiak *et al.*, 2010; Blažek *et al.*, 2011).

CDK12 a CDK13 spolu s CDK7, CDK8 a CDK9 spadají do skupiny transkripčních CDK. Podílejí na fosforylaci C-terminální domény (CTD) RNA polymerasy II (RNAPII), která se vyskytuje na její největší podjednotce Rpb1. Tato doména obsahuje evolučně konzervovaný heptapeptid Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇, jehož seriny, tyrosin a threonin mohou být fosforylovány. Fosforylace CTD a také další postranlační modifikace společně formují tzv. CTD kód, který je důležitý pro regulaci aktivity RNAPII v průběhu transkripce. Série různých modifikací a konformačních změn CTD generují konfigurace specifické pro vazbu konkrétních proteinů. CTD v podstatě slouží jako kostra pro vazbu proteinů důležitých v jednotlivých fázích transkripce a také koordinuje transkripci s dalšími událostmi nezbytnými

pro správnou expresi genů. CDK9 byla dlouhou dobu považována za hlavní kinasu fosforylující Ser2 RNAPII, nicméně za tyto fosforylace je ze značné části odpovědná také CDK12. Vyřazení CDK12 z funkce vedlo k výraznému poklesu fosforylace Ser2, stejně tak v případě vyřazení cyklinu K. Pokud však byla vyřazena CDK13, pokles fosforylace Ser2 nebyl zaznamenán, nicméně došlo k mírnému poklesu v celkové fosforylaci CTD (Bartkowiak *et al.*, 2010; Blažek *et al.*, 2011; Buratowski, 2003; Buratowski, 2009; Kohoutek *et Blažek*, 2012; Peterlin *et Price*, 2006).

CDK12 reguluje expresi malé skupiny genů, která zahrnuje převážně dlouhé, komplexní geny včetně genů zapojených do odpovědi na poškození DNA (DDR z angl. „DNA damage response“). DDR je komplexní signální dráha důležitá pro udržení genomové stability. Tato stabilita je nezbytná pro přežití buněk a ochranu organismu před vznikem řady onemocnění včetně rakoviny. DDR je schopna detekovat poškození DNA a replikační stres a vyvolávat náležitou buněčnou odpověď. Vyřazení CDK12 z funkce vede k poklesu exprese kritických regulátorů genomové stability, konkrétně BRCA1, ATR, FANCI, FANCD2, avšak umlčení CDK13 nevede k žádným signifikantním změnám v hladině těchto proteinů (Ciccia *et al.*, 2010; Blažek *et al.*, 2011; Blažek, 2012). Udržování genomové stability je také významné v průběhu časného embryonálního vývoje. Poškození DNA vyskytující se v průběhu replikace jsou velmi častá u myších embryonálních buněk a jejich oprava je důležitá pro úspěšný vývoj embrya. CDK12 ovlivňující expresi některých DDR genů má tak nepřímo vliv na účinnost reparace DNA. Vyřazení cyklinu C z funkce u myších embryí vede k letalitě krátce po implantaci. To naznačuje, že CDK12 a/nebo CDK13 v komplexu s cyklinem C hrají důležitou roli v průběhu embryonálního vývoje (Blažek *et al.*, 2011; Juan *et al.*, 2015).

Vzhledem k důležité roli CDK12 při transkripci a udržování stability genomu není překvapující, že změna aktivity této kinasy byla identifikována u mnoha nádorů. *CDK12* spolu s *BRCA1* a *BRCA2* patří mezi nejčastěji somaticky mutované geny v případě rakoviny vaječnicků. Mutace postihující kinasovou doménu obvykle způsobují ztrátu katalytické aktivity CDK12, jež vede ke snížení hladiny BRCA1 a dalších proteinů důležitých pro opravu DNA prostřednictvím homologní rekombinace. Narušení funkce CDK12 tedy způsobuje defekty opravných mechanismů a může vést k rozvoji rakoviny vaječnicků (Bell *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2014; Ekumi *et al.*, 2015). V případě rakoviny žaludku dochází k rozsáhlým strukturním změnám vedoucím ke genové fúzi *CDK12* s *ERBB2* kódujícím receptorovou tyrosin kinasu

HER2 (Zang *et al.*, 2011), zatímco u rakoviny prsu dochází ke společné amplifikaci těchto dvou genů (Benusiglio *et al.*, 2006). V současné době existuje pouze málo informací o klinické významnosti CDK13. Zvýšené hladiny CDK13 byly zaznamenány u pacientů s refrakterní anémií (Malcovati *et al.*, 2009).

2.3.4 CDK14 a CDK15

CDK14 (PFTAIRE1, PFTK1) aktivovaná cyklinem D3 (Shu *et al.*, 2007) a Y (Jiang *et al.*, 2009) byla poprvé identifikována v roce 1997 v nervovém systému myši. O několik let později byla identifikována také v lidském organismu (Lazzaro *et Julien*, 1997; Yang *et Chen*, 2001). Na základě stanovení interakce CDK14 s cyklinem D3 a s p21^{Cip1} inhibítorom byla původně označovaná PFTAIRE1 nebo PFTK1 přejmenována na CDK14. Tyto tři proteiny formují stabilní ternární komplex, ve kterém cyklin D3 zvyšuje aktivitu CDK14, zatímco p21^{Cip1} ji inhibuje. Současně bylo zjištěno, že CDK14 působí jako kinasa regulující progresi G1/S fázi buněčného cyklu a nádorový supresor Rb byl navržen jako její potenciální substrát (Shu *et al.*, 2007). Druhým interagujícím cyklinem je cyklin Y, který je regulační podjednotkou nejen CDK14, ale i CDK16. Vyznačuje se N-terminálním myristoylačním signálem umožňujícím jeho ukotvení na plasmatickou membránu společně s příslušnou interagující CDK (Jiang *et al.*, 2009; Mikolcevic *et al.*, 2012a).

Kinasová doména CDK14 se díky interakci s cyklinem Y dostává k plasmatické membráně do těsné blízkosti svého substrátu, kterým je transmembránový koreceptor Lrp5/6 důležitý ve Wnt/ β -katenin signalizaci (Davidson *et al.*, 2009). Wnt/ β -katenin signální dráha kontroluje vývojové procesy a také podporuje progresi buněčného cyklu zesílením transkripce cílových genů kódujících např. c-Myc a cyklin D. β -katenin a některé další Wnt regulátory navíc regulují formaci a orientaci mitotického vřeténka a také segregaci chromozomů (Davidson *et Niehrs*, 2010; Olmeda *et al.*, 2003). Na počátku signalizace Wnt růstový faktor interaguje s transmembránovým proteinem Frizzled, který následně oligomerizuje s koreceptorem Lrp5/6. CDK14 v komplexu s cyklinem Y na přelomu G2/M fázi fosforyluje intracelulární doménu Lrp5/6 na pozici Ser1490, přičemž tato modifikace je nezbytná pro jeho aktivitu. Fosforylovaný Lrp5/6 brání fosforylaci β -kateninu, který se translokuje do jádra, kde působí jako koaktivátor transkripce Wnt cílových genů. Kromě toho se také účastní důležitých procesů v mitose. V nepřítomnosti Wnt ligandu se vytváří destrukční komplex

fosforylující β -katenin, který je degradován ubiquitin-proteasomovým systémem (Davidson *et Niehrs*, 2010; Kaldis *et Pagano*, 2009; Lim *et Kaldis*, 2013).

U řady nádorových onemocnění jako je např. hepatocelulárního karcinomu (Pang *et al.*, 2007), karcinomu vaječnicků (Zhang *et al.*, 2016) nebo rakovina prsu (Gu *et al.*, 2015) se CDK14 vyznačuje zvýšenou expresí, která koreluje s agresivnějším fenotypem nádorů, se zvýšenou pohyblivostí a migrací nádorových buněk. V primárních nádorech hepatocelulárního karcinomu CDK14 aktivně fosforyluje TAGLN2 a inaktivuje tak jeho supresivní efekt na polymeraci aktinu. Dalším substrátem CDK14 je kaldesmon, což je vazebný protein aktinu, jehož fosforylace je také spojena s modulací aktinu a s migrací buněk. Umlčení CDK14 potlačuje buněčnou proliferaci, migraci a invazi. Tato kinasa tedy zřejmě podporuje proliferaci a zvyšuje metastatický potenciál maligních nádorů, nicméně přesný mechanismus dosud není znám (Leung *et al.*, 2011a; Leung *et al.*, 2011b; Zhang *et al.*, 2016).

Přestože CDK15 (PFTAIRE2, PFTK2, APFTK2, ALS2CR7) byla objevena již v roce 2001, patří mezi velmi málo prostudované kinasy. Na základě přítomnosti konzervovaného motivu PFTAIRE a okolních sekvencí je velmi pravděpodobné, že je aktivována cyklinovým partnerem, a proto může být označována jako CDK15. S CDK14 sdílí 60% identitu a předpokládá se, že mohou sdílet i určitou substrátovou specifitu. CDK15 je pravděpodobně také zapojena ve Wnt/ β -katenin signalizaci (Malumbres, 2009; Kaldis *et Pagano*, 2009; Mikolcevic *et al.*, 2012a).

Ligand TRAIL představuje slibný terapeutický cíl při léčbě rakoviny. Selektivně indukuje apoptosu v různých typech rakovinných buněk, aniž by způsoboval toxicitu u normálních lidských buněk, a to různými molekulárními mechanismy. Nicméně jeho terapeutický potenciál je limitován v případě některých typů rakovinných buněk, které jsou resistantní vůči TRAIL indukované buněčné smrti. Právě CDK15 přispívá k resistenci těchto rakovinných buněk (Park *et al.*, 2014). Prostřednictvím přímé vazby indukuje fosforylaci antiapoptotického proteinu survivinu na threoninu v pozici 34, která je nezbytná pro jeho stabilitu. CDK15 zvyšuje expresi proteinů důležitých pro přežití buněk jako je právě survivin a také Bcl-2. Navíc blokuje TRAIL indukovanou aktivaci kaspas 8, 3 a 9 a také štěpení proteinu poly(ADP-ribosa) polymerasa (PARP). Vyřazení endogenní CDK15 z funkce značně zvyšuje citlivost buněk k TRAIL indukované buněčné smrti (O'Connor *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2014).

2.3.5 CDK16, CDK17 a CDK18

PCTAIRE (PCTK) kinasy byly identifikovány již v roce 1992 (Meyerson *et al.*, 1992). Představují atypické CDK, které jsou charakterizovány kinasovou doménou s N- a C-terminálními prodlouženími, která se výrazně odlišují od ostatních kinas. C-terminální prodloužení jsou vysoce konzervovaná v rámci této skupiny (až 77% identita), zatímco N-terminální prodloužení se značně odlišují a předpokládá se, že definují specifické funkce jednotlivých členů této skupiny (Hirose *et al.*, 2000). Prodloužení hrají důležitou roli v protein-protein interakcích včetně interakce s cyklinem a také regulují kinasovou aktivitu (Mikolcevic *et al.*, 2012b).

CDK16 (PCTAIRE1, PCTK1) je nejlépe prostudovanou kinasou této skupiny, jejíž regulační podjednotkou je cyklin Y. Je fosforylována na celé řadě míst. Fosforylace Ser153 a Ser119 N-terminální domény zabraňuje vazbě cyklinu Y a naopak vytváří vazebný motiv pro protein 14-3-3. Potenciální kinasou odpovědnou za tyto fosforylace je proteinkinasa A (PKA). Údaje naznačují, že v závislosti na fosforylačním stavu se CDK16 může vyskytovat ve vazbě s cyklinem Y na cytoplasmatické membráně nebo ve vazbě s 14-3-3 v cytoplasmě (Graeser *et al.*, 2002; Mikolcevic *et al.*, 2012b). Do regulace aktivity CDK16 je také zapojena CDK5 v komplexu s p35, se kterým CDK16 přímo interaguje. Fosforylace prostřednictvím CDK5 zvyšuje kinasovou aktivitu CDK16 (Cheng *et al.*, 2002). Tyto poznatky však pocházejí z prvotních studií o CDK16 a mnohé aspekty zůstávají stále neobjasněny.

Jako substrát CDK16 byl identifikován protein NSF, který je nezbytný pro vesikulární transport a pro fúzi synaptických vesikul s presynaptickou membránou. CDK16 interaguje s NSF a ovlivňuje jeho hexamerizaci prostřednictvím fosforylace a zajišťuje jeho správné fungování při fúzi membrán (Liu *et al.*, 2006). Druhá nezávislá studie odhalila interakci CDK16 a také CDK18 s Sec23p podjednotkou COPII komplexu uplatňujícího se při vesikulárním exportu z endoplasmatického retikula (Palmer *et al.*, 2005). Tato zjištění otevřela novou cestu ve studiu funkční role CDK16 v nervovém systému. Genetické analýzy prováděné s *Caenorhabditis elegans* identifikovaly CDK16 jako důležitou kinasu při polarizovaném transportu presynaptických proteinů k axonům a dendritům. Společně s CDK5 jsou tyto kinasy nezbytné pro správnou funkci neuronů (Ou *et al.*, 2010). Cyklin Y se navíc účastní procesu synaptické eliminace, který je velmi jemně koordinován se synaptogenezí. K těmto procesům dochází nejen při počáteční konstrukci nervových

obvodů, ale i při modifikacích zralého nervového systému (Park *et al.*, 2011). Zda má CDK16 v savčím nervovém systému stejné funkce, dosud nebylo zjištěno a mohlo by to být zajímavým objektem pro další studie.

Ve varlatech plní důležitou roli v závěrečných fázích spermatogeneze. Myši deficitní na CDK16 se vyvíjejí normálně oproti kontrolním jedincům, jsou životaschopné, avšak myši samci jsou sterilní. Nedostatek CDK16 nemá vliv na meiotické dělení, nicméně přítomnost této kinasy je nutná pro diferenciaci buněk v koncových fázích spermatogeneze. Výsledným fenotypem je astenozoospermie charakterizovaná morfologickými abnormalitami spermií, které přispívají k neplodnosti. V somatických buňkách jsou některé CDK zřejmě schopny převzít funkci CDK16. Nejpravděpodobnějšími kandidáty jsou CDK17 a CDK18 nebo také CDK14 a CDK15. Bližší pochopení funkce CDK16 ve vývoji mužských zárodečných buněk by mohlo napomoci ve vývoji účinnějších terapeutik pro léčbu reprodukčních dysfunkcí u mužů (Mikolcevic *et al.*, 2012b).

Mimo jiné je také vysoce exprimována v kosterním svalstvu a je pozitivním regulátorem myogenní diferenciaci. Jedná se o vícestupňový proces nezbytný pro vývoj kosterních svalů v průběhu embryonálního vývoje i postnatálního života. Jednojaderné myoblasty diferencují do podoby protáhlých myocytů, jež následně migrují, adherují a fúzí pro vytvoření mnohojaderných myotubů a na závěr zralých svalových vláken. Promyogenní účinky CDK16 zřejmě spočívají v regulaci migrace a fúze myoblastů (Shimizu *et al.*, 2014).

Maligní melanom se vyznačuje zvýšenou expresí CDK16, jejíž vyřazení z funkce potlačuje buněčný růst a vede k akumulaci nádorového supresoru p27, který patří do rodiny endogenních inhibitorů CDK. CDK16 interaguje s proteinem p27 a fosforyluje serin v pozici 10. Tato modifikace vede k jeho degradaci. Nízká hladina p27 byla zaznamenána u celé řady lidských malignit a je spojena s horší prognózou onemocnění. Inhibice CDK16 vede k obnovení hladiny p27 a následně k apoptose buněk maligního melanomu a k celkovému potlačení růstu tumoru. CDK16 by díky tomu mohla být významným cílem pro vývoj inhibitorů. Snížená proliferace nádorových buněk v důsledku umlčení CDK16 byla také pozorována u buněk rakoviny prostaty, prsu a děložního čípku, u kterých došlo k zablokování buněčného cyklu v G2/M fázi v souvislosti s deregulací centrosomů a k následné apoptose. Efekt umlčení CDK16 je tedy heterogenní u různých nádorových linií (Yanagi *et al.*, 2014a; Yanagi *et al.*, 2014b; Yanagi *et Matsuzawa*, 2015).

CDK17 (PCTAIRE2, PCTK2) je další kinasou spadající do skupiny PCTAIRE. Předpokládá se, že je aktivována regulační podjednotkou, ta však stále zůstává neznámá. Interaguje s TRAP a s IK3-1/Cables, nicméně žádná z těchto interakcí nestimuluje její kinasovou aktivitu (Mikolcevic *et al.*, 2012b). TRAP se vyznačuje přítomností 5 repetitivních tudor-like domén v sekvenci C-terminální domény. S CDK17 asociuje právě prostřednictvím této C-terminální domény, přičemž pro vazbu postačují pouze dvě tudor-like domény. Jednou z funkcí těchto domén může být právě zajišťování protein proteinových interakcí. TRAP je také vazebným partnerem CDK16 nikoliv však CDK18. Tkáňová a subcelulární lokalizace TRAP koreluje s distribucí CDK17, která je exprimována především v mozku v terminálně diferencovaných neuronech. Na základě asociace TRAP a CDK17 s mitochondriemi byla vytvořena hypotéza, zda společně s dalšími proteiny mohou mít roli v regulaci mitochondriální funkce v neuronech (Hirose *et al.*, 2000). IK3-1/Cables interaguje s CDK17 a TRAP, nicméně není známo, zda interaguje prostřednictvím TRAP nebo přímo s kinasou a ani jak je tento protein zapojen do jejich funkce (Yamochi *et al.*, 2001).

CDK18 (PCTAIRE3, PCTK3) je aktivována vazbou cyklinu A2 a patří mezi velmi málo prostudované CDK. Fosforylací Ser12 prostřednictvím PKA se zvyšuje její katalytická aktivita i bez přítomnosti cyklinu a předpokládá se, že tato fosforylace je nezbytná pro její aktivaci. Kromě Ser12 PKA fosforyluje také Ser66 a Ser109. Tyto fosforylace by podobně jako u CDK16 mohly vytvářet vazebný motiv pro protein 14-3-3. CDK18 interaguje také s cyklinem E1, nicméně po jeho vazbě nedochází k aktivaci kinasy (Matsuda *et al.*, 2014; Meek *et al.*, 2004).

