

Univerzita Palackého v Olomouci

Dizertační práce

Olomouc 2024

Mgr. Agáta Kubičková

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta
Ústav molekulární a translační medicíny



**Role transkripčního faktoru c-Myc v proliferaci,
quiscenci, apoptóze a ribozomální biogenezi**

Dizertační práce

Mgr. Agáta Kubíčková

Studijní program: Onkologie
Studijní obor: Onkologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu. Výzkumná část práce byla provedena na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Vznik této práce byl podpořen Evropským fondem pro regionální rozvoj (projekt ENOCH č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (EATRIS-CZ, LM2018133, a CZ-OPENSUREEN, LM2018130), Nadací rozvoje vědy ČR (GAČR 19-08124S), Technologickou agenturou ČR: Národní centra kompetence ČR, projekt "PerMed" Personalizovaná medicína - diagnostika a terapie (TN01000013), Národním ústavem pro výzkum rakoviny a interními granty Univerzity Palackého (IGA-LF-2017-026, IGA-LF-2018-031, IGA-LF-2019-018, IGA-LF-2020-019, IGA-LF-2021-038, IGA_LF_2022_033, IGA_LF_2023_025).

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, PhD za čas a cenné rady, které mi poskytl během studia a tvorby této práce. Mé poděkování patří samozřejmě také všem spoluautorům publikací, bez nichž by nebylo možné výzkum realizovat. Velice děkuji za podporu, cenné rady a inspiraci současným i bývalým kolegům z Ústavu molekulární a translační medicíny z nichž se postupně stali mí blízcí přátelé čehož si nesmírně cením: MSc. Narendran Annadurai, PhD, Bc. Renata Buriánová, Mgr. Ivo Frydrych, PhD, Ing. Soňa Gurská, PhD, Mgr. Dušan Holub, PhD, Mgr. Hana Jaworek, PhD, Mgr. Kateřina Ječmeňová, Mgr. Jana Kotulová, PhD, Mgr. Natálie Kudlová, PhD, Mgr. Lukáš Lenart, Mgr. Barbora Lišková, PhD, Mgr. Marin Ondra, Mgr. Hanuš Slavík, PhD, Ing. Rastislav Slavkovský, PhD, Mgr. Jarmila Stanková, Mgr. Petr Vojta, PhD, doc. MUDr. Jana Volejníková, PhD., Mgr. Patrícia Žižkovičová.

V Olomouci dne 15.1.2024

Mgr. Agáta Kubíčková

Bibliografický záznam

Jméno a příjmení autora: Agáta Kubíčková
Název práce: Role transkripčního faktoru c-Myc v proliferaci, quiscenci, apoptóze a ribozomální biogenezi
Typ práce: Dizertační
Pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2024
Klíčová slova: c-Myc, buněčné modely, CRISPR/Cas9, regulace exprese, ribozomální proteiny, vysokokapacitní screening
Počet stran: 115
Jazyk: Český

Bibliographic entry

Author's name and surname: Agáta Kubíčková
Title: Role of transcription factor c-Myc in proliferation, quiscence, apoptosis and ribosomal biogenesis
Type of thesis: Dissertation
Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc
Supervisor: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
The year of defence: 2024
Keywords: c-Myc, cellular models, CRISPR/Cas9, expression regulation, ribosomal proteins, high throughput screening
Number of pages: 115
Language: Czech

Souhrn

Předložená dizertační práce obsahuje tři výzkumné záměry, které se zaměřují na onkogen c-Myc. Při detailní charakterizaci biologických účinků triterpenů, odvozených z přírodních látek, jsme identifikovali spojitost mezi jejich protinádorovým účinkem a sníženou hladinou c-Myc. Vzhledem k zaměření našeho pracoviště na vývoj protinádorové léčby, včetně triterpenů, a možnosti využití robotické platformy pro vysokokapacitní screening, jsme vytvořili buněčnou linii s reporterem sledujícím hladinu transkripčního faktoru c-Myc. Při realizaci druhého záměru, jsme v rámci designu této linie zachovali lokus c-Myc s minimální modifikací, kterou bylo začlenění reporterové značky do C-koncové oblasti proteinu pomocí CRISPR/Cas9. Tím jsme zachovali fyziologickou expresi c-Myc a získali unikátní možnost sledovat dynamiku exprese obou hlavních izoform c-Myc. Oba reportérové systémy byly podrobně popsány a ověřeny. Pro vysokokapacitní screening jsme optimalizovali podmínky a zvolili referenčního antagonistu, látku 10074-G5. Nyní provádíme primární screening komerčně dostupných chemických knihoven s cílem identifikovat látky, které snižují proproliferaci funkce c-Myc na úkor těch podporujících quiscenci nebo buněčnou smrt. Během validace c-Myc reportérových linií jsme identifikovali další regulátory exprese těchto izoform, transkripční faktor β -katenin a ribozomální proteiny, vedle již popsaných kináz mTOR a PKR.

Třetí část práce se zaměřuje na ribozomální biogenezi, která je významně ovlivněna c-Myc. Dokumentujeme patofyziologické projevy ribozomálního stresu při haploinsuficienci RPS7 a RPL11. Vytvořili jsme dva typy buněčných modelů: první pomocí siRNA knockdownu ke snížení exprese ribozomálních genů RPS7 a RPL11. Druhý odstraněním jedné alely RPL11 a vnesením bodové mutace pro RPS7 pomocí CRISPR/Cas9. Oba typy modelů vykazují patofyziologické projevy spojené s Diamond-Blackfanovou anémií a ribozomálním stresem. Přičemž pro studium konkrétních mutací je nezastupitelný buněčný model vytvořený CRISPR/Cas9.

Tímto bychom rádi zdůraznili význam CRISPR/Cas9 technologie při vývoji buněčných modelů pro lepší porozumění patofyziologie vzácných onemocnění a následně pro nalezení nových terapeutických přístupů také pro onkologické malignity. V práci jsme rovněž shrnuli dosud známé informace o lokusu c-Myc a jeho izoformách s potenciálem v cílené terapii nádorových onemocnění.

Summary

This dissertation thesis contains three research projects focusing on the c-Myc oncogene. In a detailed characterization of the biological effects of triterpenes, derived from natural compounds, we identified a link between their anticancer effect and reduced c-Myc levels. Given our department's focus on the development of anticancer therapeutics, including triterpenes, and the possibility of using a robotic platform for high-throughput screening, we established a cell line with a reporter monitoring c-Myc transcription factor levels. In pursuit of the second goal, we retained the c-Myc locus within the design of this cell line with minimal modification, which was the incorporation of a reporter tag into the C-terminal region of the protein using CRISPR/Cas9. This preserved the physiological expression of c-Myc and provided a unique opportunity to monitor the expression dynamics of both major c-Myc isoforms. Both reporter systems have been described and validated in detail. For the high-throughput screening, we optimized the conditions and selected a reference antagonist, substance 10074-G5. We are now performing a primary screen of commercially available chemical libraries to identify agents that reduce c-Myc pro-proliferative functions at the expense of those that promote quiescence or cell death. During the validation of c-Myc reporter cell lines, we identified additional regulators of the expression of these isoforms, the transcription factor β -catenin and ribosomal proteins, in addition to the previously described mTOR and PKR kinases.

The third part of the thesis focuses on ribosomal biogenesis, which is significantly influenced by c-Myc. We document the pathophysiological manifestations of ribosomal stress in RPS7 and RPL11 haploinsufficiency. We established two types of cellular models: the first one by using siRNA knockdown to reduce RPS7 and RPL11 gene expression. The second one by disabling the expression of one allele of RPL11 and introducing a point mutation for RPS7 using CRISPR/Cas9. Both models show pathophysiological manifestations associated with Diamond-Blackfan anaemia and ribosomal stress. The cellular model generated by CRISPR/Cas9 is indispensable for studying specific mutations.

With this, we would like to emphasize the importance of CRISPR/Cas9 technology in the development of cellular models for a better understanding of the pathophysiology of rare diseases and consequently for finding new therapeutic approaches also for cancer

malignancies. In this thesis, we also summarized the previously known information about the c-Myc locus and its isoforms with potential in targeted cancer therapy.

Obsah

1	Úvod	1
2	Izoformy c-Myc.....	5
2.1	Struktura lokusu <i>c-Myc</i>	5
2.2	Izoformy c-Myc p64 a p67	6
2.3	c-Myc S.....	9
2.4	MycHex1 a mrtI	10
2.5	Modulace hladiny c-Myc u nádorových onemocnění	13
3	Přehled způsobů, kterými c-Myc ovlivňuje proliferaci.....	16
3.1	Transkripční faktory rodiny E2F a OncomiR-1	17
3.2	Regulace exprese a aktivity komplexů Cdk s cykliny	18
3.3	Regulace exprese a funkce inhibitorů cyklin-dependentní kináz p21 a p27	20
3.4	Ovlivnění replikace DNA a stability genomu	22
4	c-Myc jako onkogen řídící buněčnou smrt	24
4.1	Současná aktivace c-Myc a Bcl-2 pohání tumorigenezi a brzdí buněčnou smrt.....	25
4.2	Regulace apoptózy v rukou c-Myc a rodiny BCL	26
4.3	Aktivita c-Myc určuje jeho apoptotický potenciál.....	28
5	Vliv transkripčního faktoru c-Myc na biogenezi ribozomů	33
5.1	Biogeneze ribozomů	33
5.2	c-Myc je globální regulátor biogeneze ribozomů.....	36
5.3	Ribozomopatie	37
6	Cíle práce.....	44
7	Materiál a metodika	45
7.1	Kultivace buněk a testování viability	45
7.2	Příprava buněčných modelů technologií CRISPR/Cas9	45
7.3	HiBiT Blotting	46
7.4	Transfekce siRNA, ovlivnění látkami	46

7.5	Stanovení NanoLuc aktivity	47
7.6	Izolace RNA z buněčných linií, kvantifikace mRNA a Sangerovo sekvenování.....	47
7.7	Analýza buněčného cyklu.....	47
7.8	Analýza inkorporace BrdU.....	48
7.9	Analýza proteosyntézy	49
7.10	Western blotting	49
7.11	Northern blotting.....	50
7.12	Statistická analýza	51
8	Výsledky.....	52
8.1	Vliv triterpenoidních pyridinů a pyrazinů na expresi proteinů souvisejících s apoptózou a buněčným cyklem	52
8.2	Reporterové buněčné modely dvou majoritních izoform c-Myc.....	55
8.3	Buněčné modely s haploinsuficiencí vybraných ribozomálních proteinů malé a velké podjednotky.....	67
9	Diskuze	80
9.1	Vliv triterpenoidních pyridinů a pyrazinů na expresi proteinů souvisejících s apoptózou a buněčným cyklem	80
9.2	Reporterové buněčné modely dvou majoritních izoform c-Myc a faktory regulující expresi p64 a p67.....	80
9.3	Studium změny fenotypu v důsledku haploinsuficience ribozomálních proteinů RPS7 a RPL11	88
10	Závěr.....	90
11	Přehled použité literatury.....	93
12	Seznam důležitých zkratk a symbolů.....	112
13	Curriculum Vitae.....	113
14	Přílohy.....	1

1 Úvod

Transkripční faktor c-Myc hraje ústřední roli v molekulární biologii a výzkumu nádorů, jelikož řídí různé buněčné procesy prostřednictvím složité kontroly genové exprese (1). Strukturně je c-Myc jaderný protein, který tvoří heterodimery s proteinem Max (MYC Associated Factor X). Tento komplex se váže na specifické sekvence DNA, známé jako E-boxy, v genových promotorech (2). Z hlediska funkce c-Myc buď aktivuje, nebo potlačuje transkripci genů, které jsou rozhodující pro růst, proliferaci a apoptózu buněk. Jako takový má významný vliv na osud buněk. Při regulaci buněčného růstu c-Myc zvyšuje transkripci genů kódujících proteinové produkty zapojené do buněčného cyklu (např. transkripční faktory E2F, cykliny a cyklin-dependentní kinázy) a potlačuje transkripci genů spojených s inhibicí mitogenních procesů (např. inhibitory cyklin-dependentních kináz p21, p27) (3–7). Je tedy zřejmé, že deregulovaná aktivita c-Myc může vést k neřízené buněčné proliferaci (8). Tento proproliferační účinek je klíčový pro zapojení c-Myc do tumorigeneze.

Deregulace c-Myc je běžným znakem nádorových onemocnění (9). Mnoho nádorových buněk vykazuje zvýšené hladiny c-Myc, což přispívá k nekontrolovanému růstu a sklonu k tvorbě nádorů. Změny v genu c-Myc, jako jsou mutace nebo amplifikace, jsou často pozorovány u různých druhů onkologických onemocnění, včetně nádorů prsu, plic a tlustého střeva (10–12). Aberantní exprese genu c-Myc může být vyvolána mnoha faktory, včetně mitogenních signálů, růstových faktorů a reakcí na buněčný stres; to poukazuje na to, jak složitá souhra regulačních mechanismů se podílí na kontrole genu c-Myc (2).

Kromě stimulace buněčného růstu se c-Myc podílí také na apoptóze neboli procesu programované buněčné smrti (13,14). Tato dvojí role přidává další úroveň složitosti tomu, jak c-Myc přispívá k tumorigenezi. Za určitých podmínek může c-Myc podporovat přežití buněk tím, že reguluje anti-apoptotické geny, které mohou blokovat proapoptotické signály v nádorových buňkách (15). Nicméně c-Myc může také indukovat apoptózu, pokud je to nutné k ochraně před nekontrolovanou proliferací poškozených buněk. Tyto paradoxní role podtrhují, jak zásadní význam má c-Myc pro udržení přirozené rovnováhy v každé buňce.

Kromě účasti v nádorových onemocněních hraje c-Myc klíčovou roli také v regulaci kmenových buněk (16). Přesněji řečeno, c-Myc se podílí na udržování pluripotence embryonálních kmenových buněk, což zajišťuje, že se tyto buňky mohou diferencovat v různé buněčné typy; to zahrnuje i erytroidní prekurzory, které vykazují snížený diferenciační potenciál u některých dědičných onemocnění, jako je Diamond-Blackfanova anémie (17,18). Kromě toho má c-Myc zásadní význam při přeprogramování somatických buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC), což je role, která je velmi důležitá pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství (19).

Zjištění, že c-Myc hraje klíčovou roli v nádorovém bujení, vedlo vědce k tomu, že se zaměřili na vývoj terapií zaměřených na tento transkripční faktor (20). Převládajícím směrem výzkumu je zkoumání, jak selektivně inhibovat aktivitu c-Myc v nádorových buňkách a narušit tak nekontrolovanou proliferaci, což je obrovským příslibem pro způsob léčby nádorů.

c-Myc reguluje celou řadu buněčných procesů, od buněčného růstu až po programovanou buněčnou smrt (21). Vliv na nekontrolovaný růst buněk i na apoptózu podtrhuje, proč je c-Myc velmi důležitý pro onkologický výzkum. Pokračující snaha o odhalení složitých cest a podmínek, které ovlivňují funkci c-Myc, může odhalit základ pro cílené terapie různých typů nádorů.

Regulace a fungování c-Myc významně ovlivňuje fenotyp buňky. Navzdory intenzivnímu studiu však mechanismy, kterými se proteiny kódované lokusem c-Myc podílejí na různých buněčných procesech, zůstávají nedostatečně objasněny (22–24). Velmi rozmanité funkce tohoto transkripčního faktoru mohou být způsobeny komplexním a nedostatečně prozkoumaným polycistronním lokusem. Bližší pochopení struktury a funkce jednotlivých izoforem c-Myc může být klíčem k vývoji bezpečné cílené léčby proti různým typům nádorů závislých na c-Myc.

Proteiny c-Myc mají mnoho společných rysů s jinými transkripčními regulátory. Tyto proteiny jsou lokalizovány v jádře, mohou být fosforylovány a mají relativně krátký poločas rozpadu, což jsou vlastnosti, které naznačují, že jsou regulovány na různých úrovních (25,26). C- a N-koncovým oblastem proteinů kódovaných c-Myc byly přiřazeny specifické

molekulární funkce. Například C-koncová doména proteinů c-Myc sdílí strukturní podobnosti s členy nadrodiny transkripčních faktorů basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ) viz Obrázek 2 (22). Dimerizace c-Myc s Max, členem rodiny bHLH-LZ, prostřednictvím oblasti HLH-LZ obou proteinů usnadňuje sekvenčně specifickou vazbu na motiv CACGTG nazývaný E-box Myc (EMS) v DNA (27–29). Proteiny c-Myc mohou stimulovat transkripci vazbou na sekvence EMS, zatímco nadbytek Max tuto transkripční aktivitu v buňkách antagonizuje (30–32). Aktivace transkripce proteiny c-Myc vyžaduje také neporušené N- a C-koncové domény. N-koncová oblast proteinů c-Myc funguje jako transaktivační doména a delece vysoce konzervovaných oblastí v rámci N-koncové domény, tzv. boxů Myc, snižují její transaktivační funkci (Obrázek 2) (32,33). Transaktivace může být navíc modulována proteiny, které interagují s N-koncovou doménou proteinů c-Myc, včetně proteinu vázajícího TATA (TBP) a proteinu pRb podobného proteinu p107 (34,35).

c-Myc funguje především v jádře jako transkripční faktor pro tři RNA polymerázy. Heterodimer c-Myc/Max je prostřednictvím aktivace nebo represe cílových genů pol II rozhodující pro postup do buněčného cyklu z quiescence (2,36–40). c-Myc významně ovlivňuje celkovou rychlost syntézy proteinů tím, že stimuluje aktivitu pol I (syntéza rRNA) a pol III, které se podílejí na produkci mnoha složek translačního aparátu (např. iniciační faktory translace, ribozomální proteiny) (41–45). Bylo proto zjištěno, že buňky s c-Myc^{-/-} vykazují sníženou rychlost syntézy RNA a proteinů spolu s prodlouženým buněčným dělením (46).