Gen *CDK18* je cílem chimérického syntetického CTS-1, který se chová jako transkripční faktor a je analogem proteinu p53. U buněk gliomu indukuje buněčnou smrt a to nezávisle na hladině endogenního p53, nicméně biochemická dráha odpovědná za CTS-1 indukovanou smrt zůstává neobjasněna. CTS-1 pravděpodobně vyvolává specifické změny v expresi cílových genů odlišné od změn vyvolaných p53 a nebo vyvolává stejné změny ale v efektivnějším měřítku. Jedním z cílových genů CTS-1 je právě *CDK18* a předpokládá se, že může být i cílovým genem p53. Adenovirálně zprostředkovaná exprese CDK18 v některých nádorových liniích odvozených od gliomu inhibuje proliferaci a indukuje buněčnou smrt. CDK18 tedy přispívá k antigliomové aktivitě CTS-1 (Neumann *et al.*, 2006).

V mozkové tkáni pacientů s Alzheimerovou chorobou byla zaznamenána aberantní exprese proteinů buněčného cyklu a také zvýšená exprese CDK18. K patogenezi tohoto onemocnění připívá hyperfosforylace proteinu Tau a amyloidového prekurzorového proteinu prostřednictvím kinas. Právě CDK18 působí jako jeden z efektorů těchto fosforylací stimulací endogenních kinas nebo inhibicí fosfatas. Hyperfosforylace způsobuje agregaci Tau a formování vysoce organizovaných filamentových struktur. Filamenta se akumulují v neuronech a přispívají k tvorbě neurofibrilárních klubek a amyloidních plaků, které jsou hlavními patologickými markery této choroby (Herskovits *et Davies*, 2006).

2.3.6 CDK19

CDK19 (CDC2L6, CDK8-like, CDK8L) se vyznačuje vysokou sekvenční homologií s CDK8 (94% homologie katalytických domén) a zřejmě i funkční podobností (Malumbres *et al.*, 2009). Obě kiny jsou aktivovány cyklinem C a jsou součástí mediátorového komplexu zapojeného v regulaci RNAPII v průběhu transkripce, nicméně zřejmě mohou fungovat i mimo mediátorový komplex (Sato *et al.*, 2004). Mediátorový komplex funguje jako molekulární most neboli proteinové spojení mezi RNAPII, obecnými transkripčními faktory, DNA-vazebnými proteiny, transkripčními elongačními faktory a také proteiny interagujícími s chromatinem. Mediátor je schopen integrovat tyto signály pro zajištění precizní kontroly RNAPII a pro koordinaci procesů spojených s transkripcí. Je tvořen 25-30 proteiny a reversibilně asociuje s kinasovým modulem, jehož součástí je CDK8 nebo CDK19 s cyklinem C. Tyto kiny jsou schopny fosforylovat Ser5 CTD RNAPII v *in vitro* podmínkách, nicméně význam tohoto procesu *in vivo* není znám (Galbraith *et al.*, 2010; Galbraith *et al.*, 2013; Malik *et Roeder*, 2010; Tsutsui *et al.*, 2011). Je známo, že CDK8-modul kompetuje s RNAPII o vazebné místo mediátorového komplexu a primárně byla tedy CDK8 spojována s represí transkripce, nicméně může fungovat i jako pozitivní transkripční regulátor (Fukasawa *et al.*, 2012). Přestože CDK8 i CDK19 asociují s velmi podobnými mediátorovými komplexy, je pravděpodobné, že nejsou funkčně zastupitelné. Odlišné složení CDK-modulů pravděpodobně zvyšuje regulační diversitu a specifitu (Galbraith *et al.*, 2013).

Substrátem kinas CDK3, CDK8 a CDK19 interagujících s cyklinem C je intracelulární doména Notch1 (ICN1). Signální dráha Notch1 je významným faktorem ovlivňujícím sebeobnovu a diferenciaci tkání a také koordinuje proliferaci, diferenciaci a zrání T-buněk.

Aktivace Notch1 je spuštěna ligand-dependentním štěpením způsobujícím uvolnění ICN1 proteinů, které jsou translokovány do jádra, kde spouští expresi cílových genů. CDK3, CDK8 a CDK19 fosforylují ICN1, což vede ke zvýšené ubiquitylaci a následné degradaci proteasomem. Narušení této funkce stabilizuje ICN1 a zrychluje vývoj T-buněčné akutní lymfoblastické leukémie (T-ALL) u myších modelů. Kodelece genu *CCNC* kódujícího cyklin C a genu *CDK19* byla zaznamenána u 10 % případů T-ALL. Tyto poznatky podporují teorii, že cyklin C, CDK3, CDK8 a CDK19 jsou nádorové supresory, jejichž narušení může přispívat k rozvoji některých lidských leukémií (Li *et al.*, 2014; Trakala *et al.*, 2014). Nicméně u 50 % případů rakoviny tlustého střeva dochází k amplifikaci *CDK8* a také ke zvýšené expresi tohoto genu. Potlačení exprese *CDK8* inhibuje proliferaci buněk tumoru (Firestein *et al.*, 2008). U pacientů s rakovinou prsu a vaječníků koreluje zvýšená exprese cyklinu C a *CDK8* s horší prognózou (Porter *et al.*, 2012). Cyklin C, *CDK8* a *CDK19* tedy v některých případech fungují jako nádorové supresory, v jiných jako onkogeny a z tohoto důvodu by mělo být pečlivě zváženo použití farmakologických inhibitorů v závislosti na typu tkáně (Aleem *et al.*, 2015).

Cortistatin A (CA) se vyznačuje silnými antiproliferačními vlastnostmi u některých typů akutní myeloidní leukémie (AML). Je selektivním inhibitorem mediátorových kinas *CDK8* a *CDK19*, které potlačují vysokou expresi klíčových nádorově supresorových genů asociovaných se „super-enhancery“ (SE) v buňkách AML (Cee *et al.*, 2009; Pelish *et al.*, 2015). SE jsou tvořeny shluky transkripčních enhancerových elementů a jsou hustě pokryty transkripčními faktory, kofaktory, mediátorem a regulátory chromatinu. Jsou asociovány především s geny, které kontrolují a definují buněčnou identitu. Řídí jejich expresi, která je mnohem vyšší než u genů asociovaných s klasickými transkripčními enhancery. Zatímco CA indukuje zvýšenou expresi klíčových SE-asociovaných genů v CA-sensitivních AML buněčných liniích, inhibitor I-BET151 inhibující BRD4 naopak indukuje sníženou expresi těchto genů, nicméně má také antiproliferační vlastnosti. Tyto poznatky ukazují, že některé leukémické buněčné linie jsou sensitivní jak vůči zvýšené, tak i snížené expresi těchto genů. Mediátorové kinasy se tak mohou stát novým farmakologickým cílem pro vývoj terapeutické léčby některých typů AML (Boyer, 2015; Hnisz *et al.*, 2013; Pelish *et al.*, 2015; Whyte *et al.*, 2013).

2.3.7 CDK20

CDK20 (PNQALRE, CCRK, p42) byla identifikována v roce 2004, nicméně první zmínky pocházejí již z roku 2000. Patří mezi „sirotčí“ CDK, pro které dosud nebyl identifikován aktivující cyklin. Vyznačuje se sekvenční homologií s CDK7, což je CDK-aktivační kinasa (CAK) důležitá jak pro buněčný cyklus, tak i pro regulaci transkripce. CDK20 je druhou CAK v lidských buňkách, která je důležitá pro aktivaci CDK2. Fosforyluje CDK2 na pozici Thr180 v T-smyčce a umožňuje tak progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze (Kaldis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2012). CDK20 také fosforyluje a aktivuje kinasy MAK a MRK/ICK, které se velmi podobají CDK2 (Fu *et al.*, 2006). Nicméně její role v aktivaci kinas je sporná z toho důvodu, že další studie tuto funkci naopak vyvrátila a podpořila teorii, že CDK7 je doposud jedinou CAK, alespoň v buňkách HCT116 a U2OS. Při vyřazení CDK20 z funkce byla zaznamenána snížená buněčná proliferace, ale žádná redukce ve fosforylaci T-smyčky CDK2 (Wohlbold *et al.*, 2006).

CDK20 je nadměrně exprimována u širokého spektra lidských nádorů jako je glioblastom (Ng *et al.*, 2007), karcinom vaječnicků (Wu *et al.*, 2009), kolorektální (An *et al.*, 2010) a hepatocelulární karcinom (HCC) (Feng *et al.*, 2011) a bývá spojována s horší prognózou u pacientů. CDK20 pozitivně reguluje progresi buněčného cyklu a růst tumoru a může být kandidátním onkogenem u těchto typů rakovin a také potenciálním prognostickým markerem (Tian *et al.*, 2012).

Feng *et al.* však zjistili, že v játrech a v buňkách HCC je CDK20 přímým mediátorem androgenové signalizace. Zvýšená exprese androgenového receptoru (AR) byla zaznamenána u 60-80 % případů HCC. AR patří do skupiny steroidních receptorů, které se chovají jako transkripční faktory. Ligandem aktivovaný AR se v podobě homodimeru váže na responsibilní element v promotoru *CDK20* a spouští tak expresi tohoto genu. Narušená exprese CDK20 aktivuje Wnt/ β -katenin signalizaci, což vede k akumulaci β -kateninu, který je translokován do jádra, kde působí jako koaktivátor transkripce Wnt cílových genů, stimuluje progresi buněčného cyklu a indukuje tvorbu nádorů. Mezi Wnt cílové geny patří např. *EGFR* a *CCND1* kódující cyklin D1. Umlčení CDK20 vede ke snížení exprese těchto genů. β -katenin navíc také indukuje expresi a aktivitu AR a vytváří se tak zpětnovazebná pozitivní regulace. Zvýšená exprese AR koreluje s expresí CDK20 a také s horší prognózou onemocnění

a stádiem tumoru. Kaskáda AR, CDK20 a β -kateninu tak představuje slibný cíl pro vývoj terapeutických léčiv (Feng *et al.*, 2011).

2.3.8 Souhrn funkcí CDK10-CDK20

V následující tabulce 2 jsou shrnuty funkce CDK10-CDK20, jejich alternativní názvy a regulační podjednotky.

Tab. 2: Funkce CDK10-20, jejich alternativní názvy a regulační podjednotky.

CDK	Alternativní název	Cyklin	Funkce
CDK10	PISSLRE	M	Regulace buněčného cyklu (G2/M), regulace transkripčního faktoru ETS2
CDK11 ^{p58}	PITSLRE CDC2L1	D3	Formování dělicího vřeténka, koheze sesterských chromatid, regulace transkripční aktivity AR, ER, VDR
CDK11 ^{p110}	CDC2L2	L	Regulace transkripce, zpracování RNA
CDK12	CRKRS CRKR CRK7	K	Regulace aktivity RNAPII, regulace exprese DDR genů
CDK13	CHED CDCL5	K	Regulace aktivity RNAPII
CDK14	PFTAIRE1 PFTK1	D3 Y	Regulace buněčného cyklu (G1/S), Wnt/ β -katenin signalizace, polymerace aktinu, buněčná migrace a invazivita
CDK15	PFTAIRE2 PFTK2 APFTK2 ALS2CR7		Regulace stability a exprese antiapoptotických proteinů (survivin, Bcl-2)
CDK16	PCTAIRE1 PCTK1	Y	Vesikulární transport, funkčnost neuronů, synaptická eliminace, myogenní diferenciacie, degradace p27
CDK17	PCTAIRE2 PCTK2		Interakce s TRAP a IK3-1/Cables
CDK18	PCTAIRE3 PCTK3	A2	Efektor fosforylací Tau a amyloidového prekurzorového proteinu (Alzheimerova choroba)
CDK19	CDC2L6 CDK8-like CDK8L	C	Regulace transkripce, signální dráha Notch1
CDK20	PNQALRE CCRK p42		Wnt/ β -katenin signalizace

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se studia selektivity inhibitorů CDK a problematiky CDK10-CDK20.

Cílem experimentální části diplomové práce bylo studium a zavedení molekulárně-biologických a biochemických metod pro stanovení inhibiční aktivity a vyhodnocení selektivity inhibitorů CDK. Pro studium byly vybrány sloučeniny RO-3306 (Vassilev *et al.*, 2006) a CGP74514A (Imbach *et al.*, 1999), které jsou komerčně dodávány společnostmi jako vysoce selektivní inhibitory vůči CDK1, a také látky i-CDK9 a LDC000067, které jsou na základě prvotních studií považovány za vysoce selektivní vůči CDK9 (Albert *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015).

4 MATERIÁL

4.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části diplomové práce byly použity následující přístroje: CO₂ inkubátor (Sanyo), biologický termostat BT 120M, termostat Thermomixer Comfort (Eppendorf), inkubační třepačka Excella 24 (Eppendorf), termocyklér MJ Mini (BioRad), vodní lázeň, flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), flowbox s horizontálním prouděním vzduchu HH48 (Holten LaminAir), centrifuga BR4i (Jouan), centrifuga Minispin (Eppendorf), mikroskop Nikon TMS (Nikon), mikrovlnná trouba, ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), laserový skener FLA7000 (Fujifilm), průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC-MPL (Beckman Coulter).

4.2 Použité chemikálie

V praktické části diplomové práce byly použity následující chemikálie: ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin, streptomycin, penicilin, kanamycin, glutamin, dimethylsulfoxid (DMSO), leupeptin, aprotinin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES), fluorid sodný, vanadičnan trisodný, ATP, akrylamid, N,N'-metylenbisakrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), peroxodisíran amonný, Triton X-100, Nonidet P-40, bromfenolová modř, Coomassie brilliant blue, LB médium, SOC médium, agar, isopropanol, thymidin, nocodazol, propidium jodid, polyethylenimin (PEI), Anti-flag M2 afinitní gel, 3xflag peptid, GST-CTD, histon H1 od firmy Sigma Aldrich; chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid od firmy Thermo Scientific; hovězí sérový albumin (BSA), fetální bovinní sérum od firmy Invitrogen; tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES), Tween 20, glycin, [γ -³³P]ATP od firmy MP Biomedicals; Ponceau S a 2-merkптоethanol, polyethylenglykol 20000, ampicilin od firmy Serva; chlorid hořečnatý od firmy Erba Lachema; KH₂PO₄, Na₂B₄O₇·10H₂O, chlorid draselný, chlorid

manganatý od firmy Chemapol; ethanol, kyselina chlorovodíková, kyselina fosforečná, hydroxid draselný, glycerol, dodecylsírán sodný (SDS) od firmy Lach-ner; kyselina octová, chlorid sodný, hydroxid sodný, Na₂HPO₄·12H₂O od firmy Penta; peptid RPPTLSPIPHIPR, (YSPTSPS)₂KK od firmy Apronex Biotechnologies; rekombinantní CDK4/cyklin D1, CDK5/p35NCK, CDK7/cyklin H/Mat1, CDK9/cyklin T1 od firmy ProQinase GmbH.

4.3 Použité roztoky

Při experimentech byly použity následující roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 – 7,5);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

Lyzační pufr RIPA: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin;

Lyzační pufr pro imunoprecipitaci: 50 mM TRIS HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, před použitím přidán: 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin;

10x promývací pufr: 0,5 M TRIS HCl (pH = 7,4), 1,5 M NaCl;

Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100;

Kinasový reakční pufr A: 60 mM HEPES NaOH (pH = 7,5), 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 mM Na₃VO₄, 1,2 mM DTT, 2,5 mg/50 ml PEG20000, ATP a [γ -³³P]ATP;

Kinasový reakční pufr B: 20 mM HEPES NaOH (pH = 7,9), 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM ATP a [γ -³³P]ATP;

TE pufr: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH = 8;

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS;

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná;

5x SDS vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol;

Blokovací roztok: 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Eluční roztok: 0,1 M glycin (pH = 3,5);

3xflag peptid: 150 ng/μl v 50 mM TRIS HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl;

Agarové LB médium: na 1 l LB média 10 g agaru.

4.4 Použité protilátky

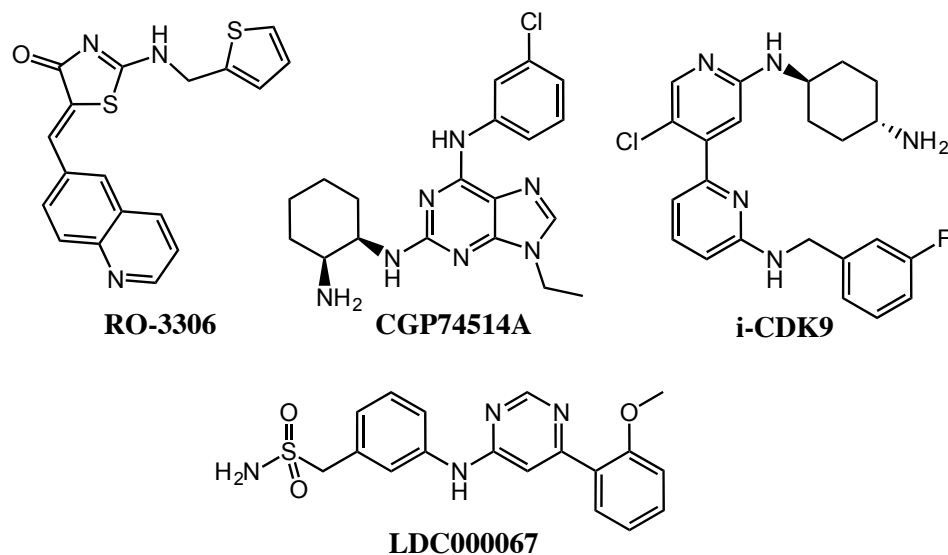
V experimentální části diplomové práce byly použity specifické protilátky od firmy Cell Signaling (anti-CDK1, klon POH1; anti-CDK2, klon 78B2; anti-CDK12; anti-fosfo-Thr320 PP1α), Bethyl Laboratories, Inc. (anti-fosfo-Ser2 a anti-fosfo-Ser5 RNA polymerasy II), Sigma Aldrich (anti-CDK7/CAK, klon MO-1.1; anti-flag M2, klon M2; anti-α-tubulin; sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou) a Santa Cruz Biotechnologies (anti-CDK9, klon D-7; anti-cyklin K, klon G-11).

4.5 Použité plasmidy

Plasmidy pcDNA3.1 kódující 3xflag CDK12 a 3xflag CDK13 resistantní vůči ampicilinu a plasmid pCMV6 kódující cyklin K resistantní vůči kanamycinu použité pro expresi proteinů plné délky byly získány od Mgr. Dalibora Blažka, Ph.D. z institutu CEITEC Masarykovy Univerzity v Brně.