Schopnost vyvolat zástavu růstu a apoptózu je vnitřní vlastností proteinů kódovaných lokusem c-Myc (13,47,48). Přirozeně se vyskytující zkrácení, mutace nebo přestavby v sekvenci c-Myc však jen zřídka, pokud vůbec, negativně ovlivňují mitogenní nebo proapoptotické aktivity proteinů c-Myc. To do jisté míry platí i pro virový analog c-Myc, v-Myc, což je virový onkogen vyskytující se v některých retrovirech. Genetické sekvence v-Myc a c-Myc mají určité podobnosti, zatímco genové produkty vykazují významné rozdíly ve funkcích. Například v-Myc je často účinnější v podpoře nádorového bujení než c-Myc, a to kvůli rozdílům v regulaci a expresi (38–40). Mnoho lidských nádorů však vykazuje genetické nebo epigenetické změny v c-Myc, které narušují dráhu, jež je

základem buněčné smrti, a inhibují tak proapoptotickou aktivitu c-Myc (49–52). Je však třeba poznamenat, že mechanismus, kterým se aktivuje buněčná smrt, často zůstává nedotčen, a to i u pokročilých malignit, ale je brzděn, takže je nakonec upřednostňována proliferace (53–56).

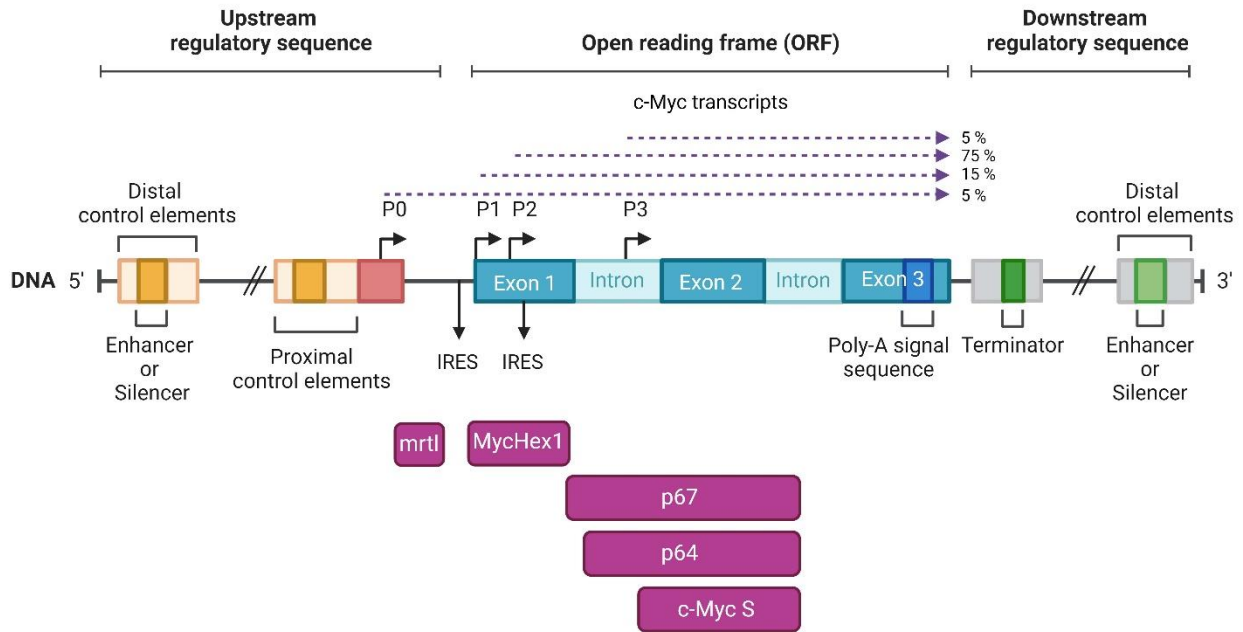
V následující kapitole se blíže podíváme na strukturu lokusu centrálního regulátoru transkripce c-Myc (Příloha I (57)).

2 Izoformy c-Myc

U člověka je velmi neobvyklé, aby z jednoho lokusu nebo z jedné mRNA vznikalo více než jeden protein. Jedním z takových případů je známý lokus *p16^{INK4a}/p14^{ARF}*, který kóduje dva odlišné proteiny s překrývajícími se kódujícími sekvencemi v různých čtecích rámcích, ale s příbuznými funkcemi (58,59). Je však zřejmé, že lidský lokus *c-Myc* a zejména polycistronní transkript *c-Myc P0* mají schopnost vytvářet několik různých proteinů viz Příloha I (57).

2.1 Struktura lokusu *c-Myc*

Struktura lidského lokusu *c-Myc* nacházejícím se na chromozomu 8q24 je složitá (Obrázek 1). Existují čtyři alternativní promotory P0, P1, P2 a P3, přičemž poslední z nich se nachází mezi 1. a 2. exonem genu (8,60–62). Lokus obsahuje kódující sekvence pro dvě delší izoformy proteinu *c-Myc* p67 a p64, jednu zkrácenou izoformu *c-Myc S*, spolu s proteinovými produkty dvou ORF označovaných *mrtl* a *MycHex1*. Sekvence *mrtl* a *MycHex1* se nepřekrývají se sekvencemi proteinů *c-Myc*, s výjimkou malého překryvu 19 bp mezi samotnou C-terminální sekvencí *MycHex1* a N-terminální sekvencí p67 *Myc*, které nejsou ve stejném čtecím rámci. P1 a P2 jsou dva nejčastěji používané promotory, které společně přispívají ke tvorbě přibližně 90 % transkriptů *c-Myc* v buňkách (63). Translace *c-Myc* může být zahájena na jednom ze dvou různých iniciačních kodonů (CUG nebo AUG), což vede k syntéze dvou izoform proteinu (p64 a p67) (64). p64 *Myc* (nazývaný také *c-Myc2*) je převládající produkt genu pravděpodobně zodpovědný za onkogenní vlastnosti lokusu *c-Myc* (65). p67 *Myc* (označovaný také *c-Myc1*) obsahuje navíc 14 aminokyselin na svém N-konci, oproti p64 a má zřejmě silné tumor supresorové vlastnosti. Stechiometrická rovnováha mezi p64 a p67 je důležitá pro určení chování buněk (66).

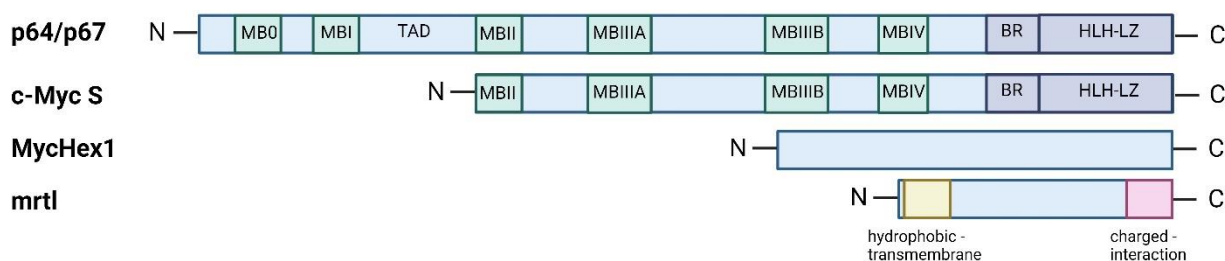


Obrázek 1 Schéma znázorňující strukturu lokusu *c-Myc*. Transkript vycházející z promotoru *P0* kóduje mRNA *mrtl* a *MycHex1*, které se nacházejí před kódujícími sekvencemi pro mRNA *p67* a *p64*. Pozice čtyř míst startu transkripce (*P0*, *P1*, *P2*, *P3*) jsou označeny ohnutými šipkami. Exony jsou označeny tmavě modrými obdélníky a introny světle modrými obdélníky. Míra transkripce iniciovaná ze čtyř promotorů je vyznačena čárkovanými tmavě fialovými šipkami. Pod kódující sekvencí DNA jsou všechny transkripty lokusu *c-Myc* vyznačeny světle fialovými obdélníky. Vytvořeno pomocí programu *BioRender.com* a převzato z Přílohy I (57).

2.2 Izoformy *c-Myc* *p64* a *p67*

Obě hlavní izoformy *c-Myc*, *p64* a *p67*, byly nalezeny u všech dosud zkoumaných druhů obratlovců (64). V buňkách savců a ptáků vznikají tyto dva proteiny alternativní iniciací na in-frame kodonech pro *p64* je to kodon AUG a pro *p67* CUG (64). Evoluční zachování tohoto vzorce exprese *c-Myc* lokusu v rozpětí 400 milionů let naznačuje, že více izoform může hrát důležitou roli ve funkci *c-Myc*. Protein *p67* vzniká z proximálního translačního startovacího místa CUG a obsahuje tedy amino-terminální prodloužení o 14 aminokyselin ve srovnání s proteinem *p64* (64) Obrázek 2. Existuje několik důkazů, které naznačují funkční význam proteinu *p67* pro růst buněk a nádorové bujení. Narušení syntézy *p67* bylo zjištěno u mnoha Burkittových lymfomů (25,64). Kromě toho jsou tyto dvě formy proteinu *c-Myc* během růstu buněk různě zastoupeny. Při zvýšené konfluenci buněk dochází k převaze proteinu *p67*. Což naznačuje, že protein *p67* hraje roli inhibitoru

růstu, zatímco u proteinů p64 a v-Myc se již dlouho ukazuje, že naopak stimulují proliferaci.



Obrázek 2 Schematické znázornění proteinových struktur kódovaných lokusem c-Myc. Značky N- a C- představují N- a C-koncové oblasti proteinů. Struktury proteinů plné délky jsou označeny světle modrými obdélníky. Konzervované oblasti boxů Myc jsou označeny MB0 až MBIV a znázorněny světle zelenými obdélníky. Transkripční aktivační doména (TAD) se nachází mezi MBI a MBII p64 a p67. Dimerizační domény p64, p67 a c-Myc S jsou znázorněny tmavě modře a jsou rozděleny na základní oblast (BR) a doménu helix-loop-helix leucinového zipu (HLH-LZ). V případě mrt1 je hydrofobní oblast znázorněna světle žlutě a nabitá oblast je znázorněna světle červeným obdélníkem. Struktura MycHex1 nebyla dosud podrobně charakterizována. Vytvořeno pomocí programu BioRender.com a převzato z Přílohy I (57).

Bylo zjištěno, že mnoho přestaveb genu *c-Myc*, které doprovázejí nádorové bujení, zahrnuje změny v 1. exonu. Ty často zahrnují úplné odstranění 1. exonu při chromozomálních translokacích, retrovirových translokacích, ale často také menší delece, bodové mutace a provirové inserce v 1. intronu (67). Většina interpretací se soustředila na myšlenku, že tyto změny ovlivňují pouze regulaci exprese *c-Myc*, protože oblast kódující protein začínající kodonem AUG v 2. exonu je zachována. První exon *c-Myc* obsahuje oblasti a regulační prvky, které jsou pravděpodobně důležité pro řízení exprese. Patří mezi ně místa pro přidání methylguanositové čepičky k *c-Myc* mRNA na 5' konci exonu 1 i v jeho blízkosti a oblast, která řídí prodlužování vznikajících RNA transkriptů, a také možný enhancerový prvek v blízkosti 3' konce exonu 1 (61,68–72). Odstranění prvního exonu, ke kterému dochází v řadě přestaveb lokusu *c-Myc*, mění strukturu promotoru *c-Myc*, a proto pravděpodobně vede k deregulaci.

Změny lokusu *c-Myc* mohou také vést k narušení syntézy obou alternativně iniciovaných proteinů. V buňkách Burkittova lymfomu vedou chromozomální translokace lokusu *c-Myc* nebo bodové mutace běžně ke ztrátě exprese proteinu p67, což přispívá k onkogenní aktivaci *c-Myc* (25,64). V buňkách s neporušeným lokusem *c-Myc* dochází

během jejich růstu k regulaci alternativní translační iniciace c-Myc. Protein p64 je převažující formou exprimovanou v aktivně rostoucích buňkách, zatímco syntéza p67 se dramaticky zvyšuje na úroveň stejnou nebo vyšší než u p64, jakmile se buňky přiblíží k zástavě růstu v důsledku kontaktní inhibice (73). Zdá se, že mezi proteiny p64 a p67 existují také funkční rozdíly. Protein p67 je silným a specifickým transaktivátorem enhancerového elementu EFII prostřednictvím vazebného místa C/EBP (sekvence TTATGCAAT). Rodina C/EBP se skládá z šesti příbuzných transkripčních faktorů s BR ZIP doménou, které současně řadíme mezi tumor supresory, protoonkogeny a regulátory diferenciace (74). Tato transaktivace je nezávislá na konkrétním typu nebo druhu buňky. Na rozdíl od silné transaktivace proteinem p67, protein p64 buď transaktivovat zesilovací element EFII nedokáže, nebo potlačuje transkripci řízenou EFII. Kromě toho existuje evidence, že proteiny v-Myc významně potlačují transkripci prostřednictvím enhancerového elementu EFII (66). Oba proteiny p64 a p67 jsou kompetentní k transaktivaci prostřednictvím kanonické sekvence EMS. Vzhledem k tomu, že oba mají shodnou C-koncovou doménu, jsou protichůdné účinky těchto dvou proteinů na transkripci řízenou EFII s největší pravděpodobností důsledkem rozdílných N-terminálních domén (27). Možným vysvětlením je, že aminoterminální prodloužení způsobuje celkovou konformační změnu v N-koncové oblasti proteinu p67 obsahující transaktivací doménu. Tato odlišnost v konformaci může umožňovat rozdílný kontakt s transkripčními komplexy v závislosti na DNA vazebném místě (66).

Protein c-Myc vykazuje kromě aktivace transkripce také několik odlišných molekulárních funkcí, včetně potlačení transkripce a přímé modulace syntézy DNA (22,75). Pro schopnost c-Myc potlačovat transkripci promotoru *cyklinu D1* je podstatná právě oblast N-terminální domény (75). Zjištění, že proteiny p64 a p67 odlišně transaktivují vazebné místo pro C/EBP, avšak oba aktivují transkripci sekvence EMS, ukazuje jak na odlišné, tak na překrývající se funkce těchto dvou proteinů. Regulace transkripce sekvence C/EBP zprostředkovaná p67 Myc naznačuje, že celková transkripce genů obsahujících tuto sekvenci může být regulována relativním poměrem p64, p67 proteinů a členů rodiny C/EBP v buňkách. Na podporu této myšlenky Freytag a Geddes (1992) ukázali, že existuje protichůdná regulace adipogeneze proteiny C/EBP a p64 (76). Hladiny obou proteinů c-Myc se v buňkách značně liší v závislosti na konkrétní fázi růstu

(73). Rostoucí buňky mají obvykle nízké hladiny proteinu p67 ve srovnání s p64. Jakmile se však buňky v kultuře přiblíží ke konfluenci, dochází k trvalému pěti- až desetinásobnému zvýšení syntézy proteinu p67 na úroveň vyšší nebo stejnou jako u hladiny proteinu p64. Tato významná a specifická stimulace translace proteinu p67 je zřejmě řízena dostupností methioninu v růstovém médiu (73). Modulace hladin proteinu p67 proto může být jednou z časných reakcí buněk na přizpůsobení růstu v reakci na nedostatek živin.

Je zajímavé, že nadměrná exprese C/EBP má rovněž inhibiční účinek na růst (77). Nicméně vzhledem k tomu, že oba proteiny p64 a p67 transaktivují expresi prostřednictvím sekvencí EMS, mohou jim být společné některé biologické funkce. Je pravděpodobné, že pokud dojde k narušení syntézy proteinu p67 v důsledku genetické mutace nebo přestavby, jako je tomu u Burkittova lymfomu, zasažené buňky ztrácejí růstovou inhibiční odpověď na chybějící živiny, což přispívá k onkogenezi.

2.3 *c-Myc S*

Lidské, myší a ptačí buňky exprimují kromě proteinů p64 a p67 také menší proteiny *c-Myc S*. Tyto zkrácené proteiny, označované jako *c-Myc S*, vznikají při leaky scanning na konzervovaných kodonech AUG za iniciačními místy pro p64 a p67 v exonu 2 (78). *c-Myc S* postrádají většinu N-koncové transaktivační domény, ale zachovávají si C-koncovou dimerizační a DNA vazebnou doménu (Obrázek 2). Stejně jako proteiny p64 a p67 jsou i proteiny *c-Myc S* lokalizovány v jádře, jsou relativně nestabilní a fosforylované. Významné hladiny *c-Myc S*, které se často blíží hladinám p64 a p67, jsou přechodně pozorovány během fáze rychlého růstu několika různých typů buněk (78). Proteiny *c-Myc S* nejsou schopny aktivovat transkripci a inhibují p64 a p67, což naznačuje jejich dominantně negativní inhibiční funkci (79). Ačkoli by se neočekávalo, že tyto inhibitory transkripce budou fungovat jako p64 a p67, výskyt nádorů, které exprimují konstitutivně vysoké hladiny *c-Myc S*, a jejich přechodná syntéza během rychlého růstu buněk naznačují, že tyto proteiny nezasahují do růst stimulačních funkcí p64 a p67. *c-Myc S* si tedy zachovává schopnost podporovat buněčnou proliferaci navzdory ztrátě většiny transkripční aktivační domény (78).

2.4 MycHex1 a mrtI

Důkaz o existenci vnitřního ribozomálního vstupního místa (IRES) určeného výhradně k usnadnění translace proteinu MycHex1 vyvolalo zájem o fyziologickou úlohu mRNA *c-Myc P0* a proteinu MycHex1 (63). Jak mrtI, tak MycHex1 se vyskytují pouze u primátů na rozdíl od *c-Myc*, který je zachován u všech obratlovců. mrtI i MycHex1 jsou relativně bazické proteiny s pI 8,65, respektive 11,87. mrtI je tvořen 114 aminokyselinami (12,5 kDa) a je bohatý na arginin. N-koncová oblast je velmi hydrofobní a předpokládá se, že slouží jako jediná transmembránová doména (40) Obrázek 2. Hydrofobní oblast je přerušena řadou nabitých aminokyselin (RSER). Vnitřní iniciační kodon potenciálně umožňuje syntézu o něco menší izoformy mrtI, označované mrtX (98 aminokyselin; 10,8 kDa), která postrádá větší část transmembránové domény. Ve střední oblasti proteinu se nacházejí dvě myristoylační místa, která by mohla dále usnadňovat membránovou asociaci mrtI. C-koncová sekvence obsahuje několik střídavě kladně a záporně nabitých zbytků a vykazuje značnou homologii s řadou proteinů vázajících RNA (40). Pravděpodobně slouží jako interakční doména s jinými proteiny (80). Jsou zde čtyři místa pro potenciální fosforylaci serinových zbytků (konsenzuální substráty pro PKC, kaseinovou kinázu II, PKA a PKG), z nichž dvě se nachází uprostřed nabitých zbytků C-koncové domény (40).

Významná je rovněž regulace exprese *c-Myc* na translační úrovni (73,81,82). Přirozená syntéza mrtI *in cis* z mRNA *c-Myc* umísťuje mrtI do bezprostřední blízkosti regulačních sekvencí řídících účinnost translace *c-Myc*. Hlavní determinantou translační regulace *c-Myc* je IRES, který se nachází v 5' UTR mezi kódujícími sekvencemi mrtI a *c-Myc* (83,84). Jednou ze zajímavých možností je, že mrtI může regulovat translaci *c-Myc* prostřednictvím modulace aktivity IRES. Z genetického hlediska jsou mrtI a *c-Myc* velmi úzce propojeny, takže amplifikace genu nebo chromozomální translokace zahrnující *c-Myc* často mohou zahrnovat i kódující sekvenci mrtI (40). Vzhledem ke vztahu mezi mrtI a *c-Myc*, lze předpokládat, že mrtI může přispívat k úloze lokusu *c-Myc* v onkogenezi.

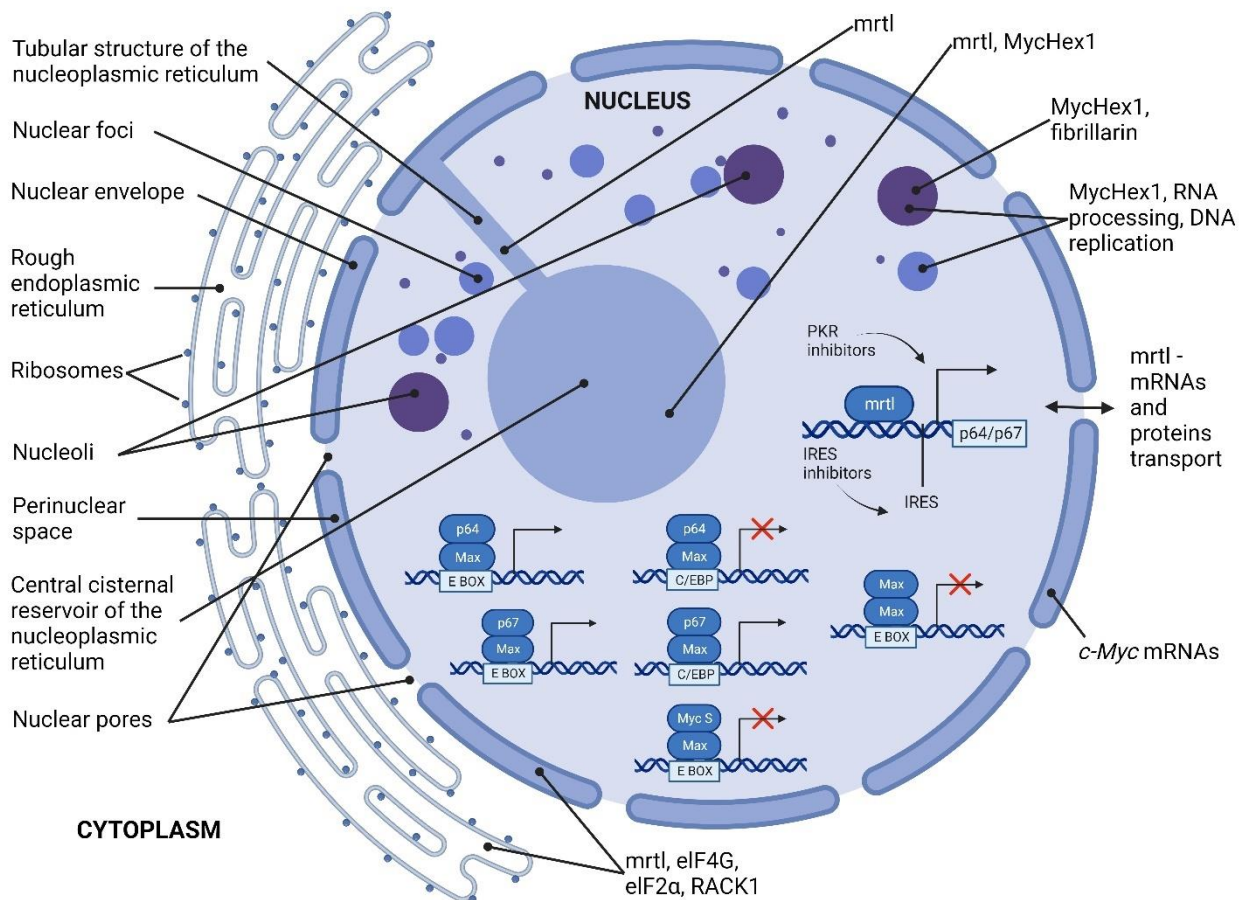
mrtI se převážně nachází v jaderném obalu, endoplazmatickém retikulu a tubulárních a cisternálních strukturách nukleoplazmatického retikula (40). Vzhledem k tomu, že jaderný obal i drsné ER jsou posety ribozomy, existuje možnost, že se mrtI může

nacházet v těsné blízkosti translačního aparátu, a tedy by se mrtl mohl podílet na regulaci translace. mrtl je ve velké míře kolokalizován s iniciačními faktory translace eIF4G, eIF2 α a také s integrálním 40S ribozomálním proteinem RACK1 (40).

Naproti tomu MycHex1 se nachází v jaderných ložiscích a kolokalizoval s mrtl v jediném místě v jádře, označovaném jako centrální cisternální rezervoár nukleoplazmatického retikula (85). MycHex1 se vyskytuje v několika diskrétních jaderných ložiscích, která kolokalizují s fibrillarinem a místy značenými protilátkou anti-BrdU (85). Fibrillarin je ribonukleoprotein a marker nukleolů (snRNP), který se podílí na zpracování ribozomální RNA (86). BrdU se inkorporuje do DNA, což naznačuje, že tato jaderná ložiska MycHex1 mohou představovat místa replikace DNA. Vzhledem k tomu, že MycHex1 je vysoce bazický protein, může být spojen buď s DNA anebo RNA, což usnadňuje buď replikaci, nebo procesování RNA (85).

Endogenní mrtl a MycHex1 byly koimunoprecipitovány s RACK1, c-Myc, fibrillarinem, coilinem a mezi sebou navzájem (85). Mají tedy více interakčních partnerů v jádře a cytoplazmě. Teoreticky se mohou podílet na udržování důležitých proteinových komplexů pohromadě. Jak napovídá jejich struktura s několika střídavě nabitými aminokyselinovými zbytky. Oba proteiny jsou poměrně bohaté na arginin a serin a vykazují homologii s mnoha proteiny vázajícími RNA (85).

Buněčné jádro je vysoce organizované a obsahuje mnoho odlišných jaderných tělísek, včetně nukleolů, Cajalových tělísek, jaderných skvrn, paraspekul, tělísek PML a tělísek Polycomb (87). Tato jaderná tělíska se od okolí neoddělují membránou, a proto si mohou volně vyměňovat svůj obsah s okolní nukleoplasmou (87). MycHex1 může tedy přispívat k sestavování a stabilitě specifických jaderných tělísek. Skutečnost, že MycHex1 je schopen homo-oligomerizace, spolu s jeho koimunoprecipitací s více předpokládanými vazebnými partnery, by mohla být v souladu s takovou funkcí (88). Nukleoplazmatické retikulum je sítí intranukleárních membránových tubulů ústících do centrálního cisternálního rezervoáru (89–93). Je tvořeno hlubokými invaginacemi jaderného obalu a jeho obsah je shodný s cytoplazmou. NR poskytuje rozsáhlé zvětšení plochy pro kontakt jádra a cytoplazmy. Lokalizace mrtl v celém jaderném obalu a NR naznačuje, že by se mrtl mohl podílet na komunikaci nebo transportu mezi cytoplazmou a jádrem (40).



Obrázek 3 Schematické znázornění interakce a lokalizace izoforem c-Myc. p64/Max, p67/Max, Myc S/Max a Max/Max transkripční aktivity na E-box a C/EBP responsivních elementech jsou znázorněny ve spodní části obrázku, zatímco lokalizace a funkce mrtI a MycHex1 jsou znázorněny v horní části obrázku. Vytvořeno pomocí programu BioRender.com a převzato z Přílohy I (57).

Je dobře známo, že nově syntetizované proteiny, které nakonec budou fungovat na buněčné membráně, se do membrány ER vkládají prostřednictvím interakce mezi signálním peptidem a částicí rozpoznávající signál. Lze předpokládat, že proteiny, jako je c-Myc, které jsou určeny pro funkci v jádře, mohou podléhat analogickému ko-translačnímu přenosu, při němž je syntetizovaný protein veden přes jadernou membránu do nukleoplazmy. Je známo, že mRNA c-Myc je obohacena v perinukleární oblasti, a výrazné umístění mrtI na jaderné membráně a nukleoplazmatickém retikulu spolu s jeho slabou celkovou homologií s transportními proteiny ABC (ATP-binding cassette) naznačují takovou funkci (40,94). Kromě specifické regulace translace c-Myc *in cis* je možné, že mrtI může fungovat také *in trans* a regulovat translační účinnost jiných mRNA. K vodítkům, že fyziologický účel mrtI v buňce může přesahovat modulaci c-Myc, patří jeho

široká distribuce v celé síti ER/NR membrán, jeho stabilní akumulace v buňkách a jeho těsná integrace do struktur buňky. Ve skutečnosti může mrtl hrát důležitou strukturální roli při zprostředkování dynamických interakcí mezi intracelulární membránovou sítí, mRNA a translačním mechanismem (40). Mrtl, který působí na rozhraní cytoplazmy a jádra, může být velmi důležitý pro orchestraci cytoplazmatických procesů s reakcemi probíhajícími v samotném jádře (95).

2.5 *Modulace hladiny c-Myc u nádorových onemocnění*

c-Myc se podílí na vzniku různých druhů nádorů a dalších onemocnění, mimo jiné lymfomů, nádorů prsu, plic, tlustého střeva a prostaty. Úloha a význam c-Myc se mohou u různých typů onkologických onemocnění lišit (9). Vysoké hladiny exprese c-Myc u některých druhů nádorů korelují se špatnou prognózou. Často je spojena s agresivnějším chováním nádoru, zvýšenou pravděpodobností metastazování a rezistencí na léčbu. Změny hladin exprese c-Myc v průběhu léčby mohou sloužit jako ukazatel odpovědi na léčbu. Sledování hladin c-Myc může pomoci posoudit účinnost léčby a řídit rozhodování o léčbě (9).

Transkripční faktor c-Myc se stal významným cílem terapeutických zásahů, zejména v souvislosti s onkologickými onemocněními a dalšími chorobami (96,97). Vzhledem k jeho klíčové roli při podpoře tumorigeneze a jeho časté deregulaci u různých malignit zkoumali vědci dvě základní strategie inhibice c-Myc: přímou inhibici jeho aktivity a nepřímé přístupy, které modulují jeho expresi nebo stabilitu (98).

Přímá inhibice zahrnuje vývoj terapeutik, která mají narušit jeho transkripční aktivitu, modulovat jeho interakce s kofaktory nebo způsobit stabilizaci G kvadruplexu v jeho promotoru. Tento přístup je sice náročný kvůli nedostatku dobře definovaných vazebných míst na c-Myc, ale slibuje přesné zacílení na onkoprotein. Další strategie v této kategorii zahrnují antisense oligonukleotidy (ASO), které cílí na mRNA c-Myc a způsobují její degradaci, a miniproteiny navržené tak, aby blokovaly jeho vazebnou doménu pro DNA (97).

Na druhé straně se nepřímá inhibice zaměřuje na manipulaci s drahami nadřazenými nebo podřazenými c-Myc. Strategie v této kategorii zahrnují také modulaci

degradace c-Myc a stability proteinu většinou prostřednictvím posttranslačních modifikací (20,99).

Seznam látek patřících mezi přímé a nepřímé inhibitory c-Myc je shrnut v Tabulka 1.

Tabulka 1 Seznam látek a kandidátních léčiv přímo a nepřímo inhibujících c-Myc.

Nepřímé inhibitory c-Myc	Inhibitory rodiny BET	JQ1, Birabresib (OTX015, MK-8628), Molibresib (GSK525762), RO6870810 (RG6146, TEN-0), FT-1101 (CC-95775), ZEN-3694, BMS-986158, AZD5153, BI894999, CPI-0610, GSK2820151, INCB057643, INCB054329 a GS-5829, TEN-010 , ABBV-075, PROTACs ARV-771, a ARV- 825
	Inhibitory BCR	Ibrutinib, ARQ531
	Inhibitor eIF4A	Silvestrol
	Inhibitory PI3K	Idelalisib, TGR-1202, Fimepinostat (CUDC-907), BR101801
	Inhibitory CDK	Dinaclyclib, TG02, KB-0742, THZ1 a THZ2, aminopyrimidiny, deriváty triazanů, karbamoyl sulfoximid, 4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)-N-1,3,5-triazin-2-amin
	Inhibitory PIM1	AZD1208, SGI-1776, TP-3654 (SGI-9481), MEN1703, PIM447
	Inhibitory PIN1	KPT-6566, Retinoid ATRA, BJP-06-005-3, Sulfopin, PIM447, SEL24 (MEN1703)
	Modulátory PP2A	DT-061, FTY720, OP449, Perphenazin, LB-100
	Inhibitory SKP2	SZL-P1-41, FKA, Dioscin, SKPin C1
	Inhibitory USP7	P22077, XL177A, GNE-6640, GNE6776, FT671
	Inhibitory JAK2/STAT3	MTAP-26, MTAP-27, WP1066, WP1130, a WP1129
	Inhibitor NF-κB	Guggulsteron
	Inhibitor Src kinázy	Saracatinib
	Aktivátory FBXW7	Oridonin, HAO472
	Inhibitory Aurora-A kinázy	Alisertib (MLN8054, MLN8237), CD532
	Inhibitor Aurora-B kinázy	AZD1152
	Inhibitor PLK-1	BI6727
	Inhibitory HUWE1	BI8622 a BI8626
Inhibitory HDAC	Entinostat, Tucidinostat, CUDC-907	
Přímé inhibitory c-Myc	Stabilizátory G quadplexů	CX-3543, APTO-253, IZCZ-3, cationic porphyrins (TMPyP4), quarfloxin, DM039, ruthenium complexes (Se2Py3, Se2SAP)
	ASO (Antisense oligonucleotides)	AVI- 4126, MYC-ASO, INX-3280, INX-6295
	Miniproteiny a proteinové domény	OmoMYCs (OMO-103, OMO-1 , FPPa-OmoMYC), Bac- ELP-H1, PNDD1, ME47, Mad, alfa-helix peptid H1
	Disruptory interakce Myc/Max	ME47, EN4, 3jc48-3, pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny (MYCro1, MYCro2 a Mycro3), KJ-Pyr-9 (Kröhnkeovy pyridiny), MYCMI-6, MYCMI-7, MYCi975, MYCi361, KSI-3716, MYRA-A, MI1-PD, KI-MS2-008, quinolonové deriváty (KSI-1449, KSI-2302, a KSI-3716), substituované pyrazoly (NUCC-0176242 a NUCC-0176248), IIA6B17, 10058-F4, 10074-G5, JY-3-094, JKY-2-169, SaJM589
	Stabilizátory homodimerů Max/Max	KI-MS2-008, NSC13728

Pokud jde o přímé ovlivnění poměru izoform p64 a p67 malými molekulami, provedli Vaklavas a kolegové rozsáhlý vysokokapacitní screening 135 000 sloučenin (100). Mezi nimi byl identifikován inhibitor translace zprostředkované IRES. Struktura a aktivita tohoto hitu byla výrazně zlepšena, což vedlo k vývoji cpd_P. Tento cpd_P způsobuje úplnou ztrátu klonogenního přežívání, masivní buněčnou smrt, terminální diferenciaci a smrt nádorových kmenových buněk (101).