4.6 Testované inhibitory CDK

V experimentální části diplomové práce byla studována selektivita inhibitoru RO-3306 zakoupeného od firmy Adipogen, CGP74514A od Sigma Aldrich, i-CDK9 a LDC000067 od firmy MedChemexpress (Obr. 5). Tyto látky byly připraveny jako 100 mM roztoky v 100% DMSO. Při experimentech byly ředěny podle potřeby v kultivačním médiu nebo v kinasové reakční směsi, přičemž koncentrace DMSO nepřesáhla 0,1 %.



Obr. 5: Chemická struktura testovaných látek RO-3306, CGP74514A, i-CDK9 a LDC000067.

4.7 Kompetentní bakteriální buňky

Pro transformaci byly použity kompetentní bakteriální buňky *E. coli*, kmen DH5 α od firmy Invitrogen. Kultivace transformovaných bakterií probíhala při 37 °C na pevném agarovém LB médiu obsahujícím selekční antibiotika: ampicilin (100 μ g/ml) nebo kanamycin (50 μ g/ml). Po přeočkování izolované kolonie byly bakterie kultivovány při 37 °C a 180 rpm v tekutém LB médiu obsahujícím příslušná antibiotika

4.8 Buněčné linie

Pro buněčné experimenty byly použity adherentní buněčné linie odvozené od kolorektálního karcinomu, a to linie HCT116 a HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2 (označována jako HCT116 CDK2^{-/-}). Buněčné linie byly kultivovány při teplotě 37 °C a v atmosféře 5% CO₂ v kultivačním médiu DMEM od firmy Sigma Aldrich, a to s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu (0,1 mg/ml), penicilinu (0,1 U/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml).

5 METODIKA

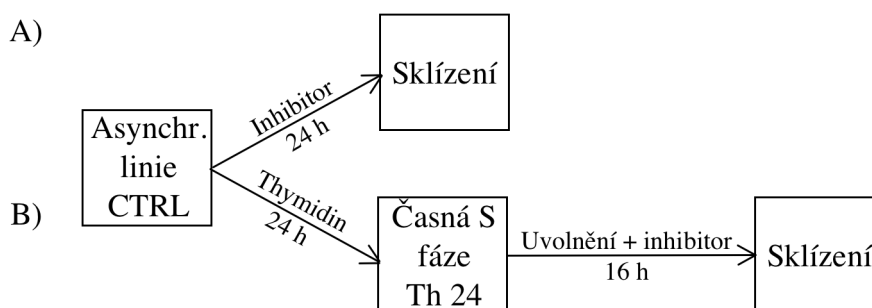
5.1 Kinasová inhibiční esej s rekombinantními CDK

Kinasová inhibiční esej byla provedena s rekombinantními komplexy CDK2/cyklin E, CDK1/cyklin B (exprimovány v Sf9 hmyzích buňkách po bakulovirální infekci a purifikovány na Ni-NTA koloně od firmy Qiagen), CDK4/cyklin D1, CDK5/p35NCK, CDK7/cyklin H/Mat1, CDK9/cyklin T1 (od firmy ProQinase GmbH) v mikrotitrační destičce. Jako substrát byl použit 1 mg/ml histonu H1 (jako substrát pro CDK1/2 a 5) nebo peptidu (YSPTSPS)₂KK (pro CDK7 a 9) nebo peptidu RPPTLSPIPHIPR (pro CDK4). Kinasová reakce proběhla za přítomnosti 15/15/15/0,15/1,5/1,5 mM ATP (pro CDK1/2/4/5/7/9) a testované látky v kinasovém reakčním pufru A v celkovém objemu 10 μ l. Reakce byla zastavena přidávkem 5 μ l 3% kyseliny fosforečné. 5 μ l reakční směsi z každé jamky bylo nanášeno na fosfocelulový papír P-81 (Whatman), který byl 3x promyt 0,5% kyselinou fosforečnou po dobu 6 minut. Poté byl opláchnut 96% ethanolem a nakonec byl usušen na vzduchu. Přes noc byl fosfocelulový papír exponován v kazetě s citlivou deskou. Druhý den byla citlivá deska oskenována skenerem FLA7000 (Fujifilm) a hladina fosforylace byla kvantifikována pomocí programu Multigauge (verze 2.2). Z křivek závislosti fosforylace na koncentraci testovaných látek byly stanoveny hodnoty IC₅₀ s použitím programu GraphPad Prism (verze 5.0).

5.2 Cytometrická analýza buněčného cyklu

Buňky linie HCT116 a HCT116 CDK2^{-/-} byly 24 hodin kultivovány na Petriho miskách pro jejich dostatečnou adhezi ke dnu kultivační nádoby. V případě experimentů s asynchronními liniemi bylo vyměněno kultivační médium za médium obsahující testované látky v příslušných koncentracích, ve kterém byly buňky kultivovány po dobu 24 hodin (Obr. 6A). V případě experimentů se synchronními buňkami byly obě linie nejprve synchronizovány metodou thymidinového bloku v časně S fázi buněčného cyklu. Kultivační médium jim bylo vyměněno za médium obsahující thymidin v koncentraci 3 mM na 24 hodin. Buňky synchronizované v časně S fázi (Th 24) byly následně ovlivněny testovanými látkami v příslušných koncentracích po dobu 16 hodin (Obr. 6B). Takto připravené buňky byly sklizeny trypsinizací. Kultivační médium bylo přeneseno do zkumavek, buňky byly

opláchnuty roztokem EGTA, který byl opět přidán do zkumavek. Následně byly buňky inkubovány 3 až 5 minut s trypsinem, opláchnuty kultivačním médiem a celý obsah misek byl přidán do zkumavek. Vzorky byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C a 2x promyty roztokem PBS. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 100 µl PBS a po kapkách za stálého míchání byl přidán 1 ml 70% ethanolu pro fixaci buněk. Vzorky byly uchovány při –20 °C.



Obr. 6: Schéma ovlivnění a synchronizace buněčných linií pro cytometrickou analýzu buněčného cyklu.

Fixované vzorky byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C a hydratovány roztokem PBS. Po centrifugaci byly buněčné pelety resuspendovány v 50 µl 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20. Po kapkách za stálého míchání byla přidána 2N HCl s 0,5% Tritonem X-100 s následnou 30 minutovou inkubací při laboratorní teplotě za občasného promíchávání. Pro neutralizaci byly buňky promyty 0,1M Na₂B₄O₇.10 H₂O (pH = 8,5) a poté roztokem 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Po centrifugaci byly buněčné pelety resuspendovány v PBS obsahujícím propidium jodid v koncentraci 0,1 mg/ml a inkubovány 1 hodinu ve tmě za občasného promíchávání. Poté byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru Cell Lab QuantaTM SC-Mpl (Beckman Coulter) s použitím laseru o vlnové délce 488 nm.

5.3 Studium fosforylace substrátů CDK

Buňky linie HCT116 byly 24 hodin kultivovány na Petriho miskách pro jejich dostatečnou adhezi ke dnu kultivační nádoby. Nejprve bylo kultivační médium vyměněno za médium obsahující nocodazol v koncentraci 40 ng/ml po dobu 16 h pro jejich synchronizaci v G2/M fázi buněčného cyklu. Poté bylo vyměněno za médium obsahující nocodazol a testované látky v příslušných koncentracích. V případě kontrolních buněk bylo použito médium obsahující

DMSO, přičemž koncentrace nepřesáhla 0,1 %. Po 3 hodinové inkubaci s testovanou látkou byly buňky sklizeny seškrabáním ze dna kultivační misky, poté byly přeneseny do zkumavek a centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Následně byly dvakrát promyty roztokem PBS a centrifugovány. Promývací roztok PBS byl odstraněn a buněčné pelety byly uskladněny při -80 °C.

5.4 Lyzace, SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce

Buňky určené pro analýzu metodou western blotting byly resuspendovány v příslušném objemu lyzačního pufru RIPA dle velikosti peletu a byly lyzovány po dobu 20 minut na ledu. Poté byly sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (15 sekund, 3 cykly, 40 % max.) a centrifugovány 25 minut při 14000 rpm a 4 °C. Lyzát byl přenesen do nových zkumavek a spektrofotometrickou Bradfordovou metodou (Bradford, 1976) byla stanovena koncentrace proteinů, jež byla v jednotlivých lyzátech vyrovnána ředěním lyzačním pufrům. Ke vzorkům byl přidán 5x SDS vzorkovací pufr a následovala denaturace při 95 °C po dobu 5 minut.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek probíhala v 5% zaostřovacích gelech v kombinaci s 10%, 12,5% nebo 15% dělicími gely (zvoleno podle molekulové hmotnosti detekovaných proteinů). Separace probíhala při napětí 80 V po dobu přibližně 30 minut., jakmile proteiny vstoupily do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po dokončení separace byly proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou membránu metodou western blotting a to při proudu 270 mA a za stálého chlazení ledem po dobu 3 hodin. Proteiny na membráně byly obarveny roztokem Ponceau S pro ověření vyrovnané koncentrace proteinů ve vzorcích. Membrána byla odbarvena v roztoku TBS a blokována v 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20 po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C s naneseným roztokem příslušné primární protilátky v blokovacím pufru. Druhý den byla několikrát promyta v roztoku TBS a TBS s 0,1% Tween 20 a inkubována s roztokem příslušné sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opět několikrát promyta v TBS a TBS s 0,1% Tween 20. Pro kvantifikaci proteinů byl použit chemiluminiscenční kit ECL (Thermo Scientific), kdy na membránu byl nanesen roztok

peroxidu a luminolu v poměru 1:1. Vlastní detekce signálu probíhala na přístroji LAS4000 (FujiFilm) a pro zpracování dat byl použit program Multigauge (verze 2.2).

5.5 Buněčná termodenaturační esej (CETSA)

Buněčná linie HCT116 byla kultivována na Petriho miskách po dobu 48 hodin. Poté jim bylo vyměněno kultivační médium za médium obsahující testované inhibitory v příslušné koncentraci. V případě kontrolních buněk bylo použito médium obsahující DMSO, přičemž koncentrace nepřesáhla 0,1 %. Po 3 hodinové inkubaci byly buňky sklizeny a následně lyzovány lyzačním pufrem RIPA stejně jako v kapitole 5.4. Po vyrovnání koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byl lyzát rozdělen po 50 μ l do 0,3ml PCR zkumavek. PCR strip byl vložen do termocykléru MJ Mini (BioRad), ve kterém byla provedena teplotní denaturace proteinů podle tabulky 3.

Tab. 3: Teplotní schéma průběhu termální denaturační eseje.

	Teplota [°C]	Čas [min]
1. Předehřátí	25	1
2. Denaturace	Teplotní gradient	3
3. Chlazení	20	1

Vzorky byly následně centrifugovány 30 minut při 14000 rpm a 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových zkumavek. Ke vzorkům byl přidán 5x SDS vzorkovací puf a následovala 5 minutová denaturace při 95 °C. Proteiny byly separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a přeneseny na nitrocelulósovou membránu metodou western blotting. Teplotní stabilita proteinů byla stanovena imunodetekcí dle kapitoly 5.4.

5.6 Transformace kompetentních bakterií, jejich kultivace, sklizení a izolace plasmidové DNA

Kompetentní bakterie *E. coli* (kmen DH5 α) byly transformovány metodou teplotního šoku. K bakteriím bylo přidáno 100 ng plasmidu a suspenze byla následně inkubována 10 minut na ledu a 45 sekund při 42 °C. Poté byly zkumavky se suspenzí buněk přeneseny na 2 minuty do ledu. K transformovaným bakteriím bylo přidáno 500 μ l SOC média předehřátého na 37 °C a následovala kultivace po dobu 1 hodiny při 37 °C a 180 rpm. Poté byla bakteriální suspenze

vysazena na plotny s agarovým LB médiem obsahujícím příslušná selekční antibiotika. Transformované bakterie byly kultivovány do druhého dne při 37 °C. Z agarového LB média byla přeočkována izolovaná bakteriální kolonie do 200 ml tekutého LB média obsahujícího příslušné antibiotikum. Kultivace probíhala při 37 °C a 180 rpm po dobu 16 až 18 hodin. Poté byla bakteriální kultura sklizena centrifugací po dobu 30 minut při 4500 rpm a 4 °C a buněčný pelet byl zamražen v tekutém dusíku a uskladněn při –20 °C.

Pro izolaci plasmidové DNA byl použit kit DNA, RNA, and protein purification NucleoBond[®] 500 (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany). Izolace byla provedena dle manuálu výrobce Plasmid DNA purification NucleoBond[®] 500. Vyizolovaná DNA byla rozpuštěna ve 200 µl TE pufru a následně byla podrobena spektrofotometrickému měření koncentrace a čistoty na přístroji Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Čistota vzorku byla posouzena na základě poměru hodnot absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm, hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 a 2,0. Vyizolovaná DNA byla poté naředěna v TE pufru na koncentraci 1 µg/µl.

5.7 Transfekce buněčné linie a sklízení

Buněčná linie HCT116 byla kultivována při teplotě 37 °C a v atmosféře 5% CO₂. Buňky byly vysazeny na Petriho misky a kultivovány po dobu 48 hodin pro jejich dostatečnou adhezi ke dnu kultivační nádoby. Transfekce byla provedena za pomoci PEI reagentu (1 µg/µl). Množství DNA a PEI bylo zvoleno v poměru 1:3 (w/w). 10 µg plasmidové DNA bylo smícháno s 3 ml nekompletního média (bez fetálního bovinního séra, glutaminu a antibiotik) a 30 µg PEI reagentu bylo smícháno s 3 ml nekompletního média. Smísením obou roztoků byla připravena transfekční směs, která byla 30 minut inkubována za laboratorní teploty. Před vlastní transfekcí byly buňky opláchnuty nekompletním médiem a následně k nim byla přidána transfekční směs. Po 24 hodinách od transfekce byly buňky sklizeny a buněčné pelety byly uskladněny při –80 °C.

5.8 Imunoprecipitace 3xflag fúzních proteinů

Transfekovaná buněčná linie HCT116 určená pro následnou imunoprecipitaci 3xflag fúzních proteinů byla lyzována stejně jako v kapitole 5.4 s použitím lyzačního pufru

pro imunoprecipitaci. Po spektrofotometrickém stanovení koncentrace proteinů byl lyzát naředěn lyzačním pufrům na koncentraci 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pro imunoprecipitaci byl použit Anti-flag M2 afinitní gel, který představuje purifikovanou myší IgG₁ monoklonální protilátku kovalentně navázanou na agarosový gel. Afinitní gel je dodáván jako 50% gelová suspenze v 50% glycerolu. 40 μl gelové suspenze bylo napipetováno sestříženou špičkou do zkumavky a resuspendováno v 0,5 ml 1x promývacího pufru. Suspenze byla centrifugována po dobu 30 sekund za laboratorní teploty při max. 8200 g a následně byla ponechána 2 minuty na ledu pro usazení gelu na dně zkumavky. Supernatant byl odstraněn a promývací krok dvakrát zopakován. Ke gelu byl přidán lyzát a směs byla inkubována po dobu 2 hodin při 4 °C za stálého otáčení na rotátoru pro navázání 3xflag proteinů v komplexu s cyklinem. Po ukončení inkubace byla suspenze opět centrifugována a ponechána 2 minuty na ledu. Poté byla třikrát promyta v 0,5 ml 1x promývacího pufru. Pro eluci 3xflag proteinů bylo použito různých způsobů. Eluce 3xflag peptidem v různých koncentracích a objemu po dobu 30 minut, 2 hodin nebo přes noc při 4 °C za stálého otáčení na rotátoru. Po inkubaci byla suspenze centrifugována a supernatant obsahující 3xflag fúzní proteiny (eluát) byl odebrán do nové zkumavky. Eluce 100 μl 0,1M glycinu (pH = 3,5) po dobu 5 minut za laboratorní teploty. Po inkubaci a následné centrifugaci byl eluát odebrán do nové zkumavky obsahující 10 μl 10x promývacího pufru. Eluát a také 50% gelová suspenze v 1x promývacím pufru byly krátkodobě uchovávány při 4 °C pro následující použití v kinasové inhibiční esejí.

5.9 Kinasová inhibiční esej s transkripčními CDK

Kinasová inhibiční esej byla provedena s rekombinantní CDK9/cyklin T1, s imunoprecipitovanými proteiny 3xflag CDK12/cyklin K a 3xflag CDK13/cyklin K.

Pro radioaktivní kinasovou esej byl jako substrát použit peptid (YSPTSPS)₂KK. Kinasová reakce probíhala za přítomnosti 1 mM ATP v celkovém objemu 20 μl v kinasovém reakčním pufru B. Kinasová reakční směs byla inkubována při 30 °C po dobu 1 hodiny a 450 rpm na termostatu. Reakce byla zastavena přidávkem 5 μl 3% kyseliny fosforečné. Poté bylo 20 μl reakční směsi nanášeno na fosfocelulosový papír P-81 (Whatman), který byl 3x promyt 0,5% kyselinou fosforečnou po dobu 6 minut. Následně byl opláchnut 96% ethanolém a nakonec byl usušen na vzduchu. Přes noc byl fosfocelulosový papír exponován v kazetě s citlivou deskou při laboratorní teplotě. Druhý den byla citlivá deska oskenována

skenerem FLA7000 (Fujifilm) a hladina fosforylace byla kvantifikována pomocí programu Multigauge (verze 2.2).

Pro neradioaktivní kinasovou esej byla jako substrát použita GST značená C-terminální doména (CTD) RNA polymerasy II. Kinasová reakce probíhala za přítomnosti 1 mM ATP a testovaného inhibitoru v příslušné koncentraci v celkovém objemu 20 μ l v kinasovém reakčním pufru B. Kinasová reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 30 °C a 450 rpm na termostatu. Reakce byla zastavena přidavkem 5x SDS vzorkovacího pufru s následnou 5 minutovou denaturací při 95 °C. Proteiny byly separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a následně byly přeneseny na nitrocelulósovou membránu metodou western blotting. Úroveň fosforylace substrátu GST-CTD byla stanovena imunodetekcí dle kapitoly 5.4.