K objevení dalšího modulátoru IRES inhibujícího translaci c-Myc, pojmenovaného J007, bylo třeba otestovat knihovnu 145 000 sloučenin. Úsilí se rozhodně vyplatilo, protože J007 inhibuje proliferaci buněčných linií mnohočetného myelomu a růst nádorů *in vivo* (102). Navíc při současné aplikaci J007 a PP242 (inhibitoru mTOR) vyvolává buněčnou smrt u glioblastomu rezistentního na inhibici mTOR (103). Účinek J007 na expresi izoform p64 a p67 je třeba ještě objasnit.

3 Přehled způsobů, kterými c-Myc ovlivňuje proliferaci

Hladiny mRNA a proteinu c-Myc se mění v závislosti na tom, zda-li se buňky účastní buněčného cyklu anebo jsou quiescentní. V přítomnosti růstových faktorů nebo jiných stimulů dochází k velmi rychlému zvýšení hladin c-Myc prostřednictvím transkripčních a post-transkripčních mechanismů (104). Po aktivaci mitogeny je transkripce c-Mycu stimulována hned několika signálními drahami. Nejčastěji se jedná o Ras/Raf/Mek/Erk, kinázy Akt, Janus, Src, Abl, Bcr-Abl (105–112). Oproti tomu, při snížení hladiny c-Myc, je výsledný efekt antiproliferativní a může být například způsoben cytokiny - interferonem- γ nebo TGF β (113,114). U mnoha buněčných typů je snížení hladiny c-Myc asociováno s nástupem diferenciaci a akumulací buněk v G₀/G₁ fázi případně G₂/M fázi. Rozdíl mezi akumulací v těchto dvou fázích je u různých buněčných typů často dáván do souvislosti s tumor supresory Rb, p53, p16 (115). Vliv c-Myc může být dále omezen snížením jeho transkripční aktivity prostřednictvím vazby s jemu příbuznými Mxd proteiny (Mxd1, Mxi1, Mxd3, Mxd4 a Mnt) (116). Z uvedeného je zřejmé, že v proliferaci má c-Myc nezastupitelnou roli, avšak bylo zjištěno, že buněčné dělení může být dokončeno i při absenci c-Myc (7). Transkripční faktor c-Myc řídí transkripci tisíců genů a mezi nimi je významně zastoupena skupina genů ovlivňujících buněčný cyklus (cyklin D2, cyklin E1, Cdk4, Cdc25A, E2F1). Působení c-Myc je vyhraněno na již aktivní geny s nízkou expresí,

u kterých svou aktivitou způsobuje rychlý a významný nárůst exprese. O c-Myc je dále známo, že reguluje metabolismus a syntézu nukleotidů a proteinů, tedy všeho nutného pro úspěšnou proliferaci (117–119).

3.1 *Transkripční faktory rodiny E2F a OncomiR-1*

Transkripční faktory rodiny E2F jsou esenciální pro vstup buněk do S fáze. Jejich exprese je indukována ektopickou expresí c-Myc v quiescentních buňkách. c-Myc se váže na E-boxy v promotorech E2F1, E2F2 a E2F3, přičemž je zcela nezbytný pro úplnou indukci E2F2 a E2F3 (120). Zároveň v oblasti promotoru genu c-Myc je vazebné místo pro E2F. Jedním z významných faktorů s potenciálním významem pro nádorové bujení je zpětnovazebná smyčka kterou společně tvoří geny c-Myc, E2F a klastr miR-17-92, nazývaný též OncomiR-1 (121). Deregulovaná exprese členů OncomiR-1 má důležitou roli při vzniku mnoha solidních nádorů. Regulační mechanismus c-Myc/E2F/miR-17-92 vytváří rovnováhu mezi proliferací buněk a buněčnou smrtí. Exprese klastru miR-17-92 je regulována na transkripční a posttranskripční úrovni. Transkripční regulace je spojena s c-Myc, N-Myc, E2F a cyklinem D1 (6). Paralogy Myc se vážou na E-box nacházející se 1480 bp před miR-17-92a. Na druhou stranu dva členové klastru OncomiR-1, miR-17 a miR-20 negativně regulují translaci E2F1, E2F2 a E2F3, čímž vytvářejí autoregulační smyčku. Popsaným mechanismem c-Myc současně aktivuje E2F transkripci a omezuje jeho translaci. Podobně jako c-Myc a N-Myc se rodina transkripčních faktorů E2F, může přímo vázat na promotor miR-17-92a a regulovat jeho expresi (122).

Stěžejní regulátory buněčného cyklu jsou ovlivňovány c-Myc prostřednictvím snížení jejich exprese indukci určitých miRNA. Jedná se například o členy rodin let-7, miR-15a/16-1, miR-26a a miR-34a (123). miRNA rodiny let-7 působí snížení exprese Cdc25a, Cdk6, cyklinu A, cyklinu D1, D2 a D3 (124). Exprese Cdk4, Cdk6, cyklinu E2 a E2F je utlumována miR-34a. miR-15a/16-1 cíleně reguluje Cdk6, E2F3, cyklin D1 a D3. Cykliny D2 a E2 mohou být reprimovány miR-26a (125). Dále bylo zjištěno, že c-Myc indukuje lncRNA H19, která stimuluje proliferaci snížením exprese Rb (126). Transkripční faktor c-Myc rovněž negativně reguluje expresi miR-29b-1 interakcí s jeho promotorovou oblastí. Osa c-Myc/miR-29b-1/CDK je nově popsáným regulačním mechanismem, který podporuje proliferaci buněk a plní důležitou roli v průběhu buněčného cyklu (127). Lze

shrnout, že indukce i represe určitých miRNA způsobená c-Myc zasahuje do všech úrovní regulace buněčného cyklu a usnadňuje průchod buněčným cyklem. Současně určité miRNA regulují transkripčně a posttranskripčně hladinu c-Myc. Například microRNA-125a snižuje hladinu c-Myc na úrovni mRNA (128). Zatímco miR33b, miR96 a miR503 regulují translaci c-Myc a cyklinu D1 (129). Také miR-184 působí jako nádorový supresor prostřednictvím cílení na CDC25A a c-Myc (130).

3.2 Regulace exprese a aktivity komplexů Cdk s cykliny

c-Myc indukuje průběh G₁-S fází prostřednictvím zvýšení aktivity Cdk1, Cdk2, Cdk4 a Cdk6. Důležité je, že c-Myc je schopen zvýšit hladiny aktivních cyklin/Cdk komplexů nejen prostřednictvím aktivace exprese cyklinových a Cdk genů, ale také indukci Cdk aktivačních kináz (CAK) nebo fosfatáz (Cdc25), případně represí inhibitorů Cdk kináz (Wee1) (7).

Ze všech genů kódujících Cdk je nejzřetelnějším cílem transkripčního faktoru c-Myc Cdk4. Upregulace Cdk4 byla pozorována při expresi c-Myc v různé míře v mnoha odlišných buněčných typech pocházejících jak z myších, tak z lidských buněčných linií. Exprese Cdk4 je řízena přímo vazbou c-Myc na promotor CDK4 (131). Dále bylo zjištěno, že se c-Myc váže na gen Cdk6 a ovlivňuje tím expresi Cdk6 mRNA (132). Regulace exprese Cdk2 prostřednictvím c-Myc je komplexní a v literatuře se vyskytují protichůdné informace. U Cdk1 je známo, že c-Myc společně s Ras nebo cyklinem C indukuje Cdk1 a bylo identifikováno jeho vazebné místo v promotoru Cdk1 (122,133). Navíc c-Myc reguluje epigeneticky hladiny cyklinu B1 a CDK1 prostřednictvím modulace aktivity TIP60/MOF, který zprostředkovává acetylaci histonu H4 (134). Bylo zjištěno, že inhibice Cdk1 je synteticky letální s c-Myc (135).

Podobně rozporuplné informace jako v případě Cdk2 nacházíme také u cyklinu D1. Z některých studií vyplývá, že c-Myc aktivuje expresi cyklinu D1, přičemž z jiných je zřejmé, že je tomu naopak a nebo, že nemá žádný vliv (136,137). V případě cyklinu D2 se c-Myc váže na E-box element přítomný v promotoru cyklinu D2 a zprostředkovává acetylaci histonů prostřednictvím TRRAP, čímž dochází k indukci mRNA a proteinu (138). Tímto mechanismem c-Myc tedy částečně podporuje progresi buněčného cyklu v G₁ fázi. Podobný vztah panuje také u cyklinu D3, který rovněž patří mezi cílové geny c-Myc. c-

Myc také upreguluje geny cyklinů E1 a E2 u lidských i myších buněčných linií (122) (4,139). U cyklinu E1 to vstává k aktivaci komplexu cyklinu E/Cdk2 a indukci syntézy DNA. Kromě toho může c-Myc indukovat expresi cyklinu E1 nepřímo prostřednictvím indukce transkripce E2F. Můžeme tedy shrnout, že c-Myc pozitivně reguluje Cdk4/6, Cdk2, cykliny typu D a E čímž usnadňuje průchod G₁ fází buněčného cyklu. Při downregulaci c-Myc dochází k zástavě v G₁ fázi, která může být zvrácena ektopickou expresí komplexů cyklinu E/CDK2 a cyklinu D1/Cdk4. Zvýšená exprese mRNA a proteinu cyklinu A byla pozorována při upregulaci c-Myc, a kromě toho se zdá, že cyklin A je nezbytný pro progresi buněčného cyklu závislou na c-Myc (122) (140). V promotoru cyklinu B1 bylo také nalezeno vazebné místo pro c-Myc (122,133). Translaci cyklinu B1 c-Myc podporuje prostřednictvím aktivace dráhy c-Myc/WDR4/EIF2A/CCNB1(141).

K aktivaci komplexů cyklin/Cdk dochází nejen jejich zvýšenou expresí, ale také posttranslační modifikací Cdk kináz. To zprostředkovává například CAK, která fosforyluje T smyčku Cdk (142). CAK je tedy zodpovědná za aktivační fosforylaci u Cdk1 na Thr161, Cdk4 na Thr172, Cdk6 na Thr177, které jsou strukturálně ekvivalentní Thr160 v Cdk2 (143). CAK se skládá ze tří podjednotek cyklinu H, MAT1 a katalytickou část tvoří Cdk7. c-Myc podporuje aktivitu CAK zvýšenou translací mRNA všech jejích podjednotek. c-Myc je také schopen vazby na promotor CDK7. CAK je také jednou z podjednotek obecného transkripčního faktoru TFIIH, který je součástí preiniciačního komplexu RNA polymerázy II (144). c-Myc rekrutuje Cdk7 k počátkům transkripce, zvyšuje aktivitu CAK a tím zároveň podporuje iniciaci transkripce, jelikož dochází k fosforylaci na Ser5 C-koncové domény (CTD) RNA polymerázy II. Cdk7 následně podporuje transkripci onkogenů c-Myc, TERT, RAD51 a Bcl-2 (143).

Aktivita Cdk je regulována také prostřednictvím inhibičních fosforylací dvou konzervovaných zbytků v blízkosti N-konce, které se nacházejí v ATP-vazebném místě enzymu. Konkrétně se jedná o Thr14 a Tyr15 u lidských Cdk1 a Cdk2. Fosforylaci Tyr15 provádí Wee1 (145). Bylo popsáno, že c-Myc i N-Myc indukují miR-221, který cílí právě Wee1 (146). Experimentálně bylo zjištěno, že mezi hlavní geny synteticky letální s c-Myc patří právě Wee1 a Cdk12 (147). miR-221 také ovlivňuje další signální dráhy tím, že moduluje další mRNA, včetně těch pro tumor supresory Rb, p27 a p57. Pro aktivaci Cdk

je zapotřebí, aby byly oba zbytky defosforylovány, což je zvláště důležité při mitóze zprostředkované Cdk1. Tento krok má na starost rodina fosfatáz Cdc25 (148). Cdc25B a Cdc25C hrají hlavní roli v progresi mezi fázemi G₂/M, zatímco Cdc25A pomáhá při přechodu z G₁ do S fáze (149). Cdc25A, Cdc25B náleží mezi cílové geny c-Myc a zároveň Cdc25A je důležitým prvkem pro c-Myc řízenou apoptózu (150).

3.3 Regulace exprese a funkce inhibitorů cyklin-dependentní kináz p21 a p27

Prostřednictvím mnoha mechanismů c-Myc snižuje expresi inhibitoru cyklin-dependentní kináz p21^{CIP1/WAF1} (dále jen p21) (4,5). Jedním z nich je interakce s transkripčním faktorem Miz-1. Zatímco samotný Miz-1 stimuluje transkripci, přímá interakce s c-Myc transformuje tento transkripční faktor na transkripční represor. Interakce c-Myc/Miz-1 blokuje indukci p21 zprostředkovanou p53 a v důsledku toho, c-Myc přispívá k indukci apoptózy expresí cílových genů p53: PUMA a NOXA (133). Kromě toho uvedeným mechanismem c-Myc také zabraňuje diferenciaci hematopoetických buněk zprostředkovanou p21. Dále bylo popsáno, že c-Myc a Miz-1 tvoří ternární komplex s DNA metyltransferázou DNMT3a, a že metylace DNA je nutná pro c-Myc způsobenou represi genu CDKN1A. To naznačuje, že c-Myc může utlumit expresi CDKN1A nejen na úrovni transkripce interferencí s Miz-1, ale také epigeneticky aktivním nábořem korepresorových proteinů. Existují další mechanismy, které umožňují c-Myc potlačovat p21: (a) c-Myc spouští signální kaskádu vedoucí k expresi transkripčního faktoru AP4, který se váže na motivy v promotoru p21 a zprostředkovává utlumení transkripce p21 (151). (b) c-Myc antagonizuje indukci p21 zprostředkovanou onkogenním Ras. Upregulace p21 vyvolaná Ras závisí na SP1 a c-Myc interferuje s transaktivací promotoru p21 pomocí SP1 (152). (c) c-Myc interaguje s histonovou demetylázou KDM5B a s transkripčním faktorem TFAP2C (AP2-gamma) a vytváří s nimi ternární komplex, který potlačuje transkripci p21 (153). Z toho vyplývá, že c-Myc snižuje expresi p21 jednak metylací DNA a také ovlivněním demetylace histonu H3. (d) c-Myc indukuje skupinu miRNA miR-17-92, do níž jsou zařazeny miR-17 a miR-20a cílící na mRNA p21 a PTEN (154). (e) c-Myc přímo aktivuje transkripci ZBTB5 (zinc finger and BTB domain-containing 5), ten se váže na p53 a také s komplexem mSin3A/HDAC1, čímž potlačuje transkripci p21 a podporuje proliferaci buněk (155). (f) A konečně při interakci c-Myc s PRMT5 (protein arginin metyltransferázou 5) dochází k transkripčnímu potlačení exprese skupiny genů, včetně

PTEN, CDKN2C (p18^{INK4C}), CDKN1A (p21^{CIP1/WAF1}), CDKN1C (p57^{KIP2}) a p63, což stimuluje růst buněk (156). Ovšem byl popsán i vazebný partner, jenž zabraňuje inhibici promotorové aktivity genů p21 (CDKN1A) a p15 (CDKN2B) přímou interakcí s c-Myc. Jedná se o TSC-22 (Transforming growth factor-beta stimulated clone-22) (157).

Jedním z nejdůležitějších cílů transkripčního faktoru c-Myc v buněčné proliferaci je inhibitor Cdk p27^{KIP1} (dále jen p27) (3). c-Myc urychluje buněčnou proliferaci, přinejmenším částečně díky své schopnosti antagonizovat funkci p27. V souladu s tím vykazují c-Myc deficientní buňky zvýšené množství proteinu p27. Schopnost c-Myc překonat zástavu buněčného cyklu zprostředkovanou p27 byla prokázána nejen *in vitro*, ale také *in vivo* (3). Tento antagonistický účinek c-Myc na p27 je mediován několika mechanismy: (a) c-Myc potlačuje expresi p27 na transkripční úrovni (3). (b) c-Myc indukuje miR-221, miR-222, miR-551b a miR-25, které umlčují p27 mRNA (158). (c) Komplex cyklinu E-Cdk2 je považován za primární cíl p27. c-Myc indukuje cyklin E, čímž se zvyšuje hladina komplexů cyklin E/Cdk2, které funkčně antagonizují p27 tím, že podporují přechod mezi fázemi G₁/S (159). (d) Indukce cyklinů D1 a D2, jakož i jejich katalytických partnerů Cdk4 a Cdk6 působením c-Myc, umožňuje sestavení komplexů cyklinu D/Cdk4/Cdk6, které sekvestrují p27 a zmírňují inhibici komplexů cyklinu E/Cdk2 (160). (e) c-Myc indukuje expresi několika složek ubikvitin ligázového komplexu SCF^{SKP2}, který představuje hlavní komplex ubikvitinující p27. c-Myc indukuje Cullin 1, Cks1 a F-box protein Skp2, tedy podjednotku rozpoznávající p27 fosforylovaný na Thr187 (135). Tato fosforylace je přitom nutná pro degradaci p27 proteazomem. (f) Aktivace Cdk1 a Cdk2. Myc indukuje fosforylaci p27 na Thr-187 prostřednictvím aktivace nejen Cdk2, ale také Cdk1 (135). Přičemž Cdk2 je účinnější při fosforylaci p27 na Thr187 než Cdk1 (135). V nepřítomnosti Cdk2 byla fosforylace p27 na Thr187 prováděna hlavně komplexy cyklinu A2/Cdk1 a cyklinu B1/Cdk1 (135). Vzhledem k tomu, že SCF^{SKP2} je hlavní ubikvitin ligázou pro degradaci p27, lze vyvozovat, že c-Myc je důležitým regulátorem hladiny p27 v buněčných jádrech. c-Myc je všeobecně chápán jako silný antagonist p27. Což odpovídá i zjištění, že exprese p27 je u lidských nádorových onemocnění často snížena a nízké hladiny p27 souvisejí se špatnou prognózou. Významná souvislost byla odhalena mezi konstitutivní expresí c-Myc, ztrátou p27 a inaktivací tumor supresorového genu axin 1 (161). Chemická inhibice Cdk1 a Cdk2 byla dříve identifikována jako synteticky letální s

nadměrnou expresí c-Myc nebo N-Myc. Protože proapoptotický účinek c-Myc za suboptimálních podmínek je dobře znám, lze si představit, že inhibice Cdk1 a Cdk2 by vedla ke zvýšenému p27, a tím k odhalení apoptotických vlastností c-Myc (135). Dále u karcinomů vykazujících nadměrnou expresi c-Myc dochází při inhibici PRMT5 k up-regulaci p27 a v důsledku také k antiproliferačnímu účinku PRMT5 inhibitorů (162). Rovněž byly popsány miRNA, které dokáží indukovat expresi p27. Například miR-124, tak činí přímo vazbou na promotory p27 a c-Myc (163).