6 VÝSLEDKY

6.1 Kinasová inhibiční esej s rekombinantními CDK

Pomocí kinasové inhibiční eseje byl sledován inhibiční potenciál všech testovaných látek vůči rekombinantním CDK. Z křivek závislosti fosforylace na koncentraci látky byly stanoveny hodnoty IC_{50} (koncentrace, při které dochází k 50% poklesu aktivity kinasy). Tato hodnota je však pouze nepřímým indikátorem afinity inhibitoru ke kinase, a proto byly dle Cheng-Prusoffovy rovnice vypočteny také hodnoty K_i (inhibiční konstanty), které zahrnují použitou koncentraci ATP v kompetiční reakci a také hodnotu K_m . Inhibitory jsou obvykle považovány za specifické vůči dané kinase v případě, kdy je konstanta K_i výrazně nižší než u ostatních kinas.

V případě inhibitoru RO-3306 byla stanovena nejnižší hodnota IC_{50} pro CDK1, zatímco u látky CGP74514A překvapivě pro CDK2. Inhibitory i-CDK9 a LDC000067 vykazovaly v kinasovém inhibičním testu preferenci k CDK9 (Tab. 4).

Tab. 4: Hodnoty IC_{50} a K_i testovaných inhibitorů vůči rekombinantním CDK1, CDK2, CDK4, CDK7 a CDK9 v komplexu s odpovídajícími cykliny a jejich porovnání s publikovanými hodnotami (Albert et al., 2014; Imbach et al., 1999; Lu et al., 2015; Vassilev et al., 2006).

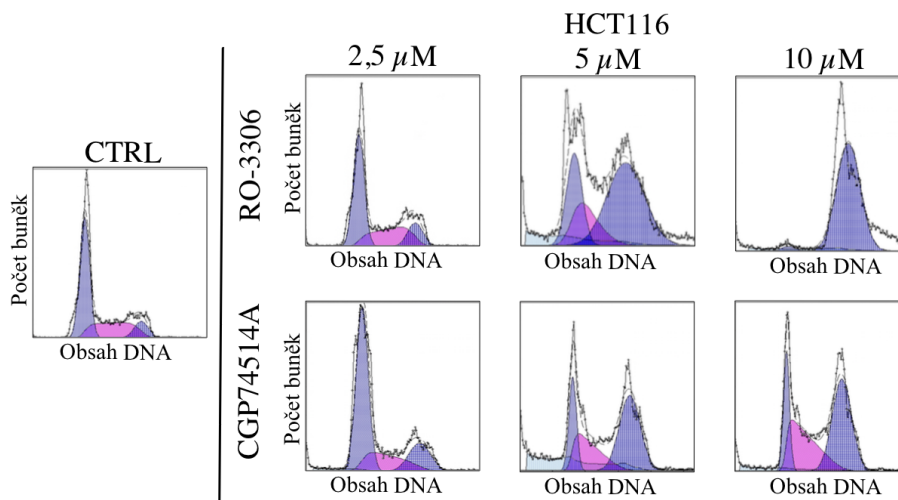
	[μ M]	CDK1	CDK2	CDK4	CDK7	CDK9
RO-3306	publ. IC_{50}	0,035	0,340	>2000	net.	net.
	IC_{50}	0,040	0,146	40,985	15,990	14,290
	K_i	0,035	0,140	37,345	14,122	11,798
CGP74514A	publ. IC_{50}	0,031	net.	net.	net.	net.
	IC_{50}	0,147	0,022	2,077	0,296	1,060
	K_i	0,131	0,021	1,892	0,261	0,875
i-CDK9	publ. IC_{50}	1,7	0,24	1,8	2	0,0004
	IC_{50}	1,237	0,150	2,076	2,291	0,033
	K_i	1,103	0,144	1,892	2,023	0,027
LDC000067	publ. IC_{50}	5,513	2,441	9,242	>10	0,044
	IC_{50}	3,950	2,334	3,160	20,000	0,227
	K_i	3,523	2,242	2,879	17,664	0,188

net. - netestováno/nepublikováno

6.2 Cytometrická analýza buněčného cyklu

Pomocí jednoparametrové cytometrické analýzy s použitím fluorescenční značky propidium jodid (PI) byla sledována změna distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu linií HCT116 a HCT116 CDK2^{-/-} po ovlivnění studovanými látkami. Cytometrickou analýzou byla studována selektivita inhibitorů RO-3306 a CGP74514A, jelikož právě inhibice CDK1 a také CDK2 a CDK4 přímo ovlivňuje průchod buněk buněčným cyklem. Inhibice CDK9 není přímo spjata s regulací buněčného cyklu, proto CDK9 inhibitory nebyly touto metodou testovány.

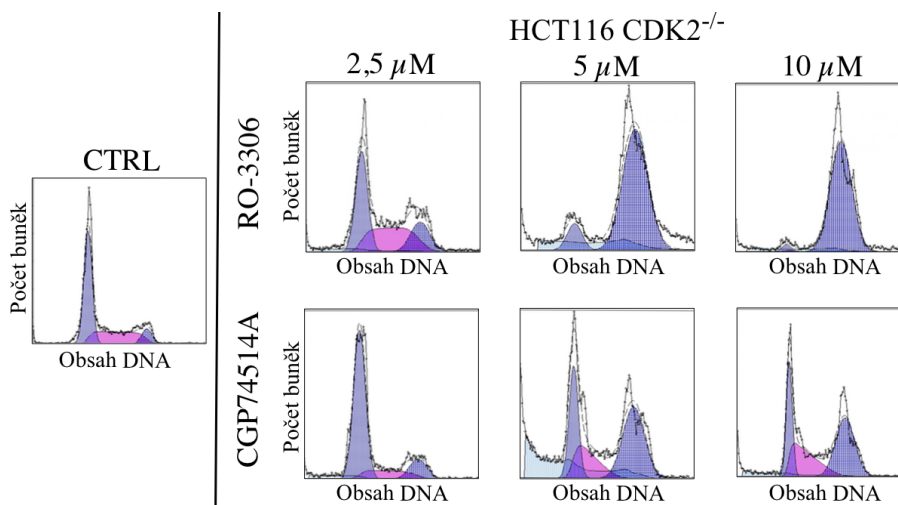
Nejprve byl sledován vliv inhibitorů na asynchronní buněčné linie. Z histogramů cytometrické analýzy buněčného cyklu linie HCT116 vyplývá, že látky s rostoucí koncentrací způsobují zablokování buněčného cyklu v G2/M fázi. Inhibitor RO-3306 v koncentraci 10 μM se však vyznačuje silnějším inhibičním účinkem (98,5 % buněk v G2/M fázi) než CGP74514A (46,1 % buněk v G2/M fázi). Z výsledků je patrné, že oba inhibitory neovlivňují asynchronní populaci buněk stejným mechanismem prostřednictvím inhibice CDK1 (Obr. 7).



Obr. 7: Vliv inhibitorů RO-3306 a CGP74514A v koncentraci 2,5; 5 a 10 μM na distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu asynchronní linie HCT116 po 24 hodinové kultivaci. Data byla analyzována pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, verze 3.00).

Obdobně byl sledován vliv inhibitorů CDK na linii HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2 (označována jako HCT116 CDK2^{-/-}), která zajišťuje dokončení G1 fáze a také

reguluje procesy v S fázi buněčného cyklu (Malumbres *et* Barbacid, 2009). Po působení inhibitorů nastal podobný efekt jako v případě nemodifikované linie HCT116. Látka RO-3306 způsobuje výrazné zablokování v G2/M fázi již v koncentraci 5 μM (88,3 % buněk v G2/M fázi), zatímco po působení CGP74514A došlo k nevýraznému bloku korespondujícímu s pozdní S fázi nebo G2/M fázi buněčného cyklu, který naznačuje pouze částečnou inhibici CDK1 (46,5 % buněk v G2/M fázi) (Obr. 8).

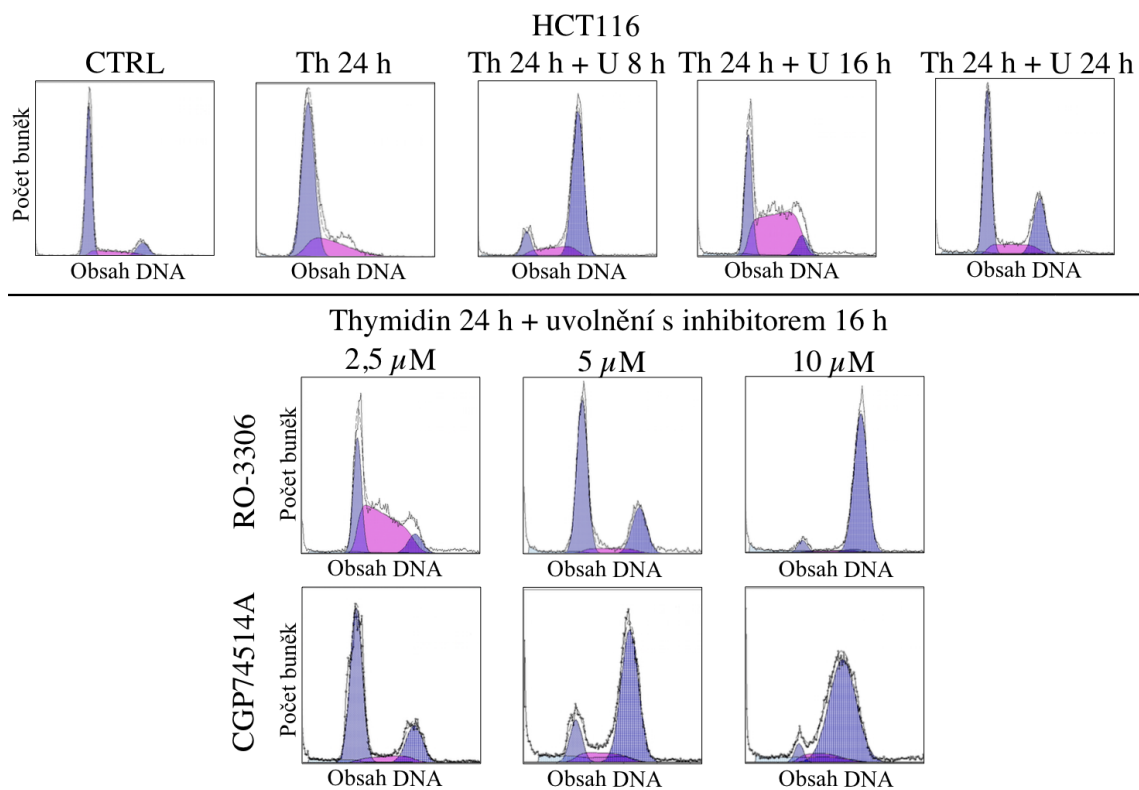


Obr. 8: Vliv inhibitorů RO-3306 a CGP74514A v koncentraci 2,5; 5 a 10 μM na distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu asynchronní linie HCT116 CDK2^{-/-} po 24 hodinové inkubaci. Data byla analyzována pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, verze 3.00).

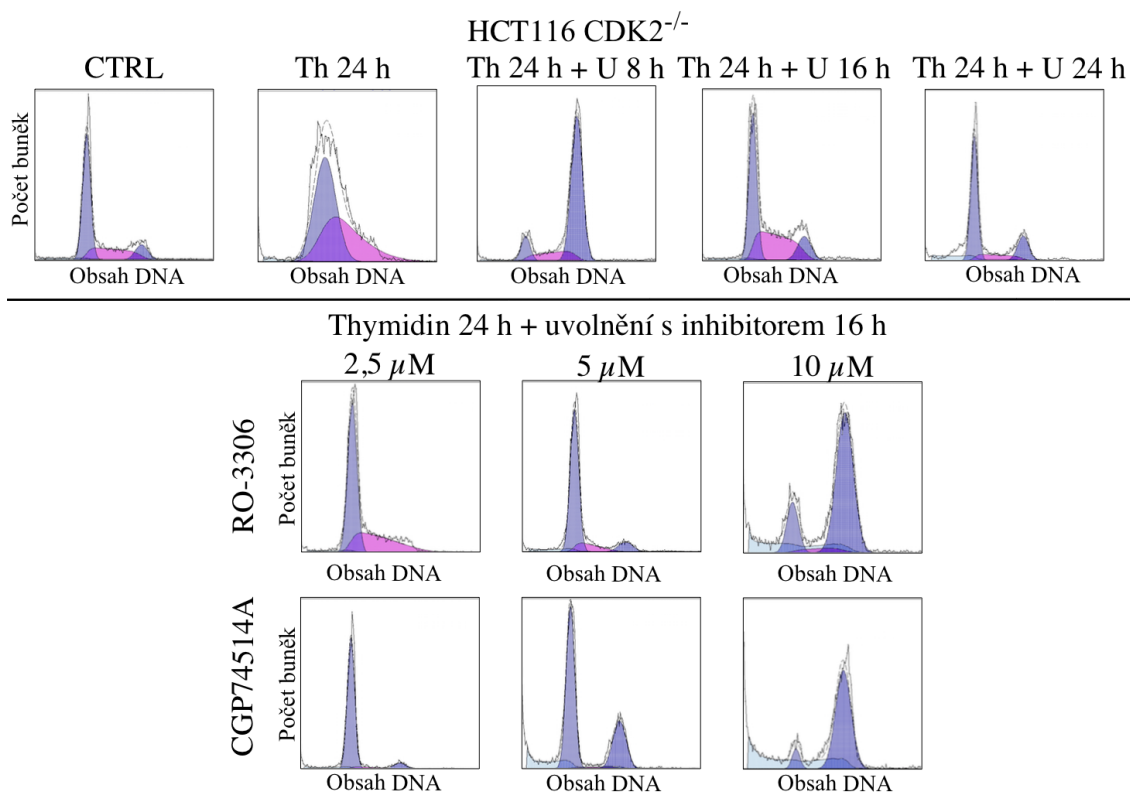
Účinek studovaných inhibitorů byl také ověřován na synchronních buněčných liniích. Buňky byly nejprve synchronizovány metodou thymidinového bloku v časně S fázi buněčného cyklu a následně byly ovlivněny po dobu 16 hodin rostoucími koncentracemi testovaných látek.

V případě obou synchronních linií látka RO-3306 v koncentraci 10 μM způsobuje výrazný G2/M blok buněčného cyklu (91,7 % buněk v G2/M fázi pro HCT116, 75,5 % buněk pro HCT116 CDK2^{-/-}), což potvrzuje předchozí výsledky. Působení inhibitoru CGP74514A v koncentraci 10 μM vykazuje u obou linií zajímavější trend, kdy na rozdíl od předchozích experimentů došlo k výraznému G2/M bloku (85 % buněk v G2/M fázi pro HCT116, 90,8 % buněk pro HCT116 CDK2^{-/-}), který napovídá o tom, že tato látka nepůsobí specificky

přes inhibici CDK2 (Obr. 9, 10). Zesílení účinku inhibitorů (výraznější G2/M blok) je dáno právě tím, že byl experiment prováděn na synchronních buňkách.



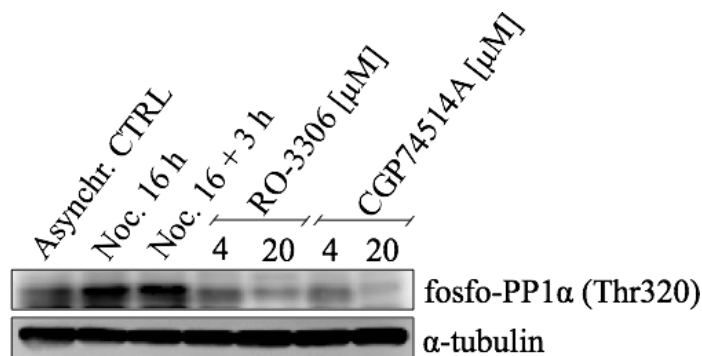
Obr. 9: Vliv inhibitorů RO-3306 a CGP74514A v koncentraci 2,5; 5 a 10 μM na distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu linie HCT116 synchronizované v časně S fázi po 16 hodinové inkubaci s látkou. Data byla analyzována pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, verze 3.00).



Obr. 10: Vliv inhibitorů RO-3306 a CGP74514A v koncentraci 2,5; 5 a 10 µM na distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu linie HCT116 CDK2^{-/-} synchronizované v časné S fázi po 16 hodinové inkubaci s látkou. Data byla analyzována pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, verze 3.00).

6.3 Analýza fosforylace substrátů CDK

Pro ověření selektivity inhibitorů RO-3306 a CGP74514A byla sledována fosforylace přímého substrátu CDK1 a CDK2. Takovým substrátem je proteinfosfatasa 1 alfa (PP1α), jejíž exprese v buňce narůstá při mitose. CDK1 a CDK2 fosforylují PP1α na threoninu v pozici 320 (Lewis *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 1999). Jelikož v asynchronní linii není možné detekovat fosforylace substrátů spojených s průchodem mitosou, musely být buňky HCT116 nejprve synchronizovány mitotickým činidlem, nocodazolem, a následně ovlivněny testovanými inhibitory. Jak lze sledovat z obrázku 11, obě látky úspěšně snižují fosforylaci PP1α, což by v tomto případě mohlo vést k interpretaci, že oba inhibitory vykazují stejnou selektivitu spjatou s inhibicí CDK1 nebo CDK2.

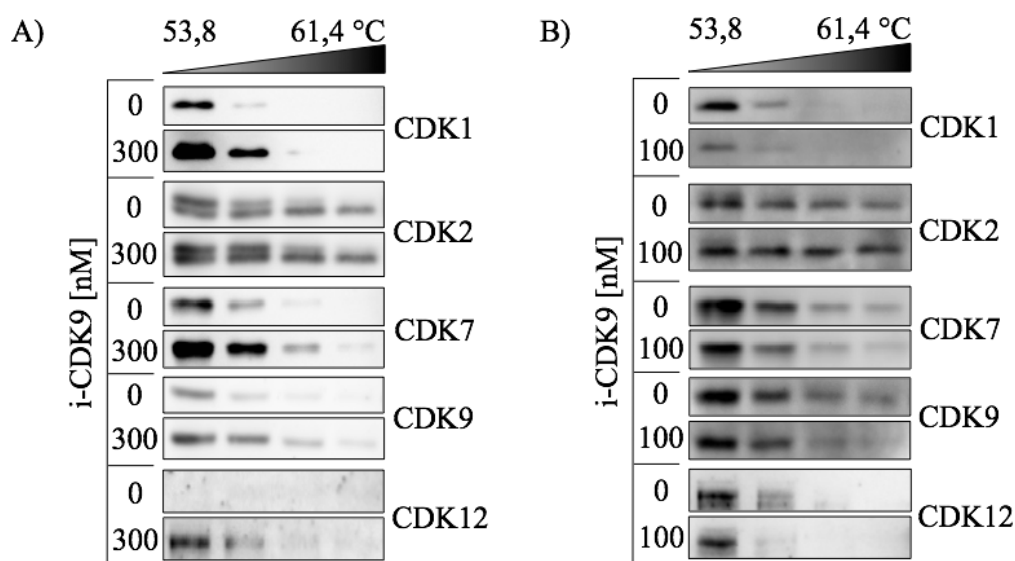


Obr. 11: Analýza fosforylace substrátu PP1 α na threoninu v pozici 320 po 3 hodinovém působení látek RO-3306 a CGP74514A v koncentraci 4 a 20 μ M na synchronní linii HCT116.

6.4 Buněčná termodenaturační esej

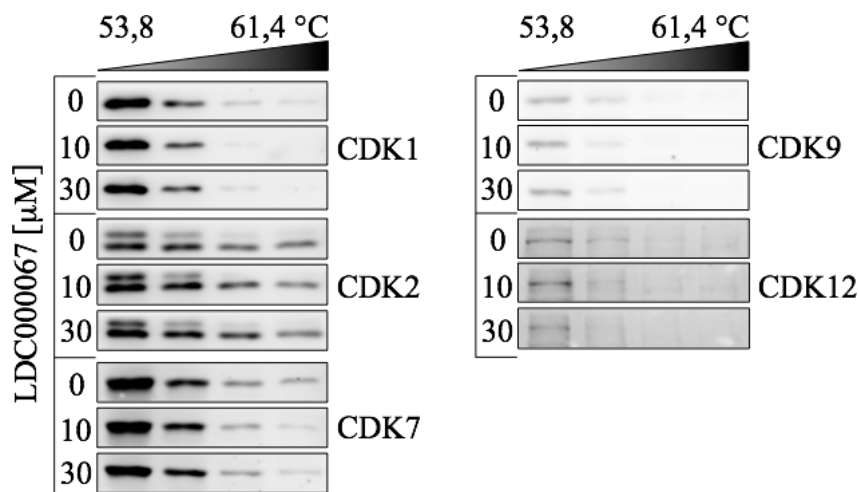
Selektivita všech vybraných inhibitorů CDK byla testována také metodou buněčné termodenaturační eseje (CETSA), jejímž principem je teplotní stabilizace kinasy indukovaná vazbou inhibitoru (Martinez Molina *et al.*, 2013).

Jako první byl studován inhibitor i-CDK9 v koncentraci 300 nM. Nicméně po působení této koncentrace látky bylo zaznamenáno zvýšení stability většiny studovaných CDK (Obr.12A), a proto byla následně sledována selektivita při nižší koncentraci, a to 100 nM. Nicméně při této koncentraci naopak nedošlo ke stabilizaci ani jedné ze sledovaných CDK (Obr. 12B).



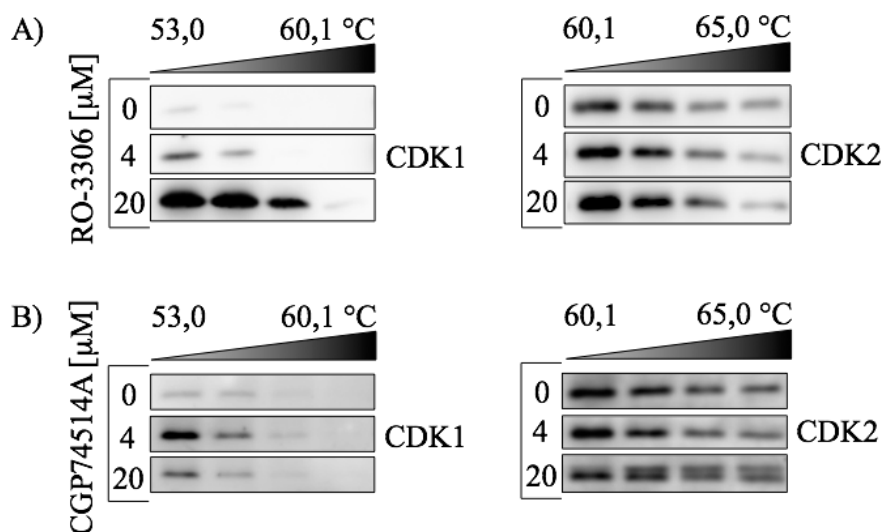
Obr. 12: Teplotní stabilita proteinů CDK1, CDK2, CDK7, CDK9 a CDK12 po 3 hodinové kultivaci s inhibitorem i-CDK9 v koncentraci 300 (A) a 100 nM (B).

Podobným přístupem byla studována také teplotní stabilizace CDK vlivem inhibitoru LDC000067 v koncentraci 10 a 30 μM , nicméně ani cílová CDK9 a ani jiná CDK nebyla stabilizována po působení této látky (Obr. 13).



Obr. 13: Teplotní stabilita proteinů CDK1, CDK2, CDK7, CDK9 a CDK12 po 3 hodinové kultivaci s inhibitorem LDC000067 v koncentraci 10 a 30 μM .

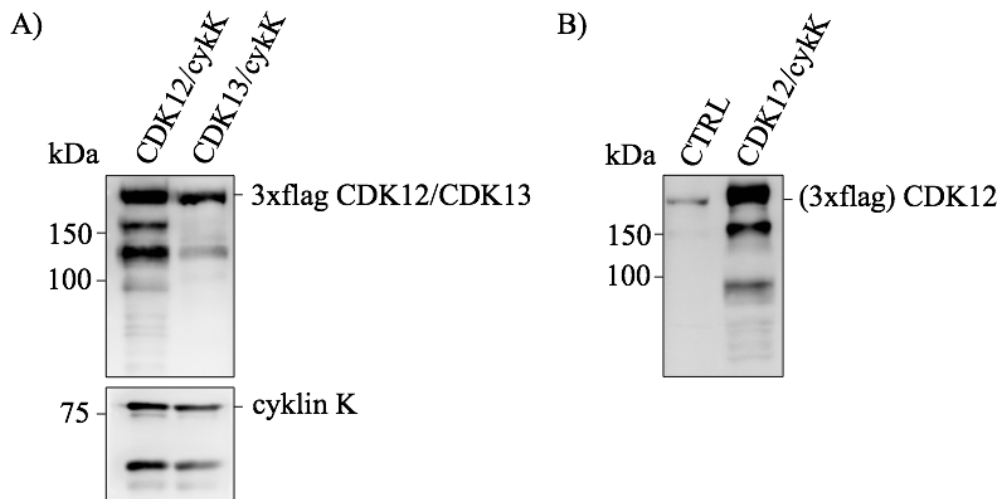
Inhibitory RO-3306 a CGP74514A byly testovány touto metodou pouze v souvislosti s inhibicí CDK1 a CDK2. Podle předpokladů nastala změna v teplotní stabilizaci po působení látky RO-3306 pouze v případě CDK1, zatímco u CDK2 k výrazným změnám nedošlo (Obr. 14A), což koreluje s výsledky kinasové inhibiční eseje i cytometrické analýzy. Podobný trend byl pozorován také po působení látky CGP74514A, nicméně stabilizace CDK1 byla méně značná než v případě RO-3306. Výrazné změny ve stabilizaci však nebyly zaznamenány v případě CDK2 (Obr. 14B).



Obr. 14: Teplotní stabilita proteinů CDK1 a CDK2 po 3 hodinové kultivaci s inhibitory RO-3306 (A) a CGP74514A (B) v koncentraci 4 a 20 μM.

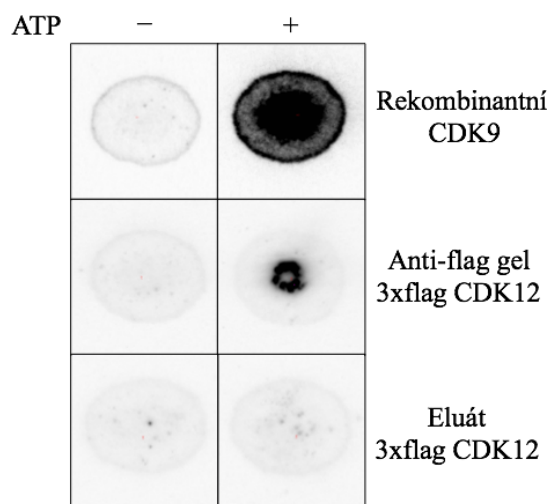
6.5 Exprese a imunoprecipitace 3xflag CDK12 a CDK13

Pro expresi proteinů 3xflag CDK12 nebo CDK13 v komplexu s cyklinem K byla použita buněčná linie HCT116. Úspěšnost kotransfekce a exprese proteinů byla ověřena metodou western blotting a následnou imunodetekcí s použitím protilátky anti-cyklin K, anti-flag (Obr. 15A) a anti-CDK12 (Obr. 15B). Jako kontrola byla použita netransfekovaná buněčná linie HCT116. Z výsledků je patrné, že exprese 3xflag CDK12 a CDK13 spolu s cyklinem K byla úspěšná. V případě kontrolního vzorku byl detekován pouze jeden band odpovídající molekulové hmotnosti CDK12, v případě transfekovaného vzorku pak intenzivnější band s nepatrně vyšší molekulovou hmotností, přičemž tato změna velikosti odpovídá navýšení o molekulovou hmotnost 3xflag (Obr. 15B). Také bylo detekováno několik nespecifických bandů, což je v souladu s publikovanými daty (Bösken *et al.*, 2014).



Obr. 15: Ověření úspěšnosti kotransfekce buněk HCT116 a exprese proteinů 3xflag CDK12 nebo CDK13 v komplexech s cyklinem K imunodetekcí s použitím protilátek rozlišujících anti-cyklin K, anti-flag (A) a anti-CDK12 (B).

Proteiny 3xflag CDK12 nebo CDK13 v komplexu s cyklinem K byly imunoprecipitovány z buněčného lyzátu použitím Anti-flag M2 afinitního gelu. Eluce byla provedena několika způsoby pomocí 3xflag peptidu nebo kyselého roztoku glycinu. Eluát a afinitní gel byly následně použity pro radioaktivní kinasovou esej pro stanovení hladiny fosforylace substrátu $(YSPTSPS)_2KK$ katalyzované flagovanými kinasami CDK12 a CDK13 a také komerčně dostupnou rekombinantní CDK9. Jako negativní kontrola byla použita kinasová reakce bez přítomnosti ATP. Z reprezentativního výsledku je patrné, že eluát neposkytoval žádný signál odpovídající fosforylaci substrátu $(YSPTSPS)_2KK$, zatímco afinitní gel po eluci poskytoval silný, ale bodový signál, což svědčí o tom, že eluce kinas nebyla úspěšná. Kinas zůstala navázána na afinitním gelu (Obr. 16). Z důvodu neúspěšnosti eluce proteinů 3xflag CDK12 nebo CDK13 z afinitního gelu byla pro studium vlivu vybraných inhibitorů na katalytickou aktivitu kinas využita neradioaktivní kinasová inhibiční esej.

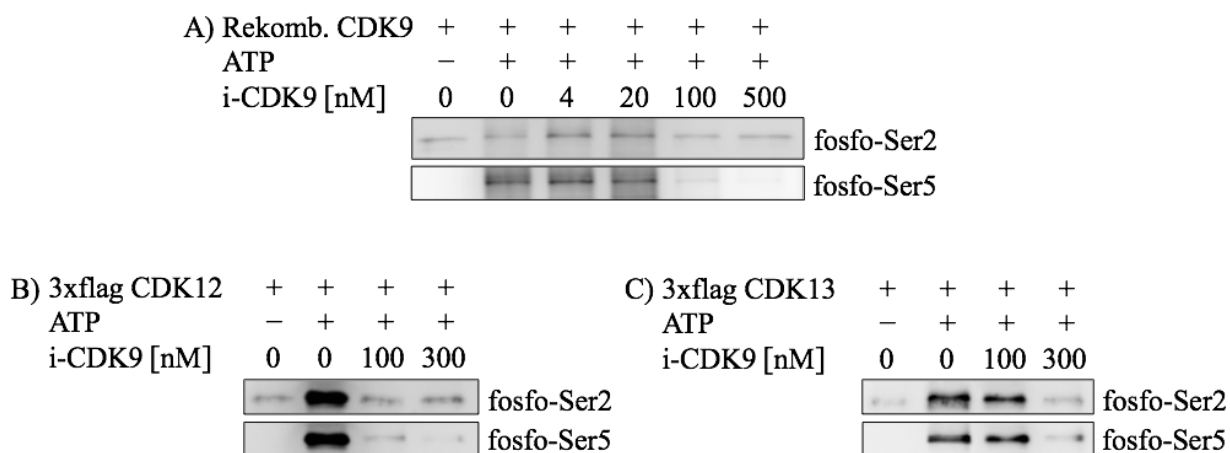


Obr. 16: Detekce fosforylace substrátu $(YSPTSPS)_2KK$ rekombinantní kinasou CDK9 a 3xflag CDK12 imunoprecipitovanou na anti-flag M2 afinitním gelu nebo v eluátu v radioaktivní kinasové eseji.

6.6 Kinasová inhibiční esej s transkripčními CDK

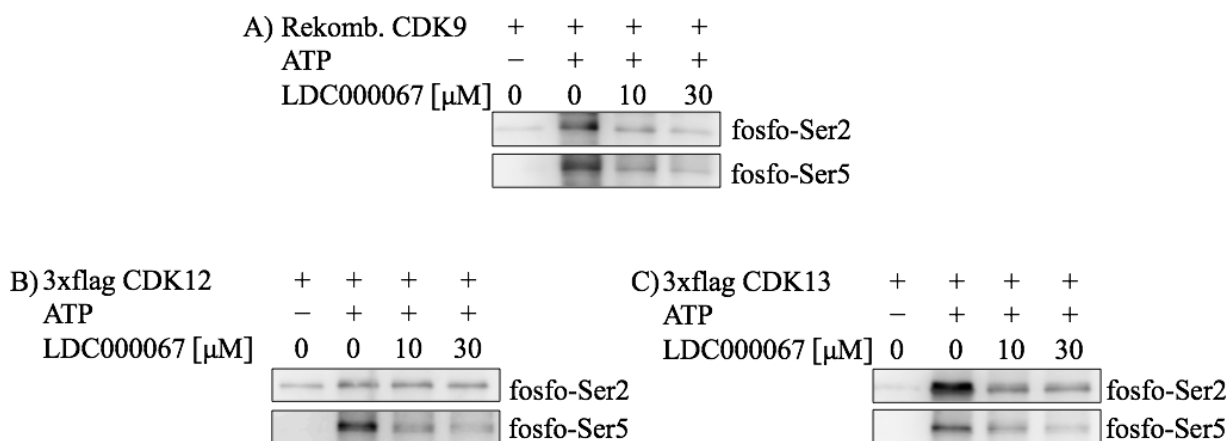
Látky i-CDK9 a LDC000067 jsou považovány za vysoce selektivní inhibitory vůči CDK9, jež patří do skupiny transkripčních CDK (Albert *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015), mezi které patří mimo jiné také CDK12 a CDK13 (Bartkowiak *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že substrátem transkripčních kinas je Ser2 a Ser5 RNA polymerasy II, lze selektivitu vůči nim studovat také pomocí neradioaktivní kinasové eseje, kdy jako substrát byla použita GST značená C-terminální doména (CTD) RNA polymerasy II a pomocí specifických protilátek byl sledován pokles fosforylace Ser2 a Ser5 po působení studovaných inhibitorů.

S rostoucí koncentrací látky i-CDK9 klesá fosforylace Ser2 i Ser5 GST-CTD, což značí pokles katalytické aktivity rekombinantní CDK9, a to již při koncentraci 100 nM (Obr. 17A). Z výsledků také vyplývá, že látka v koncentraci 100 nM inhibuje také aktivitu 3xflag CDK12 (Obr. 17B), zatímco aktivitu 3xflag CDK13 až při koncentraci 300 nM (Obr. 17C).



Obr. 17: Analýza inhibice katalytické aktivity rekombinantní CDK9 (A), 3xflag CDK12 (B) a 3xflag CDK13 (C) po působení rostoucí koncentrace látky i-CDK9.

Látka LDC000067 v koncentraci 10 a 30 μM inhibuje katalytickou aktivitu rekombinantní CDK9 i 3xflag CDK13 (Obr. 18A, C). V případě 3xflag CDK12 došlo po působení inhibitoru k poklesu fosforylace Ser5, avšak pokles fosforylace Ser2 nebyl zaznamenán (Obr. 18B).



Obr. 18: Analýza inhibice katalytické aktivity rekombinantní CDK9 (A), 3xflag CDK12 (B) a 3xflag CDK13 (C) po působení rostoucí koncentrace látky LDC000067.

7 DISKUSE

V praktické části diplomové práce byla pomocí několika molekulárně-biologických a biochemických metod ověřována selektivita vybraných inhibitorů CDK.

Sloučeniny RO-3306 (Vassilev *et al.*, 2006) a CGP74514A (Imbach *et al.*, 1999) jsou komerčně dostupnými látkami, které jsou společnostmi dodávány jako vysoce selektivní inhibitory vůči CDK1 na základě údajů z původních studií. V některých experimentech se však tyto dva inhibitory vzájemně vyznačují odlišným biologickým účinkem (Pernicová *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014; Jorda *et al.*, 2015), což může naznačovat, že specifita těchto inhibitorů by mohla být také odlišná.

Pomocí kinasové inhibiční eseje byl sledován inhibiční potenciál testovaných látek vůči vybraným rekombinantním CDK. Z křivek závislosti fosforylace na koncentraci látky byly stanoveny hodnoty IC_{50} (koncentrace, při které dochází k 50% poklesu aktivity kinasy) a následně byly podle Cheng-Prusoffovy rovnice stanoveny hodnoty K_i (inhibiční konstanty), které slouží jako lepší parametr pro vyjádření preference inhibitoru pro danou kinasu. V případě inhibitoru RO-3306 byla stanovena nejnižší hodnota IC_{50} pro CDK1, což je v souladu s publikovanými daty (Vassilev *et al.*, 2006). Inhibiční aktivita vůči CDK7 a CDK9 nebyla dosud publikována, nicméně naměřená data nevykazují výraznou preferenci látky RO-3306 k daným kinasám. Inhibitor CGP74514A je prodáván různými společnostmi jako CDK1 inhibitor, avšak jeho inhibiční aktivita vůči ostatním kinasám z rodiny CDK nebyla publikována. Hodnota IC_{50} pro CDK1 se sice pohybovala v řádech desítek nM, což by mohlo svědčit o jeho selektivitě, nicméně naměřená data nasvědčují, že CGP74514A inhibuje i CDK2, dokonce výrazněji než CDK1 (Tab. 4).