3.4 Ovlivnění replikace DNA a stability genomu

c-Myc indukuje geny přímo související s replikací DNA. Komplex rozpoznávající počátek replikace (ORC) je vysoce konzervovaný komplex, sestávající ze šesti podjednotek, nezbytný pro zahájení replikace DNA u eukaryotních organismů. Řada genů ORC, jako např. ORC1, ORC2, ORC4 a ORC5 byla identifikována jako cíle transkripčního faktoru c-Myc (164). Dalším cílem c-Myc je gen kódující protein Cdc6 (Cell Division Cycle 6), který je nezbytný pro iniciaci replikace (164). c-Myc také indukuje geny kódující MCM (minichromosome maintenance) např. MCM3, MCM4, MCM5 a MCM6 (122). MCM2-7, tvoří rodinu šesti příbuzných proteinů potřebných pro zahájení replikace DNA a elongaci. Společně tvoří heterohexamerní komplexy MCM a působí jako helikáza lokalizovaná v replikační vidlici. Jsou klíčovou složkou prereplikačního komplexu. Také gen kódující Cdt1, který je hlavním proteinem pre-replikačního komplexu, je zařazen mezi cílové geny c-Myc (165,166). c-Myc stimuluje replikaci DNA nezávisle na transkripci a interaguje s pre-replikačním komplexem. c-Myc se přímo relokalizuje do míst počátků replikace DNA. Deplece c-Myc zpomaluje replikaci v důsledku nedostatečné iniciace replikace. Naopak zvýšená hladina c-Myc iniciuje předčasný vznik počátků replikace a zvyšuje jejich hustotu, což následně vede k asymetrické progresi replikačních vidlic (167). Tyto informace nám naznačují proč je následkem deregulace c-Myc replikační stres a poškození DNA, což bylo pozorováno již na několika modelech (145). Poškození DNA současně s drahami regulujícími replikaci DNA jsou cílovou slabinou u nádorů řízených c-Myc (145). Je známo, že replikace DNA je přísně kontrolována, aby k ní během buněčného cyklu docházelo pouze jednou. Funkce proteinu Geminin spočívá v tom, že zabraňuje tomu, aby během fází S, G₂ a časných fází M docházelo k replikaci DNA (168). Geminin brání helikázám MCM vytvářet pre-replikační komplexy. Geminin je od anafáze

až do fáze G₁ cíleně degradován komplexem podporujícím anafázi (APC/C), v pozdní S-fázi snižuje expresi tohoto proteinu miR-571. Pozoruhodné je, že c-Myc potlačuje expresi miR-571 přímou vazbou na promotor miR-571. Na začátku S-fáze Cdk2 fosforyluje c-Myc na serinu 62, čímž podporuje jeho navázání na promotorovou oblast miR-571. c-Myc tímto mechanismem ovlivňuje stabilitu a integritu genomu (168). c-Myc také aktivuje helikázy Cdc45-MCM-GINS (CMG) na místech replikačních počátků. A dokonce reguluje i expresi CMG helikáz prostřednictvím svého transkripčního cíle proteinu MINA53 (c-Myc-indukovaný jaderný antigen) (169). c-Myc indukuje dekondenzaci chromatinu v těchto místech a usnadňuje přístup k chromatinu v replikačním počátku. Při dekondenzaci chromatinu pomáhají c-Myc jeho interakční partneři GCN5, Tip60 a TRRAP. c-Myc má tedy podstatnou úlohu při iniciaci replikace DNA. c-Myc společně s ETV5 (ETS varianta transkripčního faktoru 5) a Max také aktivuje transkripci lidské telomerázy (hTERT), což může přispívat k udržení schopnosti neustálé proliferace u nádorových buněk (170–173). Prostřednictvím fyzické vazby na c-Myc TSC-22 rovněž zvyšuje aktivaci promotoru TERT (157). V neposlední řadě je třeba opět zmínit, že nejen Cdk1 a mitotické cykliny, ale i další geny kódující proteiny potřebné pro mitózu jsou regulovány c-Myc.

Komplex podporující anafázi/cyklosom (APC/C) je E3 ubikvitin ligáza sestávající z mnoha podjednotek. APC/C je nezbytná pro správné dokončení mitózy, jelikož řídí destrukci klíčových mitotických regulátorů, jako jsou např. cyklin B1, Geminin a securin (inhibitor separázy, který je nezbytný v průběhu anafáze). c-Myc indukuje prostřednictvím vazby na promotor geny kódující tři podjednotky APC/C: Anapc5, Cdc16 a Cdc23 (174). c-Myc ovlivňuje množství securinu nejen prostřednictvím upregulace podjednotek APC/C, ale také potlačením genu pro securin (PTTG1), což naznačuje jeho významnou roli v mitotické kontrole. Současně bylo popsáno, že existuje zpětnovazebná regulace, během které je exprese c-Myc řízena jednou z izoform securinu (175–178). Na druhé straně bylo také zaznamenáno, že c-Myc potlačuje gen Anapc2 (další složka komplexu APC/C) a Cdc20 (koaktivátor APC/C). c-Myc stimuluje přechod přes kontrolní bod sestavení vřeténka podporou degradace securinu a mitotických cyklinů. Řídí totiž transkripci ubikvitin-konjugujícího enzymu 2C (UBE2C) a Derlinu-1, které jsou nedílnou součástí ubikvitinového proteazomového systému (179–181). Kromě toho c-Myc také přímo aktivuje expresi BubR1, MAD2 a MAD2L1, represorů APC/C, což souvisí s

chromozomální nestabilitou (182,183). c-Myc reprimuje nádorový supresor miR-28, což je druhý způsob vedoucí k indukci hladin proteinů MAD2, MAD2L1 a BAG1 (Bcl2-asociovaný atanogen) (184). Tedy role c-Myc v rámci mitotické progrese je stimulační, včetně jeho podpory replikace DNA, která je zrychlena do té míry, že může nastat poškození DNA a replikační stres.

4 c-Myc jako onkogen řídící buněčnou smrt

Proapoptotické účinky c-Myc jsou značně omezeny u nádorových buněk v porovnání s jim korespondujícími netransformovanými buňkami. Pojdme si společně projít tři důležité koncepty spojující c-Myc s apoptózou. (a) Při rozhodování o buněčné odpovědi na c-Myc je důležitá hlavně hladina exprese a její kinetika (185). (b) Buněčná odpověď na zvýšenou hladinu c-Myc je z velké části podmíněna prostředím, ve kterém se buňka právě nachází. Například buňky se zvýšenou hladinou c-Myc nacházející se v prostředí s přiměřenými koncentracemi růstových faktorů reagují rychlejší proliferací, zatímco tytéž buňky, v podmínkách s omezeným množstvím růstových faktorů podstupují apoptózu (14). Schopnost signálních drah růstových faktorů přepínat při buněčné reakci na c-Myc mezi proliferací a apoptózou v sobě skrývá slibný terapeutický potenciál při cílení na malignity se zvýšenou expresí c-Myc. Toto je částečně způsobeno tím, že u normálních buněk existuje zpětnovazebná smyčka, která při deprivaci růstových faktorů snižuje expresi c-Myc, kdežto u nádorových buněk tato zpětná vazba neexistuje. Tento mechanismus byl zmíněn ve studii McMahon (2014) (14). Aktivace exprese podmíněné alely c-Myc ve fibroblastech zbavených růstových faktorů je dostatečná k vyvolání apoptózy bez ohledu na fázi buněčného cyklu, ve které se fibroblasty právě nacházejí. (c) Posledním klíčovým konceptem je, že normální buňky mají zachovány mechanismy, které jim umožňují vnímat zvýšenou hladinu c-Myc a reagovat na ni apoptózou. Naopak transformované buňky často získávají schopnost odolávat apoptotickým účinkům zvýšené hladiny c-Myc a reagují pouze na jeho proproliferální signály (186).

Domény c-Myc proteinu nezbytné pro zahájení apoptózy se poměrně dobře překrývají s doménami potřebnými pro další známé aktivity c-Myc (např. transformace, vazba na DNA, dimerizace s MAX a transkripční aktivace). Jsme tedy svědky paradoxu, že nejsilnější proproliferální činitel kódovaný v našem genomu patří rovněž mezi

nejsilnější spouštěče buněčné smrti (14,187). Schopnost c-Myc (a některých dalších onkoproteinů, jako jsou E2F a E1A) vyvolat buněčnou smrt je někdy označována jako latentní tumor supresorová aktivita (188). Zvýšená exprese c-Myc společně s jeho zvýšenou aktivitou, je téměř univerzálním znakem lidských nádorových onemocnění. Po provedení mnoha studií bylo dosaženo řady důležitých pokroků v našem chápání toho, jak se buňka rozhoduje, zda bude reagovat na aktivaci c-Myc proliferací, nebo zapojením apoptotických drah. Tyto mechanismy jsou vzájemně propojené a většinou zahrnují některý aspekt proapoptotické dráhy p53, případně dráhy Bcl-2 podporující naopak přežívání a nebo obou drah (14). Následují příklady klíčových pozorování, která spojují c-Myc také s dalšími apoptotickými regulátory.

4.1 Současná aktivace c-Myc a Bcl-2 pohání tumorigenezi a brzdí buněčnou smrt

Pomocí genetických studií onkologických pacientů a experimentálních modelů bylo prokázáno spojení mezi onkoproteiny c-Myc a Bcl-2. V lidských nádorech je c-Myc často nadměrně exprimován v důsledku amplifikace nebo translokace. Většinou jsou tyto změny doprovázeny přestavbami v lokusu Bcl-2. To bylo doloženo např. u B-buněčných lymfomů s translokací IGH: Bcl-2 nebo u fúzí IGH:c-Myc či amplifikací c-Myc (189). Podobně translokace lokusu Bcl-2 u folikulárních lymfomů následovaná přestavbou c-Myc zvyšuje agresivitu onemocnění (190). U řady dalších typů nádorů bylo zaznamenáno současné zvýšení hladin c-Myc a Bcl-2. Z těchto shromážděných poznatků se nejčastěji vyvozuje závěr, že lidské nádory jsou schopny tolerovat apoptotické účinky způsobené zvýšenou aktivitou c-Myc pouze tehdy, pokud současně omezily apoptotickou dráhu nadměrnou expresí Bcl-2, tedy proteinu značně stimulujiho dráhy umožňující přežití buněk. To naskýtá možnost využití látek, které antagonizují Bcl-2, k odhalení skutečných apoptotických účinků nadměrné exprese c-Myc. Tato hypotéza byla základem studie, při níž byly testovány na DHL/THL DLBCL (difuzní velkobuněčný B-lymfom s dvojitým zásahem (DHL)) buněčných liniích inhibitory bromodoménových extra-terminálních proteinů (BETi), které výrazně snižují transkripci c-Myc, inhibitory Bcl-2 a jejich kombinace. Právě kombinace cílící na c-Myc a Bcl-2 současně dosáhla nejlepšího terapeutického účinku, což poukazuje na závislost DLBCL na onkogenním působení c-Myc (191). V případě DHL DLBCL jsou c-Myc a Bcl-2 nadměrně exprimovány jednak kvůli jejich současné translokaci a také vlivem dvou izoform Ca²⁺/kalmodulin-dependentních

protein kináz II δ (CAMKII δ), a γ (CAMKII γ). CAMKII stabilizují protein c-Myc prostřednictvím posttranslační modifikace a zvyšují expresi Bcl-2. Inhibice CAMKII δ a CAMKII γ by mohla být u DHL DLBCL terapeuticky přínosná (192). Jelikož promotory Bcl-2 a c-Myc obsahují G-kvadruplexy, byly na tyto struktury cíleně navrženy a posléze také testovány inhibitory. Jejich vlivem dochází k zástavě buněčného cyklu ve fázi S, poškození DNA a následné apoptóze (193,194). U DLBCL byla v souvislosti s c-Myc rovněž zaznamenána zvýšená oxidativní fosforylace a cílení na komplexy mitochondriálního elektronového transportního řetězce současně s inhibicí Bcl-2 nebo Mcl-1 poskytuje další nadějný přístup při léčbě tohoto agresivního typu lymfomu (195). Je potřeba také zmínit, že rozsáhlé, ale stále korelativní údaje, které naznačují, že nadměrná exprese Bcl-2 je promotorem transformace zprostředkované c-Myc u lidských nádorů, byly ještě více spojeny díky znamenitým zvířecím experimentálním modelům. Například u klasického modelu transgenní myši E μ -myc se letální lymfomy objevují ve věku 6 měsíců (196,197). Zatímco transgenní myši Bcl-2/c-Myc podléhají lymfoblastické leukemii obvykle během několika dnů po narození (198). Naopak po vyřazení alely Bcl-2 u transgenních myší s c-Myc dochází k indukci masivní apoptózy, což dále podporuje teorii, že nadměrná exprese Bcl-2 je nutná k zablokování apoptotického programu také u experimentálních zvířecích modelů s vysokou expresí c-Myc (199).

4.2 *Regulace apoptózy v rukou c-Myc a rodiny BCL*

Translokace genu c-Myc do jednoho z lokusů imunoglobulinových genů je prvotní transformační událostí u Burkittova lymfomu. Avšak alela c-Myc v těchto lymfomových buňkách může získat sekundární missense mutaci v oblasti fosfoakceptorové domény. Tato doména se podílí na řadě podstatných aspektů funkce c-Myc, včetně regulace jeho stability (200). Kromě této role je známo, že přinejmenším jedna z nejčastějších mutací, T58A, má dramatický vliv na schopnost c-Myc indukovat apoptózu. Protein c-Myc s T58A má nejen zvýšený transformační potenciál, ale zároveň sníženou schopnost indukovat apoptózu (201). Studie na zvířecích modelech přinesly další poznatek a to, že nádory indukované alelou T58A c-Myc jsou letálnější, než-li nádory indukované WT c-Myc. Bylo dokázáno, že snížený apoptotický potenciál alely T58A souvisí s poruchou schopnosti c-Myc indukovat expresi Bim, proapoptotického člena rodiny BCL (202). Prozatím zůstává nejasné, jak mutace T58A reguluje expresi Bim. Teoreticky je možné, že se za tím skrývá

omezená degradace T58A c-Myc, jelikož právě fosforylace T58 je určující pro degradaci c-Myc ubikvitin-proteazomovým systémem. Deregulace exprese specifických miRNA mohou narušit hladiny a rovnováhu mezi c-Myc a Bim. Např. miR-34a zvyšuje hladiny proteinů c-Myc a Bim a v důsledku exprese této miRNA byla zaznamenána zvýšená citlivost nádorů k cisplatině (203). c-Myc také řídí expresi miR-19a a miR-19b, které potlačují produkci Bim (204). Vazební partneři c-Myc rovněž ovlivňují regulaci Bim. Bylo pozorováno, že inhibitor proteazomu bortezomib, nejen že zamezuje degradaci proteinů, ale zároveň významně zvyšuje hladinu proteinu c-Myc. c-Myc pak interaguje s transkripčním faktorem EGR1 a vzniklý heterodimer se váže na promotory proapoptotických genů NOXA a Bim. Heterodimer stimuluje jejich transkripci, což vede k buněčné smrti (205). Schopnost proliferace normálních a neoplastických B lymfoidních buněk řízených c-Myc závisí také na transkripčním represoru Mnt. Mnt působí na c-Myc tím, že potlačuje c-Myc řízenou apoptózu primárně snížením hladiny proapoptotického Bim. U Eμ-Myc myšího modelu Burkittova lymfomu, který simuluje translokaci c-Myc/IGH, homozygotní delece Mnt výrazně indukovala apoptózu (206,207). Existují rozličné mechanismy, kterými c-Myc indukuje apoptózu. Některé studie prováděné na myších uvádějí stabilizaci p53 zprostředkovanou p19^{ARF}, což je myší ekvivalent lidského p14^{ARF}, po níž následuje indukce proapoptotických BH3 only proteinů NOXA a PUMA, zatímco jiné tvrdí, že dochází k přímé regulaci BH3 only proteinů, zejména Bim. Tyto rozporuplné teorie byly testovány na *in vitro* a *in vivo* modelech a byla zjištěna nutnost účasti proteinu Bim během apoptózy vyvolané c-Myc (208). Lymfomageneze v přítomnosti deregulovaného c-Myc vyžaduje potlačení proapoptotických účinků tohoto transkripčního faktoru, často prostřednictvím downregulace Bim. To bylo pozorováno v souvislosti s EBV. Transkripční faktory kódované virem Epstein-Barr (EBV) EBNA2, EBNA3A a EBNA3C aktivují c-Myc a umlčují Bim (209). Proliferace indukovaná EBV vyvolává také senescenci buněk zprostředkovanou p16^{INK4A} a p14^{ARF}. EBNA3A a EBNA3C společně potlačují p16^{INK4A} a p14^{ARF}, což umožňuje nepřetržitou buněčnou proliferaci (210). Ve studii Delbridge *et al.*, (2015) porovnali důsledky současné ztráty anti-apoptotického Bclx a pro-apoptotického Bim na c-Myc indukovanou lymfomagenezi (211). Zatímco pouze ztráta obou alel Bclx výrazně předcházela tumorigenezi, ztráta jediné alely Bim tuto blokádu překonala. Naopak ztráta i jediné alely Bim stačila k výraznému urychlení

lymfomageneze a pouze ztráta obou, ale nikoli jediné alely Bclx, mohla toto urychlení zmírnit (211). Což poskytlo důkaz, že mírné monoalelické změny v expresi alespoň některých BH3 only proteinů mohou zásadně ovlivnit tumorigenezi. Aberace, vynucené epigenetickými nebo genetickými změnami, mohou urychlovat tumorigenezi účinněji než zvýšená exprese proproliferativních členů rodiny Bcl-2. Tyto poznatky prohlubují naše znalosti o mechanismech lymfomageneze a případně také o terapii nádorových onemocnění (211).