Cytophotrickou analýzou buněčného cyklu byla studována selektivita CDK1 inhibitorů RO-3306 a CGP74514A, protože právě inhibice CDK1 a také CDK2 přímo ovlivňuje průchod buněk fázemi buněčného cyklu. Z výsledků je zřejmé, že inhibitory neovlivňují asynchronní populaci buněk HCT116 stejným mechanismem prostřednictvím inhibice CDK1. Zatímco inhibiční účinek RO-3306 byl výraznější a korespondoval s buněčnou inhibicí CDK1, tedy G2/M blokem, látka CGP74514A vykazovala spíše efekt spojený s inhibicí CDK1 a CDK2 nebo pouze CDK2 (Obr. 7), tak jako bylo publikováno pro některé panselektivní CDK inhibitory (Jorda *et al.*, 2011; Zatloukal *et al.*, 2013) nebo při postranskripčním umlčení těchto kinas (Cai *et al.*, 2006; Payton *et al.*, 2006). Vliv inhibitorů CDK byl proto také studován

na linii HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2, která zajišťuje dokončení G1 fáze a také reguluje procesy v S fázi buněčného cyklu (Malumbres *et al.*, 2009). Látka RO-3306 se v tomto případě vyznačovala inhibičním účinkem již při nižší koncentraci (Obr. 8), což může být následkem toho, že v buňkách, ve kterých chybí CDK2, je značně zvýrazněna role CDK1 (vznik komplexu CDK1/cyklin E) (Cai *et al.*, 2006). Pokud by látka CGP74514A měla být pouze selektivním inhibítoem CDK2, neměla by buňky s vyřazenou CDK2 ovlivňovat, což se nestalo. Došlo k nevýraznému bloku korespondujícímu s pozdní S fází nebo G2/M fází buněčného cyklu, který naznačuje částečnou inhibici CDK1 (Obr. 8). Experimenty prováděné na buněčných liniích synchronizovaných v časné S fázi potvrdily, že látka RO-3306 je zodpovědná za specifickou inhibici CDK1, která je aktivní především v poslední části buněčného cyklu, tedy v mitose. Inhibitor CGP74514A se však vyznačoval zajímavějším trendem, kdy u obou ovlivněných linií došlo k výraznému G2/M bloku (Obr. 9, 10). Tento výsledek napovídá o tom, že látka nepůsobí specificky přes inhibici CDK2.

Pro ověření účinku inhibitorů CDK v buněčném systému lze také sledovat fosforylaci přímých substrátů. Mezi nejčastěji studované substráty patří bezpochyby retinoblastomový protein, proteinfosfatasa 1 alfa (PP1 α), nukleofosmin nebo RNA polymerasa II. Všechny tyto substráty jsou ověřenými cíli kinas z rodiny CDK, nicméně ve většině případů není zcela jasné, kterým kinasám lze jednotlivé fosforylace přisuzovat. Například fosforylace threoninu v pozici 320 PP1 α byla nejprve popsána ve spojitosti s CDK1 (Dohadwala *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1997) především díky tomu, že exprese této fosfatasy narůstá v buňce při mitose, tedy fázi, kdy je aktivita CDK1 nejvyšší. Nicméně další studie poukázaly na fakt, že toto místo může být fosforylováno i CDK2 v *in vitro* podmínkách, nikoliv však CDK4 (Lewis *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 1999). Stanovení hladiny fosforylace PP1 α na threoninu v pozici 320 bylo využito pro ověření selektivity inhibitorů RO-3306 a CGP74514A za účelem sledování možných rozdílů po působení inhibitorů. Z výsledků je patrné, že oba inhibitory úspěšně snižovaly hladinu fosforylace, což naznačuje, že látky vykazují stejnou selektivitu spojenou s inhibicí CDK1 nebo CDK2 (Obr. 11).

Selektivita vybraných inhibitorů CDK byla také ověřována buněčnou termodenaturační esejí (CETSA), jejímž základním principem je teplotní stabilizace kinasy indukovaná vazbou inhibitoru. Tato metoda byla již v dřívější studii použita pro ověření selektivity inhibitoru palbociclib (PD-0332991), což je vysoce selektivní inhibitor CDK4 a CDK6 (Fry *et al.*, 2004;

Martinez Molina *et al.*, 2013). Nicméně Martinez Molina *et al.* použili při svých experimentech palbociclib v koncentraci 10 μM , což je 25 násobek buněčné IC_{50} a 100 násobek koncentrace, která v buňkách vyvolává G1 blok (Fry *et al.*, 2004), což je hlavní znak inhibice CDK4 a CDK6 na buněčné úrovni. Vzhledem k tomu, že u inhibitorů studovaných v této diplomové práci nelze dosáhnout takto vysokých koncentrací z důvodů omezené rozpustnosti, byly koncentrace vybrány na základě známých buněčných účinků těchto látek.

Látky RO-3306 a CGP74514A byly testovány touto metodou pouze v souvislosti s inhibicí CDK1 a CDK2. Podle předpokladů po působení inhibitoru RO-3306 teplotní stabilizace nastala jen v případě CDK1 (Obr. 14A), což napovídá o specifitě této látky a také koreluje s výsledky kinasové inhibiční eseje i cytometrických analýz. Podobný trend byl pozorován také po působení látky CGP74514A, nicméně stabilizace CDK1 byla méně značná než v případě RO-3306 (Obr. 14B), což naznačuje pouze částečnou stabilizaci CDK1 a doplňuje spekulativní výsledky z cytometrických analýz.

Porovnání výsledků těchto metod výrazně prohlubuje znalosti o selektivitě a specifitě inhibitorů RO-3306 a CGP74514A. Na základě výsledků lze říci, že látka CGP74514A není selektivním inhibitorem CDK2 a že pravděpodobně inhibuje na buněčné úrovni CDK1 a CDK2. Pokud by však měla inhibovat pouze CDK1, pak se nabízí otázka, proč při použití vyšších koncentrací není dosaženo stejného efektu jako v případě látky RO-3306. Právě inhibitor RO-3306 nesmí být opomenut, jelikož existuje i možnost, že jeho publikované účinky nejsou spojeny jen se zřejmou inhibicí CDK1, ale i s inhibicí jiné mitotické kinasy, např. aurora nebo polo-like kinasy, které jsou častými nežádoucími cíli (tzv. off-targety) známých inhibitorů CDK, např. JNJ-7706621 (Emanuel *et al.*, 2005) nebo roskovitín (Whittaker *et al.*, 2007). V současné době však nelze porovnat účinky RO-3306 s jiným inhibitorem CDK1, nicméně se nabízí alespoň porovnat účinky látky CGP74514A s jinými inhibitory vykazujícími duální inhibici CDK1 a CDK2, např. NU6102, CVT313 nebo BMS265246.

Sloučeniny LDC000067 a i-CDK9 jsou poměrně novými inhibitory CDK, které jsou na základě prvotních studií považovány za vysoce selektivní inhibitory CDK9. V kinasové inhibiční eseji vykazovaly preferenci k CDK9, přičemž naměřená data se výrazně neodlišovala od publikovaných (Albert *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015) (Tab. 4).

Selektivita těchto látek byla ověřena také buněčnou termodenaturační esejí (CETSA). Jako první byl studován inhibitor i-CDK9, který v koncentraci 300 nM v buněčném systému a v koncentraci 100 nM v inhibičním kinasovém testu výrazně snižoval hladinu fosforylace Ser2 substrátů CDK9, a to RNA polymerasy II nebo GST-CTD (Lu *et al.*, 2015). Nicméně po působení vyšší koncentrace látky bylo zaznamenáno zvýšení teplotní stability většiny sledovaných CDK (Obr. 12A), naopak při nižší koncentraci nedošlo ke stabilizaci ani jedné z nich (Obr. 12B). Z toho lze vyvodit, že při následující optimalizaci by se koncentrace měla pohybovat mezi hodnotami 100 až 300 nM.

Teplotní stabilizace kinas byla také testována po působení látky LDC000067 v koncentraci 10 μ M, při které však byl v publikovaných datech pozorován pouze částečný pokles fosforylace RNA polymerasy II (Albert *et al.*, 2014), a proto byla testována také v koncentraci 30 μ M. Nicméně ke stabilizaci cílové CDK9 a ani jiné CDK po působení těchto koncentrací nedošlo (Obr. 13). V tomto případě se tedy nabízí testovat selektivitu látky v koncentracích mezi hodnotami 10 a 30 μ M. Nicméně možnou příčinou může být krátká doba působení inhibitoru na buněčnou linii, kdy látka nestačila proniknout do buněk. Účinek této látky byl již testován na linii mESC, přičemž pokles fosforylace Ser2 RNA polymerasy II byl zaznamenán již po 3 hodinách působení látky v koncentraci 10 μ M. Linie MCF7 se však nevyznačovala tímto poklesem ani po 4 hodinové inkubaci, což může být způsobeno právě krátkou dobou působení stejně jako v případě linie HCT116 (Albert *et al.*, 2015).

Selektivita těchto látek byla také testována vůči transkripčním CDK12 a CDK13. Vzhledem k tomu, že substrátem transkripčních kinas je RNA polymerasa II, lze selektivitu látek studovat také pomocí neradioaktivní kinasové esej, kdy jako substrát byla použita GST značená C-terminální doména (CTD) RNA polymerasy II a pomocí specifických protilátek byl sledován pokles fosforylace Ser2 a Ser5 po působení studovaných inhibitorů. Hlavním cílem bylo zoptimalizovat uspořádání této esej s imunoprecipitovanými 3xflag CDK12 a CDK13, zatímco komerčně dostupná rekombinantní CDK9 byla použita jako standard pro porovnání s publikovanými daty.

Z výsledků je patrné, že sloučenina i-CDK9 inhibuje katalytickou aktivitu komerčně dostupné rekombinantní CDK9 již v koncentraci 100 nM (Obr. 17A), což je v souladu s publikovanými daty (Lu *et al.*, 2015). Nicméně také inhibuje katalytickou aktivitu 3xflag CDK12 již v koncentraci 100 nM (Obr. 17B), dokonce více než 3xflag CDK13, u které byl

pokles fosforylace CTD zaznamenán až při koncentraci 300 nM (Obr. 17C). Inhibiční aktivitu vůči CDK12 a CDK13 však nelze přímo porovnávat s aktivitou vůči CDK9, jelikož při experimentech byla použita rekombinantní CDK9, která se může značně lišit od flagovaného enzymu, což lze pozorovat i v případě publikovaných dat. Flagovaná CDK9 v publikovaných datech byla inhibována již při koncentraci 20 nM, zatímco rekombinantní až při koncentraci 160 nM. Testována byla také inhibice katalytické aktivity flagované CDK12, a to až do koncentrace 80 nM, nicméně pokles fosforylace nebyl zaznamenán. Rekombinantní CDK12 byla inhibována až v koncentraci 1,2 μ M (Lu *et al.*, 2015). Pokud bychom však vycházeli z těchto publikovaných dat pro 3xflag CDK9, tedy inhibiční koncentrace 20 nM, tak by se pro ověření selektivity vůči 3xflag CDK12 měla při dalších experimentech snížit testovaná koncentrace a mělo by se ověřit, zda opravdu za daných experimentálních podmínek nedojde při nižší koncentraci k poklesu fosforylace.

Inhibitor LDC000067 v testovaných koncentracích inhibuje katalytickou aktivitu všech studovaných transkripčních kinas, nicméně je zřejmé, že by měla být testována výrazně nižší koncentrace látky, která odráží její inhibiční aktivitu vůči rekombinantní kinase.

8 ZÁVĚR

Pomocí několika molekulárně-biologických a biochemických metod byla ověřena selektivita vybraných inhibitorů CDK. Na základě porovnání výsledků těchto metod navzájem a také s publikovanými daty lze říci, že při stanovování selektivity inhibitorů se nelze spoléhat pouze na jednu metodu. Výsledky se mohou lišit nejen v rámci různých metod, ale i v rámci odlišných experimentálních podmínek (např. odlišná koncentrace ATP v kinasové inhibiční eseji, jiná forma purifikované kinasy nebo koncentrace inhibitoru). Stejně tak se může projevit odlišná aktivita nativních enzymů v buněčném uspořádání od proteinů rekombinantních ve výsledném profilu selektivity. Z tohoto důvodu je zapotřebí použít odlišných přístupů, výsledky kinasových inhibičních esejí doplnit také o výsledky z buněčných systémů a především je třeba se zaměřit na sledování selektivity k co nejširšímu spektru proteinů pro vyloučení nežádoucích cílů (tzv. off-targetů). Obecně je velmi těžké posuzovat selektivitu inhibitorů na buněčné úrovni, pokud v biochemickém testu nevykazují výrazně vyšší preferenci pro cílový protein v porovnání s dalším buněčným cílem v pořadí, což by mohl být také jeden z důvodů, proč byl právě inhibitor PD-0332991 zvolen pro demonstraci metody CETSA v publikaci kolektivu Martinez Molina *et al.*

V praktické části této práce byla ověřována selektivita sloučenin RO-3306 (Vassilev *et al.*, 2006) a CGP74514A (Imbach *et al.*, 1999), které jsou považovány na základě původních studií za vysoce selektivní inhibitory CDK1, nicméně některé již publikované experimenty naznačují, že jejich specifita by mohla být odlišná (Pernicová *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014; Jorda *et al.*, 2015). Výsledky této diplomové práce jednoznačně potvrdily selektivitu látky RO-3306 vůči CDK1, což je v souladu s publikovanými daty (Vassilev *et al.*, 2006). Nicméně sloučenina CGP74514A se vyznačovala odlišným biologickým účinkem, který napovídá o tom, že způsobuje pouze částečnou inhibici CDK1 a pravděpodobně i CDK2.

Látky LDC000067 a i-CDK9 jsou poměrně novými inhibitory CDK, které jsou na základě prvotních studií považovány za vysoce selektivní inhibitory CDK9. V kinasové inhibiční eseji vykazovaly preferenci k CDK9, přičemž naměřená data korelovala s publikovanými výsledky (Albert *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015). Nicméně na základě výsledků termodenaturační eseye a také kinasové inhibiční eseye s transkripčními CDK bylo zjištěno, že se látky mohou vyznačovat také selektivitou k jiným kinasám z rodiny CDK, především transkripčním CDK.

Vzhledem k některým pozorovaným efektům by bylo vhodné se v budoucnu zaměřit na optimalizaci koncentrací a také délky doby působení testovaných látek pro objasnění přesného mechanismu účinku inhibitorů CDK.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Albert, T.K., Rigault, C., Eickhoff, J., Baumgart, K., Antrecht, C., Klebl, B., Mittler, G., Meisterernst, M. (2014): Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor. *British Journal of Pharmacology* 171: 55-68.
- Alem, E., Arceci, R.J. (2015): Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 16.
- An, X., Ng, S.S., Xie, D., Zeng, Y.X., Sze, J., Wang, J., Chen, Y.C., Chow, B.K., Lu, G., Poon, W.S., Kung, H.F., Wong, B.C., Lin, M.C. (2010): Functional characterisation of cell cycle-related kinase (CCRK) in colorectal cancer carcinogenesis. *European Journal of Cancer* 46: 1752-1761.
- Asghar, U., Witkiewicz, A.K., Turner, N.C., Knudsen, E.S. (2015): The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 14: 130-146.
- Bagella, L., Giacinti, C., Simone, C., Giordano, A. (2006): Identification of murine cdk10: association with Ets2 transcription factor and effects on the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 99: 978-985.
- Bartkowiak, B., Liu, P., Phatnani, H.P., Fuda, N.J., Cooper, J.J., Price, D.H., Adelman, K., Lis, J.T., Greenleaf, A.L. (2010): CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes & Development* 24: 2303-2316.
- Beaver, J.A., Amiri-Kordestani, L., Charlab, R., Chen, W., Palmby, T., Tilley, A., Zirkelbach, J.F., Yu, J., Liu, Q., Zhao, L., Crich, J., Chen, X.H., Hughes, M., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Kluetz, P.G., Kim, G., Ibrahim, A., Pazdur, R., Cortazar, P. (2015): FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 21: 4760-4766.
- Bell, D., Berchuck, A., Birrer, M., Chien, J., Cramer, D. *et al.* (2011): Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: 609-615.
- Benson, C., White, J., De, B.J., O'Donnell, A., Raynaud, F., Cruickshank, C., McGrath, H., Walton, M., Workman, P., Kaye, S., Cassidy, J., Gianella-Borradori, A., Judson, I., Twelves, C. (2007): A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *British Journal of Cancer* 96: 29-37.
- Benusiglio, P.R., Pharoah, P.D., Smith, P.L., Lesueur, F., Conroy, D., Luben, R.N., Dew, G., Jordan, C., Dunning, A., Easton, D.F., Ponder, B.A. (2006): HapMap-based study of the 17q21 ERBB2 amplicon in susceptibility to breast cancer. *British Journal of Cancer* 95: 1689-1695.
- Blažek, D. (2012): The cyclin K/Cdk12 complex: an emerging new player in the maintenance of genome stability. *Cell Cycle* 11: 1049-1050.
- Blažek, D., Kohoutek, J., Bartholomeeusen, K., Johansen, E., Hulinkova, P., Luo, Z., Cimermanic, P., Ule, J., Peterlin, B.M. (2011): The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & Development* 25: 2158-2172.
- Bösken, C.A., Farnung, L., Hintermair, C., Merzel Schachter, M., Vogel-Bachmayr, K., Blažek, 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.