Dále byla zkoumána souvislost mezi regulací dráhy Bcl-2 a apoptotickými účinky c-Myc, přičemž byl identifikován BAG-1, přímý transkripční cíl c-Myc. BAG-1 je chaperonem Bcl-2 a má tedy pozitivní efekt na přežití buněk (212). Tento efekt má ovšem pouze nejkratší ze tří izoform nazvaná BAG1S (213). Ztráta i jediné kopie genu BAG-1 snižuje u zvířecích nádorových modelů jejich tvorbu, pravděpodobně díky zvýšené apoptóze vznikajících nádorových buněk (214). Indukce BAG-1 pomocí c-Myc je kritickou událostí při tlumení apoptotických účinků, které jinak působí nadměrná exprese c-Myc (215). Modulace rovnováhy mezi proživotním a proapoptotickým účinkem v dráze BCL je důležitým prostředkem, kterým c-Myc řídí své biologické účinky. V rámci této dráhy existuje více uzlů, které by mohly sloužit jako terapeutické cíle pro látky, jejichž způsob účinku zahrnuje aktivaci apoptotického potenciálu c-Myc. Kromě přímého ovlivnění transkripce BAG-1 reguluje c-Myc expresi tohoto chaperonu skrze tumor supresorovou miR-28. c-Myc blokuje syntézu miR-28, čímž navyšuje expresi nejen BAG-1 ale také MAD2 a MAD2L1 (184).

4.3 Aktivita c-Myc určuje jeho apoptotický potenciál

Významný pokrok v našem chápání rozdílu mezi proliferací a apoptózou řízenou c-Myc přinesly studie in vivo, které provedli Murphy et al. (2008) (216). Použili totiž systém, ve kterém lze hladinu c-Myc libovolně měnit. Po mírném zvýšení hladiny c-Myc byla podle očekávání podpořena proliferace. Naproti tomu silná nadměrná exprese c-Myc vedla k dramatickému zvýšení apoptózy. Vzhledem k roli c-Myc jako transkripčního faktoru navrhli Murphy et al. dvě zajímavé alternativy, které by mohly vysvětlit, jak mírné a extrémní hladiny ektopického c-Myc vedou k odlišným biologickým výsledkům. Za prvé, velmi vysoké hladiny c-Myc mohou zapojit novou sadu cílových genů c-Myc, které nejsou

regulovány nižšími hladinami c-Myc. Tyto geny by mohly být přednostně zaměřeny na cíle s proapoptotickými funkcemi. Alternativně může c-Myc zapojit stejný soubor cílových genů bez ohledu na úroveň exprese a mění se pouze rozsah transkripce cílových genů. V tomto případě by mírné zvýšení c-Myc, ačkoli vede ke zvýšené transformaci, mohlo také zapojit apoptotický mechanismus na nízké úrovni. Další studie ukazují, že c-Myc funguje spíše jako obecný zesilovač již existujících transkripčních programů než jako činitel, který přímo diktuje odlišné a cílené transkripční výsledky (217,218). Stojí však za zmínku, že konstitutivní aktivace alespoň určité úrovně apoptózy při mírných i extrémních hladinách c-Myc je v souladu s historickými zjištěními, jak v *in vitro* modelech, tak i ve vzorcích lidských nádorů. Populace buněk často vykazují současně vysoký mitotický index a významný podíl apoptotických buněk (219).

Značná část apoptotického potenciálu c-Myc závisí na následné aktivaci p53 (220). Nádorový supresor p53 je mutován u ~50 % lidských nádorů. p53 je aktivován řadou podnětů a reguluje několik buněčných procesů, včetně apoptotické buněčné smrti, zástavy buněčného cyklu, senescence a opravy DNA. p53 indukuje apoptózu prostřednictvím transkripční indukce proteinů PUMA a NOXA a zástavu buněčného cyklu prostřednictvím p21. Indukce těchto procesů byla navržena jako rozhodující pro potlačení nádorů zprostředkované p53. Tyto cílové geny p53 a procesy, které regulují, však mohou mít na vznik nádorů různý vliv v závislosti na onkogenních původcích. Například ztráta PUMA zvyšuje u myší vývoj lymfomů závislých na c-Myc, ale je zajímavé, že toto urychlení bylo méně razantní ve srovnání s urychlením způsobeným ztrátou, byť jediné alely p53. U myší E μ -Myc, které postrádají p21 i PUMA (E μ -Myc;Puma^(-/-);p21^(-/-)), se lymfom vyvíjí srovnatelně rychle jako u zvířat E μ -Myc;Puma^(-/-). V obou případech s výrazně delší latencí než u myší E μ -Myc;p53^(+/-). Ztráta p21 nemá žádný vliv na počet, přežívání ani průběh buněčným cyklem u pre-leukemických B-lymfoidních buněk E μ -Myc, a to ani při současné ztrátě PUMA. Tyto výsledky ukazují, že i v kontextu deregulované exprese c-Myc musí právě p53 potlačovat rozvoj nádorů aktivací procesů vedoucích k apoptóze (221). Při aktivaci onkogenů je p53 stimulován k zahájení apoptózy cestou, která zahrnuje zvýšenou funkci nádorového supresoru p14^{ARF}/CDKN2A, který následně blokuje inhibitor p53 MDM2 (222). Vzhledem k tomu, že ztráta p53 je u lidských malignit velmi častým jevem, jsou důsledky pro apoptózu řízenou c-Myc široké. Ačkoli bylo provedeno již mnoho

studii, mezi nejelegantnější příklad, který dobře charakterizuje roli p53 v nádorech vyvolaných c-Myc, patří výše zmíněný model transgenní myši Eμ-myc. Na tomto modelu bylo učiněno několik důležitých pozorování, která spojují tumorigenezi se sníženou apoptotickou aktivací p53. Šestiměsíční doba latence nádorů u transgenního myšního modelu Eμ-myc naznačuje, že po nadměrné expresi c-Myc musí dojít k sekundárním genetickým změnám v lokusech tumor supresorových genů (196,197). Je zajímavé, že tato zvířata vykazují v mládí vysokou úroveň apoptózy u B-lymfocytů což naznačuje, že proapoptická odpověď na zvýšený c-Myc je zodpovědná za udržení nádorů pod kontrolou. U velkého procenta nádorů, které nakonec u těchto zvířat vzniknou, tato sekundární genetická změna zřejmě inaktivuje dráhu p53 (50). K této inaktivaci dochází zhruba ve stejném poměru mutacemi buď v samotném p53, nebo v lokusu p14^{ARF}. K inaktivaci této dráhy u některých zvířat přispívá také nadměrná exprese MDM2. Kromě toho cílená delece jedné nebo obou alel buď p53, nebo p14^{ARF} rovněž výrazně urychluje tvorbu nádorů. Podobná zjištění byla již dříve zaznamenána také u buněčných kultur. Tyto a mnohé další příklady jasně ukazují, že přinejmenším v některých situacích se silný apoptotický potenciál c-Myc prosazuje prostřednictvím osy p14^{ARF}/p53. Kromě toho schopnost obejít aktivaci této dráhy prostřednictvím c-Myc pohání časté změny, které vznikají v p53, p14^{ARF}, MDM2 a dalších regulačních proteinech během progresu nádoru.

Ačkoli je represe p53 v nádorových buňkách často spojena se ztrátou ARF, odhalujeme zde alternativní mechanismus, kdy c-Myc inaktivuje p53 prostřednictvím působení c-Myc-inducibilní dlouhé nekódující RNA inaktivující p53 (MILIP). MILIP funguje tak, že podporuje polyubikvitinaci a obrát p53 snížením SUMOylace p53 prostřednictvím potlačení TRIML2. Zvýšená transkripce MILIP je pozorována u různých typů nádorů a ukazuje se, že podporuje nádorovou aktivitu buněk a buněčné dělení (223). Nedávno bylo zjištěno, že c-Myc přímo aktivuje transkripci ZBTB5 (zinc finger and BTB domain-containing 5), což je protoonkogen, který stimuluje buněčnou proliferaci. V přítomnosti p53 ZBTB5 interaguje s p53 a acetylace na K597 ZBTB5 je blokována. ZBTB5 bez acetylace na K597 interaguje s mSin3A/HDAC1, čímž potlačuje transkripci p21/CDKN1A a podporuje proliferaci buněk. V nepřítomnosti p53 je ZBTB5 acetylován na K597 interakcí s p300 a aktivuje transkripci NOXA, která indukuje apoptózu. Rozhodování o osudu buňky za účasti c-Myc závisí tedy také na ZBTB5, p53, p300 (155). Nově byly také objeveny

mechanizmy regulace transkripce c-Myc, které modulují zároveň i dráhu p53. Jedním z nich je například histonová H3K9 demetyláza KDM4C, která se váže na promotor c-Myc a indukuje jeho expresi. KDM4C potlačuje proapoptotické funkce p53 demetylaci p53 K372me1, která je klíčová pro stabilitu chromatinově vázaného p53. Inhibice KDM4C naopak podporuje expresi cílových genů p53 a indukuje apoptózu. KDM4C může sloužit jako onkogen prostřednictvím dvojí funkce inaktivace p53 a aktivace c-Myc. Omezení aktivity KDM4C je slibnou terapeutickou strategií (224). Jako druhý příklad nám může posloužit izoforma metalothioneinu MT1G, jejíž nadměrná exprese potlačuje proliferaci, migraci, invazi a podporuje apoptózu. Zvýšená exprese MT1G snižuje expresi c-Myc, ale současně zvyšuje expresi p53. Vysoká hladina c-Myc potlačuje regulační účinky MT1G na p53. MT1G reguluje signál c-Myc/p53, čímž potlačuje proliferaci, migraci a invazi, ale podporuje apoptózu nádorových buněk, což by mohlo být východiskem pro novou cílenou terapii (225).

c-Myc indukuje expresi nádorového supresoru ARF (p14^{ARF} u člověka a p19^{ARF} u myši), který se váže na MDM2 a inhibuje ho, což vede k aktivaci p53, zatímco p53 potlačuje c-Myc kombinací mechanismů zahrnujících transkripční inaktivaci a represí zprostředkovanou miRNA. Nicméně regulační interakce mezi c-Myc a p53 nejsou v nádorových buňkách zachovány, jak je patrné z často nevyvážené exprese c-Myc oproti WT p53. p14^{ARF} plní různé funkce v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti p53. Pokud je p53 reprimována tvoří ARF heterodimer s proteinem p68 DEAD-box (DDX5). DDX5 je interakčním partnerem c-Myc a ovlivňuje jeho schopnost regulace transkripce. Regulace exprese c-Myc a DDX5 jsou spolu spjaty, což naznačuje existenci protumorigenní zpětnovazebné smyčky. Při přítomnosti ARF dochází jeho vlivem k blokaci vazby mezi DDX5 a c-Myc, čímž ARF přímo vytlačuje DDX5 z promotoru cílových genů c-Myc. Tato fakta nám umožňují pochopit jak ARF plní svou antionkogenní funkci při nepřítomnosti p53 (226).

Studie *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že dráhy p19^{ARF}-MDM2-p53 a ribozomální protein RP-MDM2-p53 jsou zásadní při prevenci c-Myc indukovaného vzniku nádorů. Narušení každé z těchto drah, zvláště delecí p19^{ARF} nebo mutací MDM2(C305F), která narušuje vazbu RP-MDM2, urychluje u myší s transgenním E μ -myc transgenem vznik pre-B-

buněčného lymfomu zdánlivě podobným tempem s mediánem přežití kolem 10, resp. 11 týdnů ve srovnání s 20 týdny u transgenních myší s E μ -myc transgenem. Protože p19^{ARF} může inhibovat biogenezi ribozomů prostřednictvím interakce s nukleofosminem, RNA helikázou DDX5 a faktorem ukončení transkripce RNA polymerázy I (TTF-I), spekulovalo se, že dráhy p19^{ARF}-MDM2-p53 a RP-MDM2-p53 mohou být jedinou dráhou p19^{ARF}-RP-MDM2-p53, v níž p19^{ARF} aktivuje p53 inhibicí biosyntézy RP; proto by delece p19^{ARF} nebo mutace MDM2(C305F) vedly k podobným důsledkům. Experimenty na myších bylo zjištěno, že v nepřítomnosti transgenů E μ -myc nevyvolala mutace MDM2(C305F) u myší spontánní nádory, ani neurychlila spontánní nádory u myší s delecí p19^{ARF}. V přítomnosti transgenů E μ -myc však mutace MDM2(C305F) významně urychlila lymfomogenezi vyvolanou delecí p19^{ARF} a podpořila rychlé metastazování. Z uvedeného vyplývá, že pokud jsou nezávisle na sobě přerušeny dráhy p19^{ARF}-MDM2-p53 a RP-MDM2-p53, je onkogenním c-Myc indukovaná stabilizace a aktivace p53 pouze částečně oslabena. Pokud jsou však obě dráhy narušeny současně, stabilizace a aktivace p53 vyvolaná c-Myc je v podstatě eliminována. Dráhy p19^{ARF}-MDM2-p53 a RP-MDM2-p53 jsou tedy neredundantní dráhy, které mají podobnou schopnost aktivovat p53 při nadměrné expresi c-Myc (227).

U mnohočetného myelomu (MM) je často v souvislosti s rezistencí k léčbě zaznamenána zvýšená exprese onkogenu MDM2. Nedávno bylo experimentálně zjištěno, že specifická inhibice MDM2 vedla k pozoruhodnému potlačení růstu relabovaných MM buněk, apoptóze, omezení vzniku kolonií a migrace signálními drahami závislými i nezávislými na p53. MDM2 totiž recipročně řídí aktivitu dalšího onkogenu c-Myc u MM. MDM2 se váže na ARE v 3'UTR oblasti c-Myc mRNA a zvyšuje její stabilitu a translaci. O MDM2 je známo, že je jedním z přímých transkripčních cílů c-Myc. Inhibice MDM2 způsobila destabilizaci mRNA c-Myc a snížila expresi proteinu c-Myc. Naskýtá se tedy další varianta terapeutického zacílení na MM prostřednictvím dráhy MDM2/c-Myc (228). Oproti tomu bylo zjištěno, že c-Myc destabilizuje a směřuje p53 k degradaci pomocí zcela nově popsané dráhy. Aktivní c-Myc se váže na promotor WDR43 (tryptophan-aspartate repeat domain 43) a stimuluje produkci tohoto proteinu, který následně vytěsňuje z komplexů RPL11/MDM2 protein RPL11. Vznikají tak heterodimery WDR43/RPL11 a

MDM2/p53, což vede k eliminaci p53 a stimulaci proliferace. V souvislosti s touto drahou byla popsána také zvýšená rezistence k oxaliplatině (12).

c-Myc řídí apoptózu způsobem závislým, ale také nezávislým na p53. Tato apoptóza nezávislá na p53 je obzvláště zajímavá, protože poskytuje základ pro teorii, že reaktivace latentního apoptotického potenciálu c-Myc by mohla být vhodnou léčebnou strategií i u velké části lidských malignit, u nichž již došlo ke ztrátě funkce p53. Mezi velmi dobře prostudované mechanismy indukce apoptózy nezávislé na p53 prostřednictvím c-Myc patří systém myší myeloidní leukémie. V kultuře tyto buňky vykazují rychlou proliferaci, avšak mohou být po ovlivnění IL-6 indukovány k terminální diferenciaci. Tato diferenciace je doprovázena snížením exprese endogenního c-Myc. Ektopická exprese c-Myc pak dokonce blokuje indukci diferenciaci pomocí IL-6 (229). Nakonec tyto buňky podléhají apoptóze způsobem, který nevyžaduje p53. Indukce apoptózy nezávislá na p53 pomocí c-Myc není omezena na buňky myeloidní linie, protože podobné výsledky byly zaznamenány u epiteliálních buněk ledvin, B lymfocytů a fibroblastů izolovaných z myšího embrya (47,230–232). Schopnost normálních buněk vycítit onkogenní hladiny c-Myc a eliminovat se z organismu, aby nezpůsobily potenciálně smrtelný nádor, se odráží v autonomním jevu. Při tomto jevu, označovaném jako mezibuněčná konkurence, buňky exprimující zvýšenou hladinu c-Myc přerůstají buňky exprimující nízkou hladinu c-Myc dvěma paralelními mechanismy. Za prvé, zvýšené hladiny c-Myc vedou podle očekávání k rychlejší proliferaci. Za druhé, což je překvapivé, buňky s vysokou hladinou c-Myc poskytují vnější signál, který způsobuje apoptotickou smrt jejich sousedů s nízkou hladinou c-Myc. c-Myc regulovaná mezibuněčná konkurence byla popsána u hmyzu a savců a její biochemické spouštěče jsou stále studovány.

5 Vliv transkripčního faktoru c-Myc na biogenezi ribozomů

5.1 Biogeneze ribozomů

Biogeneze ribozomů je vysoce dynamický proces, při kterém dochází ke kombinaci transkripce ribozomální RNA (rRNA), zpracování/modifikace rRNA, připojení ribozomálních proteinů (RP) k pre-rRNA, správnému skládání pre-rRNA a transportu zrajících ribozomálních podjednotek do cytoplazmy (233,234). Kromě RP, které představují strukturální složku ribozomu, je pro biogenezi ribozomů zapotřebí více než 200

dalších neribozomálních proteinů a 75 snoRNA (malé RNA vyskytující se v jadérku). Konečným produktem je funkční ribozom, který se u eukaryot skládá z podjednotek 40S a 60S, které obsahují 4 druhy ribozomálních RNA (18S, 28S, 5.8S a 5S) a 79 ribozomálních proteinů (RP). Kompletní podjednotka 40S se skládá z 18S rRNA a 33 RP, zatímco podjednotka 60S se skládá z 28S, 5.8S a 5S rRNA a 43 RP (235,236). Biogeneze ribozomů začíná v okolí nukleolárních organizačních oblastí, které obsahují několik set kopií genů ribozomální DNA (rDNA). U člověka jsou tyto geny uspořádány jako palindromy na chromozomech 13, 14, 15, 21 a 22 a kódují transkripty pre-rRNA 47S, které budou později zpracovány na rRNA 28S, 18S a 5.8S. Kromě toho se na části lidského chromozomu 1 nachází několik set kopií genu 5S rDNA. Proces začíná asociací vazebného faktoru (upstream binding factor, UBF) a selektivního faktoru (selective factor) SL -1 s promotorem 47S rDNA. Tím se k promotoru rekrutuje iniciační faktor TIF-IA specifický pro RNA polymerázu I (237,238). Tvorbě komplexu RNA pol I napomáhá asociace heterodimeru MYC:MAX s E-boxy a vazba dalších regulačních faktorů, které rekrutují komplex histonacetyltransferázy (HAT). Ta může být inhibována asociací p53 nebo komplexu pRB/p130 s klíčovými proteiny iniciačního komplexu RNA pol I. Současně se TF-IIIA, TF-IIIB, TF-IIIC a RNA pol III váží na promotor 5S rDNA. rRNA 18S, 5.8S a 28S jsou přepisovány RNA pol I jako jediné prekurzorové RNA z tandemových repetitivních genů přímo v jadérech, zatímco 5S rRNA, která je přepisována RNA pol III z více genů, migruje do jadérek z nukleoplazmy (239,240). RNA pol III je také zodpovědná za přepis genů tRNA, které jsou později potřebné pro iniciaci a elongaci translace. Naproti tomu ribozomální proteiny, které jsou přítomny napříč celým genomem (nachází se na 20 z 23 chromozomů, počítáme-li i pohlavní chromozomy), jsou přepisovány RNA pol II v komplexu s MYC:MAX a HAT na jejich promotorech. mRNA kódující RP jsou zpracovány a transportovány do cytoplazmy k translaci. Při sestřihu těchto transkriptů vznikají také scaRNA a snoRNA, které jsou později potřebné pro tvorbu rozmanitých heterogenních ribonukleoproteinových (hnRNP) komplexů, C/D snoRNP a H/ACA snoRNP, které plní své funkce při sestřihu mRNA, modifikaci a maturaci rRNA. Alternativním sestřihováním transkriptů RP z pseudogenů RP vznikají také "pseudo RNA RP", které regulují expresi a kumulaci RP (241,242). Nově translatované RP jsou pak aktivně importovány z cytoplazmy do jádra a nukleoplazmy, kde jsou začleněny do

sestavujícího se ribozomu. Tento proces vyžaduje přítomnost různých chaperonových proteinů, které plní několik funkcí: (1) chrání RP před degradací, (2) usnadňují jejich aktivní jaderný import a (3) usnadňují správné začlenění RP do vznikajících podjednotek ribozomu. Počáteční 47S pre-rRNA transkript udržuje na nově syntetizovaném 5' konci sekundární strukturu, která slouží jako základ pro vazbu a asociaci počáteční sady RP tvořících 90S RNP (117). Protože 5' část pre-rRNA obsahuje to, co se stane 18S rRNA podjednotkou 40S, RP asociující s 5' koncem jsou RP malé podjednotky neboli RPS. Dva z prvních RP, které se přidružují k pre-rRNA na 5' konci, jsou RPS7 a RPS24, které jsou nezbytné k zahájení zpracování a štěpení pre-rRNA na 5'-externím transkribovaném spaceru (ETS) (42). Počáteční vazba RPS a zpracování na 5'-ETS, stejně jako modifikace rRNA energeticky upřednostňují strukturu rRNA, která tvoří podklad pro připojení dalších RP. Ve stejné době, kdy probíhá zpracování 5'-konce 18S rRNA, usnadňuje asociace RPS17 a RPS19 zpracování a štěpení na 3'-konci 18S rRNA v rámci vnitřní transkribované sekvence (ITS1), čímž se uvolňuje sestavující se podjednotka 40S z podjednotky 60S. Nízké hladiny RPS7 nebo RPS24 blokují nebo zpomalují zpracování rRNA, což vede k neúspěšnému dozrávání 5'-konce 18S rRNA. Podobně deplece RPS17 nebo RPS19 vede k neúspěšnému zpracování 3'-konce 18S rRNA (243,244). Prakticky stejný proces probíhá při tvorbě maturujících 5.8S a 28S s ITS2 (mezi sekvencemi 5.8S a 28S). V tomto okamžiku jsou asociující RPL, protože se stanou součástí podjednotky 60S. Proces, vyznačující se koly zpracování a skládání rRNA a koly asociace RP, pokračuje, dokud nejsou poslední RP pro každou podjednotku nakonec začleněny (245). Vzhledem ke schopnosti RNA zaujímat v rovnovážném stavu různé energetické struktury mohou současně probíhat různé způsoby sestavování RNP. Víceru pramenů naznačuje, že hlavním účelem RP je stabilizovat skládání a strukturu rRNA, a tím napomáhat jejímu zpracování; (i) RP jsou proteiny vázající RNA, které jsou závislé na struktuře a konformaci RNA, (ii) mezi RP existuje jen velmi málo protein-proteinových interakcí, (iii) zatímco mnoho RP má koncovou část, která se vkládá do jádra ribozomu, jádro je z proteinového hlediska většinou duté, s výjimkou rRNA; a koncové části RP zřejmě neinteragují se substrátem mRNA, který později obsadí jádro (246,247). Kromě RP začleněných do ribozomu a proteinů modifikujících rRNA se s dozrávajícím ribozomem v jádře spojuje řada proteinů, které zajišťují, aby se ribozom nesestavil předčasně, včetně proteinu

spojeného se Shwachmanovým-Diamondovým syndromem, SBDS, a eukaryotického iniciačního faktoru 6 (eIF6). Po exportu do cytoplazmy se tyto chaperony disociují od ribozomálních podjednotek, což umožňuje sestavení ribozomální podjednotky, spojení s mRNA a navázání iniciačních faktorů translace (IF) za vzniku PIC (248). Závěrečné kroky zahrnující komplexy eIF2, eIF4 a eIF5 vedou ke vzniku zralých ribozomů a zahájení syntézy proteinů. Změny v kterémkoli kroku tohoto procesu mohou mít mírné až závažné následky v závislosti na defektu a jeho penetranci. Často jsou nejvíce postiženy tkáně, které mají největší míru proliferace, metabolismu a regenerace, jako je kůže a prekursorů krvetvorby, zejména erytroidní linie (238,249). Mnoho RP má také další regulační funkce. Zpracování podjednotky 60S vyžaduje začlenění 5S rRNA, která se zpočátku spojuje s RPL5 a RPL11 za vzniku 5S RNP. Za podmínek haploinsuficience RP nebo poruch biogeneze ribozomů v důsledku změněné signalizace nebo stresu je proces zrání pre-rRNA zastaven, což má za následek rostoucí skupinu volných RP. Hromadění volných RP, konkrétně 5S RNP, vede k inhibici syntézy proteinů a zástavě buněčného cyklu prostřednictvím aktivace p53 (250–252). Jiné mechanismy, než zvýšená exprese p53 mohou vysvětlovat pozorovaný proapoptotický a špatný proliferační stav po ztrátě nebo snížené expresi RP. Bylo prokázáno, že ztráta RPL5 nebo RPL11 vede ke snížené expresi cyklinů, a tím i ke snížené proliferaci. Kromě toho je známo, že buňky s nedostatkem RPS19 a RPL11 jsou náchylné k oxidačnímu stresu (253).

5.2 *c-Myc je globální regulátor biogeneze ribozomů*

c-Myc je jedním z mála transkripčních faktorů, o nichž je známo, že regulují všechny tři RNA polymerázy (Pol I, Pol II a Pol III), a má tedy schopnost indukovat expresi všech potřebných rRNA, ribozomálních proteinů a kofaktorů nezbytných pro biogenezi ribozomů (42,43). V případě rDNA vede *c-Myc* také k náboru kofaktorů RNA pol I UBF a SL-1 na promotor, čímž stimuluje transkripci pre-rRNA 47S (41). Naproti tomu *c-Myc* ovlivňuje transkripci 5S rRNA a tRNA různým způsobem. Spíše, než aby tvořil heterodimer s MAX, *c-Myc* se spojuje přímo s TF-IIIB v nukleoplasmě a stimuluje transkripci těchto RNA zprostředkovanou RNA pol III (235). Kromě přímé asociace s promotory rDNA je také známo, že *c-Myc* ovlivňuje expresi transkripčního kofaktoru RNA pol I UBF. Je také známo, že *c-Myc* indukuje expresi ribozomálních proteinů způsobem závislým na RNA pol II. Zajímavé je, že několik z těchto cílů RPL5 a RPL11 bylo shledáno

jako mimořádně důležitých při vzniku ribozomálního stresu. Bylo prokázáno, že RPL11 nejenže indukuje transaktivaci p53, ale také váže c-Myc v rámci domény MYC box II a inhibuje jeho asociaci s TRRAP, čímž snižuje acetylaci histonů a transkripci závislou na c-Myc. Dráha c-Myc – RPL11 tedy funguje v režimu negativní zpětné vazby (254). Kromě toho c-Myc také indukuje řadu proteinů, které se podílejí buď na zpracování a transportu rRNA, nebo na iniciaci translace. c-Myc řídí expresi nukleolinu (NCL) a nukleofosminu (NPM), dvou proteinů, které se podílejí na mnoha procesech v jádře, včetně zpracování 47S rRNA na 18S, 5.8S a 28S rRNA; a také expresi nukleolárního proteinu 56 (NOP56), základní složky C/D box snoRNP komplexu, bloku proliferace 1 (BOP1), součásti PeBoW komplexu nutného pro zrání 28S a 5.8S rRNA, a dyskerinu (DKC), podjednotky H/ACA snoRNP komplexu odpovědné za pseudouridylaci některých rRNA (233). Kromě toho má NPM další role v cytoplazmaticko-jaderném importu nově syntetizovaných ribozomálních proteinů a jaderně-cytoplazmatickém exportu sestavujících se ribozomálních podjednotek (117,237).

5.3 Ribozomopatie

Některé patologické stavy mají etiologický základ ve změněné biogenezi ribozomů a jsou důsledkem získaných i dědičných mutací. Je zajímavé, že zatímco dědičné zárodečné změny jsou přítomny v každé buňce organismu, související patologie se týkají výhradně tkání a buněk, které mají vysoké nároky na syntézu proteinů nebo proliferaci/regeneraci buněk. Téměř všechny tyto patologie mají hematologický základ a u pacientů s ribozomopatiemi se téměř vždy vyskytují abnormality krvetvorby v důsledku selhání kostní dřeně (255). Erytroidní progenitory jsou obzvláště citlivé vzhledem k vysokým nárokům na syntézu globinu a rychlému buněčnému metabolismu. Není tedy divu, že řada ribozomopatií je označována také jako poruchy selhání kostní dřeně (BMFD, bone marrow failure disease). Pacienti s ribozomopatiemi mají často klinické příznaky chronické, nadměrně aktivní vrozené imunitní, popř. zánětlivé odpovědi se zvýšenými hladinami zánětlivých mediátorů, jako jsou TNF, IL-1 a IFN, které potlačují růst progenitorů a stimulují apoptózu v kostní dřeni a dalších hypersenzitivních tkáních. Je zajímavé, že zatímco ribozomopatie zřejmě působí na postižené tkáně proapoptoticky, jedinci, kteří trpí těmito patologiemi, mají zvýšenou incidenci vzniku nádorů (256). Jedna z hypotéz souvisí se spojením mezi chronickým zánětem a onkologickými onemocněními. Ribozomopatie

mohou představovat klasický případ chronického zánětlivého stavu postihujícího tkáň se zvýšenou potřebou syntézy proteinů a buněčného metabolismu. Dlouhodobý ribozomální stres, stejně jako chronický zánět, může vytvářet selektivní tlak na buňky. Progenitorové buňky, které jsou schopny tomuto selekčnímu tlaku uniknout a proliferovat, jsou buňky, které v průběhu času získaly náhodné mutace podmiňující vlastnosti nádorových kmenových buněk (257).

Pokud se zaměříme na získané ribozomopatie, v současnosti vyniká pouze jedna patologie, 5q-myelodysplastický syndrom (MDS; 5q-syndrom). Myelodysplastické syndromy jsou heterogenní skupinou hematologických malignit, které vedou k cytopenii v jedné nebo více hematologických liniích s cytogenetickými abnormalitami nebo bez nich. MDS *de novo* se typicky vyskytuje v pozdějším věku (> 60 let), a proto je považován za onemocnění související s věkem (257). Naproti tomu MDS může vzniknout také v důsledku progresu jiných hematologických malignit, včetně jiných BMFD. Navíc je známo, že MDS související s terapií (tMDS) se vyskytuje u jedinců, kteří byli dříve léčeni chemoterapeutiky pro různé typy nádorových onemocnění (258). MDS se dělí na nízké, střední-1, střední-2 a vysoké podle rizika progresu onemocnění do akutní leukemie. U onemocnění s nízkým rizikem mají hematologické kmenové buňky a progenitory sklon k apoptóze a v periferní krvi je pozorováno málo blastů. To se postupně nahrazuje během progresu onemocnění z nízkého na vysoké riziko, kdy dochází k hypercelularitě kostní dřeně a výskytu blastů v periférii (259). Různé skupiny prokázaly roli stresové, popř. zánětlivé signalizace během progresu MDS do AML (akutní myeloidní leukemie). V poslední době byly pozorovány významné změny v metylaci DNA, modifikaci chromatinu, transkripční regulaci, opravě DNA, přenosu signálu, soudržnosti sesterských chromatid a sestřihu RNA a v genech souvisejících s biogenezí ribozomů(260). Některé mutace jsou specifické pro určité podtypy myelodysplazie. V případě syndromu 5q- jako příčina vede delece dlouhého raménka chromozomu 5, který kóduje RPS14 (261). Ztráta RPS14 má za následek defektní biogenezi a translaci ribozomů, stimulaci transkripční aktivity p53, zástavu buněčného cyklu a zvýšenou apoptózu zejména u erytroidních progenitorů, což vede k anémii. Syndrom 5q- je dosud jediným myelodysplastickým onemocněním, které bylo označeno jako ribozomopatie (262). To neznamená, že by jiné typy MDS nebo jiné získané BMFD nemohly být ve skutečnosti ribozomopatiemi, ale v současné době

neexistují údaje, které by jednoznačně naznačovaly, že tyto jiné získané BMFD jsou důsledkem změněné ribozomové složky (263).