- Boyer, T.G. (2015): Transcriptional kinases: Less is more (or less). *Nature Chemical Biology* 12: 4-5.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brambilla, R., Draetta, G. (1994): Molecular cloning of PISSLRE, a novel putative member of the cdk family of protein serine/threonine kinases. *Oncogene* 9: 3037-3041.
- Brooks, E.E., Gray, N.S., Joly, A., Kerwar, S.S., Lum, R., Mackman, R.L., Norman, T.C., Rosete, J., Rowe, M., Schow, S.R., Schultz, P.G., Wang, X., Wick, M.M., Shiffman, D. (1997): CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 29207-209211.
- Bunnell, B.A., Heath, L.S., Adams, D.E., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (1990): Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 7467-7471.
- Buratowski, S. (2003): The CTD code. *Nature Structural Biology* 9: 679-680.
- Buratowski, S. (2009): Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular Cell* 36: 541-546.
- Cai, D., Latham, V.M., Jr., Zhang, X., Shapiro, G.I. (2006): Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Research* 66: 9270-9280.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., Yu, L. (2014): Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BioMed Central Evolutionary Biology* 14: 10.
- Cee, V.J., Chen, D.Y., Lee, M.R., Nicolaou, K.C. (2009): Cortistatin A is a high-affinity ligand of protein kinases ROCK, CDK8, and CDK11. *Angewandte Chemie International Edition* 48: 8952-8957.
- Ciccia, A., Elledge, S.J. (2010): The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* 40: 179-204.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., Beyaert, R. (2000): Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Molecular Cell* 5: 597-605.
- Davidson, G., Niehrs, C. (2010): Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends in Cell Biology* 20: 453-460.
- Davidson, G., Shen, J., Huang, Y.L., Su, Y., Karaulanov, E., Bartscherer, K., Hassler, C., Stanek, P., Boutros, M., Niehrs, C. (2009): Cell cycle control of wnt receptor activation. *Developmental Cell* 17: 788-799.
- 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.
- Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Berndt, N. (1994): Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 6408-6412.
- Ekumi, K.M., Paculova, H., Lenasi, T., Pospichalova, V., Böskén, C.A., Rybarikova, J., Bryja, V., Geyer, M., Blažek, D., Barboric, M. (2015): Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Research* 43: 2575-2589.
- Emanuel, S., Rugg, C.A., Gruninger, R.H., Lin, R., Fuentes-Pesquera, A., Connolly, P.J., Wetter, S.K., Hollister, B., Kruger, W.W., Napier, C., Jolliffe, L., Middleton, S.A. (2005):

- The in vitro and in vivo effects of JNJ-7706621: a dual inhibitor of cyclin-dependent kinases and aurora kinases. *Cancer Research* 65: 9038-9046.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983): Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-398.
- Feng, H., Cheng, A.S., Tsang, D.P., Li, M.S., Go, M.Y., Cheung, Y.S., Zhao, G.J., Ng, S.S., Lin, M.C., Yu, J., Lai, P.B., To, K.F., Sung, J.J. (2011): Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives β -catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 121: 3159-3175.
- Feng, Y., Sassi, S., Shen, J.K., Yang, X., Gao, Y., Osaka, E., Zhang, J., Yang, S., Yang, C., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., Duan, Z. (2015): Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system. *Journal of Orthopaedic Research* 33: 199-207.
- Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M.G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J.S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., Chan, J.A., Baselga, J., Taberero, J., Root, D.E., Fuchs, C.S., Loda, M., Shivdasani, R.A., Meyerson, M., Hahn, W.C. (2008): CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455: 547-551.
- Franck, N., Montembault, E., Romé, P., Pascal, A., Cremet, J.Y., Giet, R. (2011): CDK11(p58) is required for centriole duplication and Plk4 recruitment to mitotic centrosomes. *PLoS ONE* 6: e14600.
- Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., Toogood, P.L. (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 1427-1438.
- Fu, Z., Larson, K.A., Chitta, R.K., Parker, S.A., Turk, B.E., Lawrence, M.W., Kaldis, P., Galaktionov, K., Cohn, S.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Sturgill, T.W. (2006): Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. *Molecular and Cellular Biology* 26: 8639-8654.
- Fukasawa, R., Tsutsui, T., Hirose, Y., Tanaka, A., Ohkuma, Y. (2012): Mediator CDK subunits are platforms for interactions with various chromatin regulatory complexes. *The Journal of Biochemistry* 152: 241-249.
- Galbraith, M.D., Allen, M.A., Bensard, C.L., Wang, X., Schwinn, M.K., Qin, B., Long, H.W., Daniels, D.L., Hahn, W.C., Dowell, R.D., Espinosa, J.M. (2013): HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* 153: 1327-1339.
- Galbraith, M.D., Donner, A.J., Espinosa, J.M. (2010): CDK8: a positive regulator of transcription. *Transcription* 1: 4-12.
- Goh, K.C., Novotny-Diermayr, V., Hart, S., Ong, L.C., Loh, Y.K., Cheong, A., Tan, Y.C., Hu, C., Jayaraman, R., William, A.D., Sun, E.T., Dymock, B.W., Ong, K.H., Ethirajulu, K., Burrows, F., Wood, J.M. (2012): TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia* 26: 236-243.
- Graeser, R., Gannon, J., Poon, R.Y., Dubois, T., Aitken, A., Hunt, T. (2002): Regulation of the CDK-related protein kinase PCTAIRE-1 and its possible role in neurite outgrowth in Neuro-2A cells. *Journal of Cell Science* 115: 3479-3490.
- Graña, X., Claudio, P.P., De Luca, A., Sang, N., Giordano, A. (1994): PISSLRE, a human novel CDC2-related protein kinase. *Oncogene* 9: 2097-2103.

- 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.
- Gribbon, P., Sewing, A. (2003): Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain? *Drug Discovery Today* 8: 1035-1043.
- Gu, X., Wang, Y., Wang, H., Ni, Q., Zhang, C., Zhu, J., Huang, W., Xu, P., Mao, G., Yang, S. (2015): Upregulated PFTK1 promotes tumor cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer. *Medical Oncology* 32: 195.
- Guen, V.J., Gamble, C., Flajolet, M., Unger, S., Thollet, A., Ferandin, Y., Superti-Furga, A., Cohen, P.A., Meijer, L., Colas, P. (2013): CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 19525-19530.
- Hao, Y., Kong, X., Ruan, Y., Gan, H., Chen, H., Zhang, C., Ren, S., Gu, J. (2011): CDK11p46 and RPS8 associate with each other and suppress translation in a synergistic manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407: 169-174.
- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J., Cohen, P. (2006): Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nature Protocols* 1: 968-971.
- Havlíček, L., Hanus, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 408-412.
- Heller, G., Ziegler, B., Brandstetter, A., Novak, S., Rudas, M., Hennig, G., Gehrman, M., Acht, T., Zöchbauer-Müller, S., Filipits, M. (2009): CDK10 is not a target for aberrant DNA methylation in breast cancer. *Anticancer Research* 29: 3939-3944.
- Herskovits, A.Z., Davies, P. (2006): The regulation of tau phosphorylation by PCTAIRE 3: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 23: 398-408.
- Hirose, T., Kawabuchi, M., Tamaru, T., Okumura, N., Nagai, K., Okada, M. (2000): Identification of tudor repeat associator with PCTAIRE 2 (Trap). A novel protein that interacts with the N-terminal domain of PCTAIRE 2 in rat brain. *European Journal of Biochemistry* 267: 2113-2121.
- Hnisz, D., Abraham, B.J., Lee, T.I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A.A., Hoke, H.A., Young, R.A. (2013): Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 155: 934-947.
- Hsu, F.N., Chen, M.C., Chiang, M.C., Lin, E., Lee, Y.T., Huang, P.H., Lee, G.S., Lin, H. (2011): Regulation of androgen receptor and prostate cancer growth by cyclin-dependent kinase 5. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 33141-33149.
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J.H., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2003): CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *Journal of Biological Chemistry* 278: 8623-8629.
- Hu, D., Valentine, M., Kidd, V.J., Lahti, J.M. (2007): CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *Journal of Cell Science* 120: 2424-2434.
- Huber, K.V., Olek, K.M., Müller, A.C., Tan, C.S., Bennett, K.L., Colinge, J., Superti-Furga, G. (2015): Proteome-wide drug and metabolite interaction mapping by thermal-stability profiling. *Nature Methods* 12: 1055-1057.
- Chen, H.H., Wang, Y.C., Fann, M.J. (2006): Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Molecular and Cellular Biology* 26: 2736-2745.

- Chen, H.H., Wong, Y.H., Genevriere, A.M., Fann, M.J. (2007): CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 735-740.
- Chen, R., Keating, M.J., Gandhi, V., Plunkett, W. (2005): Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 106: 2513-2519.
- Cheng, K., Li, Z., Fu, W.Y., Wang, J.H., Fu, A.K., Ip, N.Y. (2002): Pctaire1 interacts with p35 and is a novel substrate for Cdk5/p35. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 31988-31993.
- Chi, Y., Hong, Y., Zong, H., Wang, Y., Zou, W., Yang, J., Kong, X., Yun, X., Gu, J. (2009): CDK11p58 represses vitamin D receptor-mediated transcriptional activation through promoting its ubiquitin-proteasome degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386: 493-498.
- Chi, Y., Huang, S., Wang, L., Zhou, R., Wang, L., Xiao, X., Li, D., Cai, Y., Zhou, X., Wu, J. (2014): CDK11p58 inhibits ER α -positive breast cancer invasion by targeting integrin β 3 via the repression of ER α signaling. *BMC Cancer* 14: 577.
- Choi, H.H., Choi, H.K., Jung, S.Y., Hyle, J., Kim, B.J., Yoon, K., Cho, E.J., Youn, H.D., Lahti, J.M., Qin, J., Kim, S.T. (2014): CHK2 kinase promotes pre-mRNA splicing via phosphorylating CDK11(p110). *Oncogene* 33: 108-115.
- Imbach, P., Capraro, H.G., Furet, P., Mett, H., Meyer, T., Zimmermann, J. (1999): 2,6,9-trisubstituted purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9: 91-96.
- Iorns, E., Turner, N.C., Elliott, R., Syed, N., Garrone, O., Gasco, M., Tutt, A.N., Crook, T., Lord, C.J., Ashworth, A. (2008): Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Cell* 13: 91-104.
- Jafari, R., Almqvist, H., Axelsson, H., Ignatushchenko, M., Lundbäck, T., Nordlund, P., Martinez Molina, D. (2014): The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nature Protocols* 9: 2100-2122.
- Jerabek-Willemsena, M., Andréa, T., Wannera, R., Rotha, H.M., Duhra, S., Baaskea, P., Breitsprechera, D. (2014): MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* 1077: 101-113.
- Jia, B., Choy, E., Cote, G., Harmon, D., Ye, S., Kan, Q., Mankin, H., Hornicek, F., Duan, Z. (2014): Cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) is crucial in the growth of liposarcoma cells. *Cancer Letters* 342: 104-112.
- Jiang, M., Gao, Y., Yang, T., Zhu, X., Chen, J. (2009): Cyclin Y, a novel membrane-associated cyclin, interacts with PFTK1. *FEBS Letters* 583: 2171-2178.
- Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I.W., Walkinshaw, M.D., Voller, J., Sturc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistrík, M., Bártek, J., Strnad, M., Krystof, V. (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 54: 2980-2993.
- Jorda, R., Schütznerová, E., Cankař, P., Brychtová, V., Navrátilová, J., Kryštof, V. (2015): Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23: 1975-1981.
- Joshi, P.M., Sutor, S.L., Huntoon, C.J., Karnitz, L.M. (2014): Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous

- recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 9247-9253.
- Juan, H.C., Lin, Y., Chen, H.R., Fann, M.J. (2015): Cdk12 is essential for embryonic development and the maintenance of genomic stability. *Cell Death & Differentiation*: doi: 10.1038/cdd.2015.157.
- Kaldis, P., Pagano, M. (2009): Wnt signaling in mitosis. *Developmental Cell* 17: 749-750.
- Kaldis, P., Solomon, M.J. (2000): Analysis of CAK activities from human cells. *European Journal of Biochemistry* 267: 4213-4221.
- Kang, J., Sergio, C.M., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A. (2014): Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. *BMC Cancer* 14: 32.
- Kasten, M., Giordano, A. (2001): Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20: 1832-1838.
- Kaur, G., Stetler-Stevenson, M., Sebers, S., Worland, P., Sedlacek, H., Myers, C., Czech, J., Naik, R., Sausville, E. (1992): Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *Journal of the National Cancer Institute* 84: 1736-1740
- Kesavapany, S., Li, B., Amin, N., Zheng, Y., Grant, P., Pant, H.C. (2004): Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochemica et Biophysica Acta* 1697: 143-153.
- Ko, T.K., Kelly, E., Pines, J. (2001): CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *Journal of Cell Science* 114: 2591-2603.
- Kohoutek, J., Blažek, D. (2012): Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell Division* 7: 12.
- Kryštof, V., Uldrijan, S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets* 11: 291-302.
- Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P.B., Abraham, B.J., Reddy, J., Ficarro, S.B., Dastur, A., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Tesar, B., Jenkins, C.E., Hannett, N.M., McMillin, D., Sanda, T., Sim, T., Kim, N.D., Look, T., Mitsiades, C.S., Weng, A.P., Brown, J.R., Benes, C.H., Marto, J.A., Young, R.A., Gray, N.S. (2014): Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* 511: 616-620.
- Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P., Nairn, A.C. (1997): Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2168-2173.
- Lazzaro, M.A., Julien, J.P. (1997): Chromosomal mapping of the PFTAIRE gene, Pftk1, a cdc2-related kinase expressed predominantly in the mouse nervous system. *Genomics* 42: 536-537.
- Lebakken, C.S., Kang, H.C.H., Vogel, K.W. (2007): A fluorescence lifetime based binding assay to characterize kinase inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening* 12: 828-841.
- Leman, E.S., Magheli, A., Yong, K.M., Netto, G., Hinz, S., Getzenberg, R.H. (2009): Identification of nuclear structural protein alterations associated with seminomas. *Journal of Cellular Biochemistry* 108: 1274-1279.
- Leung WK1, Ching AK, Wong N. (2011b): Phosphorylation of Caldesmon by PFTAIRE1 kinase promotes actin binding and formation of stress fibers. *Molecular and Cellular Biochemistry* 350: 201-206.
- Leung, W.K., Ching, A.K., Chan, A.W., Poon, T.C., Mian, H., Wong, A.S., To, K.F., Wong, N. (2011a): A novel interplay between oncogenic PFTK1 protein kinase and tumor suppressor TAGLN2 in the control of liver cancer cell motility. *Oncogene* 30: 4464-4475.

- Lewis, C.W., Taylor, R.G., Kubara, P.M., Marshall, K., Meijer, L., Golsteyn, R.M. (2013): Lewis CW1, Taylor RG, Kubara PM, Marshall K, Meijer L, GolA western blot assay to measure cyclin dependent kinase activity in cells or in vitro without the use of radioisotopes. *steyn RM. FEBS Letters* 587: 3089-3095.
- Li, N., Fassl, A., Chick, J., Inuzuka, H., Li, X., Mansour, M.R., Liu, L., Wang, H., King, B., Shaik, S., Gutierrez, A., Ordureau, A., Otto, T., Kreslavsky, T., Baitsch, L., Bury, L., Meyer, C.A., Ke, N., Mulry, K.A., Kluk, M.J., Roy, M., Kim, S., Zhang, X., Geng, Y., Zagodzón, A., Jenkinson, S., Gale, R.E., Linch, D.C., Zhao, J.J., Mullighan, C.G., Harper, J.W., Aster, J.C., Aifantis, I., von Boehmer, H., Gygi, S.P., Wei, W., Look, A.T., Sicinski, P. (2014): Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor. *Nature Cell Biology* 16: 1080-1091.
- Li, S., MacLachlan, T.K., De Luca, A., Claudio, P.P., Condorelli, G., Giordano, A. (1995): The cdc-2-related kinase, PISSLRE, is essential for cell growth and acts in G2 phase of the cell cycle. *Cancer Research* 55: 3992-3995.
- Lim, S., Kaldis, F. (2013): Cdks, cyclins and CKIs roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140: 3079-3093.
- Liu, C.W., Wang, R.H., Dohadwala, M., Schönthal, A.H., Villa-Moruzzi, E., Berndt, N. (1999): Inhibitory phosphorylation of PP1 α catalytic subunit during the G(1)/S transition. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 29470-29475.
- Liu, Y., Cheng, K., Gong, K., Fu, A.K., Ip, N.Y. (2006): Pctaire1 phosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: implications in the regulation of its hexamerization and exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 9852-9858.
- Liu, Y., Wu, C., Galaktionov, K. (2004): p42, a novel cyclin-dependent kinase-activating kinase in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 4507-4514.
- Ljungman, M., Paulsen, M.T. (2001): The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Molecular Pharmacology* 60: 785-789.
- Lopez, M.M., Makhatadze, G.I. (2002): Isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology*, 173: 121-126.
- Loyer, P., Trembley, J.H., Grenet, J.A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V.J., Lahti, J.M. (2008): Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7721-7732.
- Lu, H., Xue, Y., Yu, G.K., Arias, C., Lin, J., Fong, S., Faure, M., Weisburd, B., Ji, X., Mercier, A., Sutton, J., Luo, K., Gao, Z., Zhou, Q. (2015): Compensatory induction of MYC expression by sustained CDK9 inhibition via a BRD4-dependent mechanism. *eLife* 4: e09993.
- Ma, H., Deacon, S., Horiuchi, K. (2008): The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization. *Expert Opinion on Drug Discovery* 3: 607-621.
- Ma, Z., Wu, Y., Jin, J., Yan, J., Kuang, S., Zhou, M., Zhang, Y., Guo, A.Y. (2013): Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 1002-1010.
- Malcovati, L., Della Porta, M.G., Pietra, D., Boveri, E., Pellagatti, A., Galli, A., Travaglino, E., Brisci, A., Rumi, E., Passamonti, F., Invernizzi, R., Cremonesi, L., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Hellström-Lindberg, E., Cazzola, M. (2016): Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 114: 3538-3545.

- Malik, S., Roeder, R.G. (2010): The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nature Reviews Genetics* 11: 761-772.
- Malumbres, M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* 15: 122.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 630-641.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9: 153-166.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L., Wolgemuth, D.J. (2009): Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology* 11: 1275-1276.
- Marqués, F., Moreau, J.L., Peaucellier, G., Lozano, J.C., Schatt, P., Picard, A., Callebaut, I., Perret, E., Genevière, A.M. (2000): A new subfamily of high molecular mass CDC2-related kinases with PITAI/VRE motifs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 832-837.
- Martinez Molina, D., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y., Nordlund, P. (2013): Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* 341: 84-87.
- Massard, C., Soria, J.C., Anthony, D.A., Proctor, A., Scaburri, A., Pacciarini, M.A., Laffranchi, B., Pellizzoni, C., Kroemer, G., Armand, J.P., Balheda, R., Twelves, C.J. (2011): A first in man, phase I dose-escalation study of PHA-793887, an inhibitor of multiple cyclin-dependent kinases (CDK2, 1 and 4) reveals unexpected hepatotoxicity in patients with solid tumors. *Cell Cycle* 10: 963-970.
- Matsuda, S., Kominato, K., Koide-Yoshida, S., Miyamoto, K., Isshiki, K., Tsuji, A., Yuasa, K. (2014): PCTAIRE kinase 3/cyclin-dependent kinase 18 is activated through association with cyclin A and/or phosphorylation by protein kinase A. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 18387-18400.
- Meek, S.E., Lane, W.S., Piwnica-Worms, H. (2004): Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 32046-32054.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., Tsai, L.H. (1992): A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO Journal* 11: 2909-2917.
- Mikolajczyk, M., Nelson, M.A. (2004): Regulation of stability of cyclin-dependent kinase CDK11p110 and a caspase-processed form, CDK11p46, by Hsp90. *Biochemical Journal* 384: 461-467.
- Mikolcevic, P., Rainer, J., Geley, S. (2012a): Orphan kinases turn eccentric, A new class of cyclin Y-activated, membrane-targeted CDKs. *Cell Cycle* 11: 3758-3768.
- Mikolcevic, P., Sigl, R., Rauch, V., Hess, M.W., Pfaller, K., Barisic, M., Pelliniemi, L.J., Boesl, M., Geley, S. (2012b): Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 32: 868-879.
- Montagnoli, A., Valsasina, B., Croci, V., Menichincheri, M., Rainoldi, S., Marchesi, V., Tibolla, M., Tenca, P., Brotherton, D., Albanese, C., Patton, V., Alzani, R., Ciavolella, A., Sola, F., Molinari, A., Volpi, D., Avanzi, N., Fiorentini, F., Cattoni, M., Healy, S., Ballinari, D., Pesenti, E., Isacchi, A., Moll, J., Bensimon, A., Vanotti, E., Santocanale, C. (2008): A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nature Chemical Biology* 4: 357-365.

- Naumann, U., Huang, H., Wolburg, H., Wischhusen, J., Weit, S., Ohgaki, H., Weller, M. (2006): PCTAIRE3: a putative mediator of growth arrest and death induced by CTS-1, a dominant-positive p53-derived synthetic tumor suppressor, in human malignant glioma cells. *Cancer Gene Therapy* 13: 469-478.
- Ng, S.S., Cheung, Y.T., An, X.M., Chen, Y.C., Li, M., Li, G.H., Cheung, W., Sze, J., Lai, L., Peng, Y., Xia, H.H., Wong, B.C., Leung, S.Y., Xie, D., He, M.L., Kung, H.F., Lin, M.C. (2007): Cell cycle-related kinase: a novel candidate oncogene in human glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* 99: 936-948.
- O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P.C., Altieri, D.C. (2000): Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13103-13107.
- Olmeda, D., Castel, S., Vilaró, S., Cano, A. (2003): Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2844-2860.
- Ou, C.Y., Poon, V.Y., Maeder, C.I., Watanabe, S., Lehrman, E.K., Fu, A.K., Park, M., Fu, W.Y., Jorgensen, E.M., Ip, N.Y., Shen, K. (2010): Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell* 141: 846-858.
- Palmer, K.J., Konkel, J.E., Stephens, D.J. (2005): PCTAIRE protein kinases interact directly with the COPII complex and modulate secretory cargo transport. *Journal of Cell Science* 118: 3839-3847.
- Pang, E.Y., Bai, A.H., To, K.F., Sy, S.M., Wong, N.L., Lai, P.B., Squire, J.A., Wong, N. (2007): Identification of PFTAIRE protein kinase 1, a novel cell division cycle-2 related gene, in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 46: 436-445.
- Park, M., Watanabe, S., Poon, V.Y., Ou, C.Y., Jorgensen, E.M., Shen, K. (2011): CY1/cyclin Y and CDK-5 differentially regulate synapse elimination and formation for rewiring neural circuits. *Neuron* 70: 742-757.
- Park, M.H., Kim, S.Y., Kim, Y.J., Chung, Y.H. (2014): ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 129-134.
- Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M.P., Doll, R., Nomeir, A., Windsor, W., Fischmann, T., Wang, Y., Oft, M., Chen, T., Kirschmeier, P., Lees, E.M. (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* 9: 2344-2353.
- Patricelli, M.P., Nomanbhoy, T.K., Wu, J., Brown, H., Zhou, D., Zhang, J., Jagannathan, S., Aban, A., Okerberg, E., Herring, C., Nordin, B., Weissig, H., Yang, Q., Lee, J.D., Gray, N.S., Kozarich, J.W. (2011): In situ kinase profiling reveals functionally relevant properties of native kinases. *Chemistry & Biology* 18: 699-710.
- Patrick, G.L. (2013): *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford University Press: 789 s.
- Payton M1, Chung G, Yakowec P, Wong A, Powers D, Xiong L, Zhang N, Leal J, Bush TL, Santora V, Askew B, Tasker A, Radinsky R, Kendall R, Coats S. (2006): Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. *Cancer Research* 66: 4299-4308.
- Pelish, H.E., Liao, B.B., Nitulescu, I.I., Tangpeerachaikul, A., Poss, Z.C., Da Silva, D.H., Caruso, B.T., Arefolov, A., Fadeyi, O., Christie, A.L., Du, K., Banka, D., Schneider, E.V., Jestel, A., Zou, G., Si, C., Ebmeier, C.C., Bronson, R.T., Krivtsov, A.V., Myers, A.G., Kohl, N.E., Kung, A.L., Armstrong, S.A., Lemieux, M.E., Taatjes, D.J., Shair, M.D.

- (2015): Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature* 526: 273-276.
- Pernicová, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Šimečková, Š., Jaroš, J., Suchánková, T., Bouchal, J., Kharaihvili, G., Král, M., Kozubík, A., Souček, K. (2014): The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular Cancer Research* 13: 113.
- Peterlin, B.M., Price, D.H. (2006): Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular Cell* 23: 297-305.
- Petretti, C., Savoian, M., Montembault, E., Glover, D.M., Prigent, C., Giet, R. (2006): The PITSLRE/CDK1p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Reports* 7: 418-424.
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., Morris, M.C. (2015): Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers* 7: 179-237.
- Porter, D.C., Farmaki, E., Altília, S., Schools, G.P., West, D.K., Chen, M., Chang, B.D., Puzyrev, A.T., Lim, C.U., Rokow-Kittell, R., Friedhoff, L.T., Papavassiliou, A.G., Kalurupalle, S., Hurteau, G., Shi, J., Baran, P.S., Gyorffy, B., Wentland, M.P., Broude, E.V., Kiaris, H., Roninson, I.B. (2012): Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 13799-13804.
- Rakkaa, T., Escudé, C., Giet, R., Magnaghi-Jaulin, L., Jaulin, C. (2014): CDK11(p58) kinase activity is required to protect sister chromatid cohesion at centromeres in mitosis. *Chromosome Research* 22: 267-276.
- Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L.M., Lallena, M.J., de Dios, A. (2015): Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25: 3420-3435.
- Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Florens, L., Zybaylov, B., Swanson, S.K., Banks, C.A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C. (2004): A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Molecular Cell* 14: 685-691.
- Sergère, J.C., Thuret, J.Y., Le Roux, G., Carosella, E.D., Leteurtre, F. (2000): Human CDK10 gene isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 271-277.
- Shimizu, K., Uematsu, A., Imai, Y., Sawasaki, T. (2014): Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion. *FEBS Letters* 588: 3030-3037.
- Shu, F., Lv, S., Qin, Y., Ma, X., Wang, X., Peng, X., Luo, Y., Xu, B.E., Sun, X., Wu, J. (2007): Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 9248-9253.
- Siemeister, G., Lücking, U., Wengner, A.M., Lienau, P., Steinke, W., Schatz, C., Mumberg, D., Ziegelbauer, K. (2012): BAY 1000394, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, with potent antitumor activity in mono- and in combination treatment upon oral application. *Molecular Cancer Therapeutics* 11: 2265-2273.
- Slon-Usakiewicz, J.J., Dai, J.R., Ng, W., Foster, J.E., Deretey, E., Toledo-Sherman, L., Redden, P.R., Pasternak, A., Reid, N. (2005): Global kinase screening. Applications of frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry in drug discovery. *Analytical Chemistry* 77: 1268-1274.
- Smyth, L.A., Collins, I. (2009): Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology* 2: 131-151.

- Squires, M.S., Feltell, R.E., Wallis, N.G., Lewis, E.J., Smith, D.M., Cross, D.M., Lyons, J.F., Thompson, N.T. (2009): Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* 8: 324-332.
- Tian, Y., Wan, H., Tan, G. (2012): Cell cycle-related kinase in carcinogenesis. *Oncology Letters* 4: 601-606.
- Tong, W.G., Chen, R., Plunkett, W., Siegel, D., Sinha, R., Harvey, R.D., Badros, A.Z., Popplewell, L., Coutre, S., Fox, J.A., Mahadocon, K., Chen, T., Kegley, P., Hoch, U., Wierda, W.G. (2010): Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 28: 3015-3022.
- Trakala, M., Malumbres, M. (2014): Cyclin C surprises in tumour suppression. *Nature Cell Biology* 16: 1031-1033.
- Trembley, J.H., Hu, D., Hsu, L.C., Yeung, C.Y., Slaughter, C., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2002): PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. *Journal of Biological Chemistry* 277: 2589-2596.
- Tsutsui, T., Fukasawa, R., Tanaka, A., Hirose, Y., Okhuma, Y. (2011): Identification of target genes for the CDK subunits of the Mediator complex. *Genes to Cells* 16: 1208-1218.
- Unger, S., Böhm, D., Kaiser, F.J., Kaulfuss, S., Borozdin, W., Buiting, K., Burfeind, P., Böhm, J., Barrionuevo, F., Craig, A., Borowski, K., Keppler-Noreuil, K., Schmitt-Mechelke, T., Steiner, B., Bartholdi, D., Lemke, J., Mortier, G., Sandford, R., Zabel, B., Superti-Furga, A., Kohlhase, J. (2008): Mutations in the cyclin family member FAM58A cause an X-linked dominant disorder characterized by syndactyly, telecanthus and anogenital and renal malformations. *Nature Genetics* 40: 287-289.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., Chen, L. (2006): Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10660-10665.
- Vymětalová, L., Kryštof, V. (2015): Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Medicinal Research Reviews* 35: 1156-1174.
- Wang, Y., Zhang, T., Kwiatkowski, N., Abraham, B.J., Lee, T.I., Xie, S., Yuzugullu, H., Von, T., Li, H., Lin, Z., Stover, D.G., Lim, E., Wang, Z.C., Iglehart, J.D., Young, R.A., Gray, N.S., Zhao, J.J. (2015): CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* 163: 174-186.
- Wang, Y., Zong, H., Chi, Y., Hong, Y., Yang, Y., Zou, W., Yun, X., Gu, J. (2009): Repression of estrogen receptor alpha by CDK11p58 through promoting its ubiquitin-proteasome degradation. *The Journal of Biochemistry* 145: 331-343.
- Whittaker, S.R., Te Poele, R.H., Chan, F., Linardopoulos, S., Walton, M.I., Garrett, M.D., Workman, P. (2007): The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine; CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis. *Cell Cycle* 6: 3114-3131.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., Young, R.A. (2013): Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153: 307-319.
- Wohlbold, L., Larochele, S., Liao, J.C., Livshits, G., Singer, J., Shokat, K.M., Fisher, R.P. (2006): The cyclin-dependent kinase (CDK) family member PNQALRE/CCRK supports cell proliferation but has no intrinsic CDK-activating kinase (CAK) activity. *Cell Cycle* 5: 546-554.

- Wu, G.Q., Xie, D., Yang, G.F., Liao, Y.J., Mai, S.J., Deng, H.X., Sze, J., Guan, X.Y., Zeng, Y.X., Lin, M.C., Kung, H.F. (2009): Cell cycle-related kinase supports ovarian carcinoma cell proliferation via regulation of cyclin D1 and is a predictor of outcome in patients with ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer* 125: 2631-2642.
- Xiang, J., Lahti, J.M., Grenet, J., Easton, J., Kidd, V.J. (1994): Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 15786-15794.
- Yamochi, T., Nishimoto, I., Okuda, T., Matsuoka, M. (2001): ik3-1/Cables is associated with Trap and Pctaire2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 1045-1050.
- Yanagi, T., Krajewska, M., Matsuzawa, S., Reed, J.C. (2014a): PCTAIRE1 phosphorylates p27 and regulates mitosis in cancer cells. *Cancer Research* 74: 5795-5807.
- Yanagi, T., Matsuzawa, S. (2015): PCTAIRE1/PCTK1/CDK16: a new oncotarget? *Cell Cycle* 14: 463-464.
- Yanagi, T., Reed, J.C., Matsuzawa, S. (2014b): PCTAIRE1 regulates p27 stability, apoptosis and tumor growth in malignant melanoma. *Oncoscience* 1: 624-633.
- Yang, T., Chen, J.Y. (2001): Identification and cellular localization of human PFTAIRE1. *Gene* 267: 165-172.
- You, Y., Yang, W., Wang, Z., Zhu, H., Li, H., Lin, C., Ran, Y. (2013): Promoter hypermethylation contributes to the frequent suppression of the CDK10 gene in human nasopharyngeal carcinomas. *Cellular Oncology* 36: 323-331.
- Yu, J.H., Zhong, X.Y., Zhang, W.G., Wang, Z.D., Dong, Q., Tai, S., Li, H., Cui, Y.F. (2012): CDK10 functions as a tumor suppressor gene and regulates survivability of biliary tract cancer cells. *Oncology Reports* 24: 1266-1276.
- Zang, Z.J., Ong, C.K., Cutcutache, I., Yu, W., Zhang, S.L., Huang, D., Ler, L.D., Dykema, K., Gan, A., Tao, J., Lim, S., Liu, Y., Futreal, P.A., Grabsch, H., Furge, K.A., Goh, L.K., Rozen, S., Teh, B.T., Tan, P. (2011): Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing. *Cancer Research* 71: 29-39.
- Zatloukal, M., Jorda, R., Gucký, T., Řezníčková, E., Voller, J., Pospíšil, T., Malínková, V., Adamcová, H., Kryštof, V., Strnad, M. (2013): Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 61: 61-72.
- Zhang, S., Cai, M., Zhang, S., Xu, S., Chen, S., Chen, X., Chen, C., Gu, J. (2002): Interaction of p58(PITSLRE), a G2/M-specific protein kinase, with cyclin D3. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 35314-35322.
- Zhang, W., Liu, R., Tang, C., Xi, Q., Lu, S., Chen, W., Zhu, L., Cheng, J., Chen, Y., Wang, W., Zhong, J., Deng, Y. (2016): PFTK1 regulates cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Biological Macromolecules* 85: 405-416.
- Zhong, X.Y., Xu, X.X., Yu, J.H., Jiang, G.X., Yu, Y., Tai, S., Wang, Z.D., Cui, Y.F. (2012): Clinical and biological significance of Cdk10 in hepatocellular carcinoma. *Gene* 498: 68-74.
- Zong, H., Chi, Y., Wang, Y., Yang, Y., Zhang, L., Chen, H., Jiang, J., Li, Z., Hong, Y., Wang, H., Yun, X., Gu, J. (2007): Cyclin D3/CDK11p58 complex is involved in the repression of androgen receptor. *Molecular and Cellular Biology* 27: 7125-7142.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AML	Acute myeloid leukemia
AR	Androgen receptor
Arg	Arginine
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
BSA	Bovine serum albumin
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1
CA	Cortistatin A
CAK	CDK-activating kinase
CCNC	Cyclin C
CCND1	Cyclin D1
CCRK	Cell cycle regulated kinase
CDC25	Cell division cycle 25
CDC2L	Cell division cycle 2-like
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK8L	CDK8-like
CDKL	CDK-like
CETSA	Cellular thermal shift assay
Cip/Kip	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CK1	Casein kinase 1
COPII	Coat protein complex II
CRK7	CDC2-related protein kinase 7
CRKRS	Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich
CTD	C-terminal domain
CTS-1	Chimeric tumor suppressor-1
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid

ER	Estrogen receptor
ETS2	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FANCD2	Fanconi anemia complementation group D2
FANCI	Fanconi anemia complementation group I
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic acid
HCC	Hepatocellular carcinoma
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HTS	High-throughput screening
CHED	Cholinesterase-related cell division controller
CHK2	Checkpoint kinase 2
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICN1	Intracellular domain of Notch 1
IK3-1/Cables	Interactor with CDK3 1/CDK5 and Abl enzyme substrate 1
IRES	Internal ribosome entry site
K _i	Inhibitor constant
KiNativ	Native kinome profiling
K _m	Michaelis constant
LB	Luria-Bertani
LC	Liquid chromatography
Lrp5/6	Low-density-lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6
MAK	Male germ cell-associated protein kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mat1	Menage a trois-1
MED	Mediator complex subunit
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mESC	Mouse embryonic stem cells
MRK/ICK	MAK-related kinase/intestinal cell kinase
MS	Mass spectrometry
MST	MicroScale Thermophoresis
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
P	Proline
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PI	Propidium iodide

PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKA	Protein kinase A
PLK1	Polo-like kinase 1
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PP1 α	Protein phosphatase 1 alpha
Pro	Proline
Rb	Retinoblastoma protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid
RNAPII	RNA polymerase II
RNPS1	RNA-binding protein with serine-rich domain 1
S	Serine
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SE	Super-enhancer
Ser	Serine
Sgo1	Shugoshin 1
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor
SOC	Super optimal broth with catabolic repressor
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2
T	Threonine
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia
TAGLN2	Transgelin 2
TBS	TRIS-buffered saline
TE	TRIS-EDTA buffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonine
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAP	Tudor repeat associated with PCTK2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSA	Thermal shift assay
UV	Ultraviolet
VDR	Vitamin D receptor
VIS	Visible
Y	Tyrosine