Bylo zjištěno, že řada nádorových onemocnění, která nejsou v současné době klasifikována jako ribozomopatie, obsahuje mutace v ribozomálních proteinech, které mají za následek defektní nebo změněnou syntézu ribozomů; patří mezi ně gliom, kolorektální karcinom, chronická lymfocytární leukémie (CLL) a T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie (T-ALL) (264). V případě T-ALL byly identifikovány mutace v RPL5, RPL10 a RPL11, přičemž mutace v RPL5 nebo RPL10 byly nalezeny přibližně u 10 % dětských pacientů s T-ALL (265). Jednou z původních řídicích mutací pozorovaných u T-ALL byla mutace receptoru NOTCH1. Aktivující mutace NOTCH1 jsou přítomny u více než 50 % případů T-ALL. Průkopnická práce Palomera *et al.* identifikovala ztrátu funkce PTEN a následnou aktivaci dráhy PI3K-AKT-mTOR jako kritickou pro mutantní NOTCH1 (266). Bylo prokázáno, že k potlačení funkce PTEN dochází genetickými i negenetickými mechanismy. U 11-27 % dětských pacientů s T-ALL se vyskytují delece, inserce nebo bodové mutace v genu PTEN, které jsou příčinou snížené aktivity (264,267). Snížená aktivita PTEN byla také spojena s alternativním sestřihováním mRNA PTEN, fosforylací PTEN kaseinkinázou 2 (CK2) a cíleným štěpením transkriptu pomocí miRNA. Kromě toho aberantní aktivita NOTCH1 vede k aktivaci cílového transkripčního faktoru downstream HES1, který potlačuje expresi PTEN. Aberantní signalizace NOTCH1 a suprese PTEN jsou tedy kritické pro klonalitu a udržování T-ALL. Nevyjasněnou otázkou však zůstává, zda tyto změny podporují mutace ve sledovaných ribozomálních proteinech, nebo zda mutace ve sledovaných ribozomálních proteinech podporují změny NOTCH1 a PTEN. Obojí by se dalo zdůvodnit. U většiny ribozomopatií je zřejmé, že defektní biogeneze ribozomů představuje selekční tlak na buňku, který časem vede k vývoji populace buněk, jež získaly potenciál tuto překážku překonat, což těmto buňkám poskytuje selekční výhodu. Podporujícím argumentem by mohly být dvě nedávné publikace. Je známo, že chronický zánět hraje roli v různých metabolických patologiích. Villegas *et al.* zjistili, že prozánětlivé enzymy, syntáza oxidu dusnatého (NOS) a lipoxygenáza (LOX), stimulují onkogenezi NOTCH-PI3K/AKT a že inhibice těchto prozánětlivých enzymů je schopna potlačit signalizaci NOTCH-PI3K/AKT, což vede k zániku leukemických buněk (268). Tyto údaje spojují signalizaci NOTCH-PI3K/AKT přímo se zánětem. Je zajímavé, že zatímco

onkogenní transformace může vyvolat zánět, jedním z definitivních vedlejších účinků změněné biogeneze ribozomů pozorovaných u ribozomopatií je prozánětlivý fenotyp. Ještě zajímavější bylo zjištění Grzese *et al.*, že primární buňky T-ALL mají zvýšenou schopnost vychytávání a transportu leucinu (269). Jak již bylo uvedeno, vychytávání leucinu může stimulovat aktivitu mTORC1 v lysozomu a léčba pacientů s některými dědičnými ribozomopatiemi L-leucinem dokáže zmírnit proapoptotický fenotyp a výslednou anémii. Zajímavé je, že samotná delece PTEN nemůže vést k vychytávání L-leucinu; je nutná signalizace NOTCH1. Lze tedy tvrdit, že změny v biogenezi ribozomů mohou podporovat mutace NOTCH1. Tento scénář by mohly podpořit i údaje Sulima *et al* (270). Jejich údaje prokázaly, že nejčastější mutace RPL10 pozorovaná u dětských T-ALL, Arg98Ser, může vyvolat deficit ribozomů, který vede k hypoproliferativnímu stavu. Postupem času tyto deficientní buňky získají schopnost produkovat defektní ribozomy a normálně se množit. Zatímco tyto buňky mohou dlouhodobě normálně proliferovat, produkují defektní ribozomy, které mají za následek nestabilitu genomu i transkriptů mRNA, což jsou změny často pozorované u pokročilých nádorových onemocnění, včetně T-ALL (270).

Dědičné ribozomopatie. Mezi dědičné ribozomopatie patří např: Diamond-Blackfanova anémie (DBA), Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS), vrozená dyskeratóza (DC) a Treacherův-Collinsův syndrom (TCS). Všechny zahrnují přítomnost dědičné mutace v jednom konkrétním genu (SDS, TCS) nebo v jednom členu souboru genů zapojených do společného buněčného procesu (DBA, DC), který je v konečném důsledku zodpovědný za pozorovaný fenotyp onemocnění. U ribozomopatií, kde mutace ve více než jednom genu může způsobit stejné onemocnění, se vzor dědičnosti a penetrance fenotypu onemocnění mohou značně lišit. Zapojení jednotlivých tkání také závisí na tom, v jakém bodě je biogeneze a funkce ribozomů ovlivněna (271).

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácná vrozená porucha selhání kostní dřeně, která je často zaznamenána během prvního roku nebo dvou po narození. DBA je charakterizována anémií, přičemž až u 50 % pacientů je pozorována růstová retardace, lebeční a obličejové abnormality, vady srdce a vylučovací soustavy (272). Postižení jedinci mají zvýšenou incidenci vzniku MDS a AML, jakož i některých dalších forem

nádorů (273). DBA je důsledkem změněného zpracování ribozomální RNA (rRNA), které následně ovlivňuje biogenezi ribozomů, ribozomálních podjednotek a mění zpracování, transport a translaci mRNA (244). Má tak pleiotropní vliv na buněčný růst a přežití. DBA byla dosud spojena s různými mutacemi v následujících ribozomálních proteinech: RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS29, RPL5, RPL11, RPL26, RPL27, RPL35A a delece RPL15 (274,275). Další nové mutace byly zaznamenány u RPL3L, RPL6, RPL7L1T, RPL8, RPL13, RPL14, RPL18A a RPL31. Přibližně 50 % pacientů s DBA má mutace v RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS29, RPL5, RPL11, RPL26, RPL35A nebo GATA. Z toho jen mutace v RPS19 představují ~25 % těchto pacientů (276). U zbývajících 50 % případů nebyla dosud identifikována příčinná mutace, ale téměř jistě se jedná o mutace související se zpracováním pre-rRNA a sestavováním ribozomů. Existují určité důkazy, že změněná biogeneze ribozomů může vyvolat zánětlivé projevy. U pacientů s deficitem RPS19 bylo zjištěno, že v populaci erytroidních progenitorů je snížená hladina GATA1, zatímco v neerytroidních progenitorech je zvýšená exprese p53 a TNF (277). Inhibice TNF u modelu *Danio rerio* s deficitem RPS19^{+/-} dokázala zabránit pozorované anémii, což naznačuje, že exprese TNF hraje významnou roli v pozorovaném fenotypu (244). Podobně byla zaznamenána stimulace translace proteinů pomocí přídatku leucinu, která zvrátila pozorovanou anémii (278).

Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS) je autozomálně recesivní porucha, která se zpočátku projevuje jako exokrinní dysfunkce pankreatu, ale následně vede k selhání kostní dřeně a abnormalitám skeletu. Přibližně u 20 % pacientů s SDS dojde k progresi do MDS, zatímco u dalších 25 % se vyvine AML (279). Téměř ve všech případech (~90 %) jsou pacienti nositeli mutace v genu pro Shwachmanův-Blackfanův-Diamondův syndrom (SBDS). Gen kódující SBDS se nachází na chromozomu 7q11 a bezprostředně sousedí se svým pseudogenem SBDSP, který je z 97 % identický se SBDS, ale obsahuje delece a nukleotidové změny, které brání expresi funkčního proteinu. Je zajímavé, že právě rekombinace s tímto pseudogenem vede u 75 % pacientů k mutacím SBDS. Gen SBDS kóduje protein o 250 aminokyselinách (29 kDa), který neobsahuje žádné známé strukturní domény (280). SBDS je exprimován všudypřítomně ve tkáních a je lokalizován v celé buňce se zvláštní preferencí pro jádro, kde dochází k biogenezi ribozomů. Myší

SBDS^{-/-} deficientní modely a skutečnost, že běžná zkrácená varianta vlivem mutace na nukleotidové pozici 183 (TA > CT) je pozorována pouze u jedinců heterozygotních pro tento defekt, naznačují, že kompletní ztráta SBDS je embryonálně letální (281). Stejně jako u většiny poruch selhání kostní dřeně je počet CD34+ krvetvorných buněk v kostní dřeni snížen a tyto buňky vykazují ve srovnání s normálními CD34+ krvetvornými buňkami sníženou proliferační a koloniformní kapacitu. Kromě toho je v kostní dřeni pacientů se SDS pozorována zvýšená exprese p53 a zvýšená apoptóza. SBDS se spojuje s Nip7, faktorem sestavení ribozomální podjednotky 60S a eIF6 spojeným také s 60S. U sestavující se ribozomální podjednotky 60S slouží eIF6 ke správnému dozrání podjednotky a k inhibici předčasného sestavení podjednotek 40S a 60S za vzniku ribozomu 80S (282). Údaje naznačují, že SBDS slouží k disociaci eIF6 z podjednotky 60S, jakmile se dostane do cytoplazmy. K tomu dochází na SBDS závislým nábojem cytoplazmatické GTPázy EFL1 do komplexu eIF6-60S podjednotky. EFL1 podporuje disociaci eIF6 z podjednotky 60S, což umožňuje sestavení 80S. Během biogeneze ribozomů tedy snížená exprese SBDS brání disociaci eIF6. Kromě ribozomální podjednotky 60S byl SBDS nalezen také ve spojení s 28S rRNA a NPM1, takže v závislosti na mutaci v tomto genu se může pozorovaný fenotyp značně lišit. Bylo také prokázáno, že SBDS se během mitózy asociuje s mikrotubuly. Pacienti se SBS často vykazují zvýšený výskyt mitotických abnormalit s multipolárními vřeténky a centrozomálními amplifikacemi, ale obecně panuje shoda, že mutace v SBDS způsobující onemocnění vedou ke změněné biogenezi ribozomu 60S a zvýšené citlivosti na stres (283).

Dyskeratosis congenita (DC) je velmi vzácná multisystémová progresivní porucha selhání kostní dřeně, která může vykazovat buď autozomálně dominantní, autozomálně recesivní nebo X-vázaný vzorec dědičnosti na základě příčinné mutace. Její penetrance může být velmi různá (284). Dyskeratóza se projevuje triádou příznaků, které zahrnují retikulární hyperpigmentaci kůže, dystrofii nehtů a slizniční leukoplakii, a vede k předčasné smrti v důsledku selhání kostní dřeně, respirační dysfunkce nebo malignity. Zatímco dyskeratin (DKC1), který kóduje protein zapojený jak do malého nukleolárního ribonukleoproteinu (H/ACA snoRNP), tak do telomerových komplexů, a jehož mutace je zodpovědná za X-vázanou formu DC, je zdaleka nejlépe prozkoumaný; další proteiny

zapojené do komplexu H/ACA snoRNP (NOP10 a NHP2), již tak podrobně popsány nejsou. Shelterin telomerázového ribonukleoproteinového komplexu (TINF2); TERT, telomerázová reverzní transkriptáza; TERC, který kóduje RNA složku TERT a jehož mutace je zodpovědná za autozomálně dominantní formu DC; WRAP53, který váže TERC k telomeráze a také asociuje RNA ke Cajalovým tělískům (scaRNA) a posttranskripčně reguluje hladinu mRNA p53; RTEL1, který se podílí na prodlužování telomer; a CTC1, podjednotka komplexu CTC, která ukončuje aktivitu TERT a rekrutuje DNA polymerázu pro syntézu komplementárního vlákna - všechny tyto proteiny se podílejí na udržování telomer, přičemž některé z nich se také přímo účastní zpracování malých ribonukleárních RNA, což posléze vede k pseudouridylaci snRNA (285). Zdá se, že panuje konsenzus, že základní příčinou DC je vliv těchto mutací na telomery, a nikoliv ribozomální efekty jako takové. Ačkoli je třeba uvést, že transkripce genů rDNA úzce souvisí se stabilitou genomu, očekávalo by se, že změny v telomerázovém komplexu potlačí transkripci rRNA, zatímco změny v H/ACA snoRNP by měly ovlivnit zpracování rRNA. Tkáně s největší mírou proliferace či metabolismu jsou nejvíce ovlivněny DC (286).

Treacherův-Collinsův syndrom (TCS) je autozomálně dominantní porucha vznikající alterací v genu *tcof1*, který kóduje protein Treacle. Delece 5 bps v exonu 24 představuje asi 20 % případů. Jedinci mají hypoplazii obličeje, nedostatečně vyvinutou strukturu vnějšího ucha, abnormality vnitřního ucha a vývojové vady mozku. Treacle se lokalizuje společně s UBF a RNA pol I a stimuluje transkripci pre-rRNA 47S. Myší modely TCS prokázaly upregulaci p53 a výraznou apoptózu buněk (287).

6 Cíle práce

- I. Stanovit vliv triterpenoidních pyridinů a pyrazinů na expresi proteinů souvisejících s apoptózou a buněčným cyklem.
- II. Vytvořit reporterové buněčné modely dvou majoritních izoform *c-Myc* genu. Validovat tyto modely pomocí siRNA a nízkomolekulárních látek cílících na známé modulátory *c-Myc*.
- III. Vytvořit buněčné modely s haploinsuficiencí vybraných ribozomálních proteinů malé a velké podjednotky. Na těchto modelech dále studovat signální dráhy spjaté s ribozomálním stresem a regulací genu *c-Myc*.

7 Materiál a metodika

7.1 Kultivace buněk a testování viability

Buněčná linie U2OS (HTB-96, ATCC, USA) je odvozena od osteosarkomu. Buňky byly kultivovány v lahvích o průměru 75 cm² v médiu McCoy's 5A w/ L-Glutamine (BE12-688F, Lonza, UK) doplněném 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu (D910, Diagnostics, Nizozemsko) a 10% fetálním telecím sérem (10270, Gibco, Austrálie).

Proliferační aktivita byla měřena pomocí testu MTS. Buňky byly nasazeny pomocí automatického pipetoru Multidrop Combi (ThermoFisher Scientific, USA) do 384-jamkových mikrotitračních destiček (PerkinElmer, USA) v hustotě 800 buněk na jamku. Destičky byly poté inkubovány 72 hodin při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ při 100% vlhkosti. Na konci inkubace bylo přidáno 5 µl roztoku MTS (G1111, Promega, USA) a po inkubaci trvající 1,5 h byla změřena optická hustota (OD) při 490 nm pomocí spektrofotometru Envision (Perkin Elmer, USA). Přežití buněk (CS) bylo vypočteno pomocí následující rovnice: $CS = (\text{průměrná OD buněčné linie RPS7-mut} / \text{průměrná OD buněčné linie RPS7-WT}) \times 100 \%$.

7.2 Příprava buněčných modelů technologií CRISPR/Cas9

K editaci genomu a zavedení mutace nebo HiBiT tagu v genech *c-Myc*, *RPS7* a *RPL11* do buněčné linie U2OS byl použit systém CRISPR/Cas9. Endonukleáza Cas9 byla nasměrována k vytvoření řezu mezi zvolenými bázemi pomocí syntetické gRNA sestávající ze specificky navržené crRNA a univerzálních sekvencí tracrRNA. Mutace byla poté vložena pomocí homologicky řízené opravy podle ssODN templátu, která byla navržena tak, aby zabránila opětovnému stříhu editovaného genu narušením sekvence PAM gRNA. Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA, Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA ATTO™ (#1075928), Ultramer DNA Oligo (ssODN templát) a Alt-R® S.p HiFi Cas9 nukleáza V3 (#1081061) byly zakoupeny od Integrated DNA Technologies, USA. crRNA/tracrRNA hybridizace a tvorba ribonukleoproteinového (RNP) komplexu byly provedeny podle pokynů výrobce. Elektroporace komplexů RNP do buněk byla provedena pomocí transfekčního systému Neon™ (1230 V, 10 ms, 4 pulzy; Invitrogen™, MPK5000, USA). Monoklonální buněčné linie byly izolovány limitním ředěním. Primární screening

monoklonálních buněčných linií na požadovanou mutaci byl proveden zkoumáním restričních spekter amplikonů RPS7-WT a RPS7-mut: specifické restriční místo endonukleázy PfiFI (R0595S, New England Biolabs, UK) je u klonálních buněčných linií nesoucích SNV RPS7 p.V134F zničeno Obrázek 9. Bylo provedeno Sangerovo sekvenování PCR amplikonů z kandidátních buněčných linií, aby se ověřila přesnost vložení SNV zprostředkovaného CRISPR/Cas9 do genomického lokusu genu *RPS7*. Amplifikace PCR pro analýzu restričních spekter a Sangerovo sekvenování byla provedena pomocí polymerázy Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England Biolabs, UK) a následujících specifických primerů: RPS7_F 5'-ACTGGCAGTTCTGTGATGCTAA-3' a RPS7_R 5'-CAGTCACCCACATGGTTATGTC-3' (Generi Biotech, Česká republika).

7.3 HiBiT Blotting

Postup se v počátečních krocích této metody v ničem neliší od western blottingu popsaného níže. Lyzáty byly separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla inkubována v TBS-T po dobu 10 min při pokojové teplotě a třepání. Poté byl přidán purifikovaný protein LgBiT, naředěný dle instrukcí výrobce a membrána byla inkubována přes noc při 4 °C s třepáním (Nano-Glo® HiBiT Blotting System, N2410, Promega). Pro detekci signálu byl přidán furimazinový substrát a luminiscence byla detekována pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA).

7.4 Transfekce siRNA, ovlivnění látkami

Ke snížení exprese cílových genů byly použity siRNA od firmy Origene a postup transfekce byl proveden podle pokynů výrobce transfekčního činidla JetPrime. Výsledná koncentrace siRNA byla 50 nM a doba inkubace 72 h.

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a kontrolní buňky byly ovlivněny rovněž stejným množstvím tohoto rozpouštědla. Deriváty triterpenů byly syntetizovány na Ústavu molekulární a translační medicíny. Názvy testovaných derivátů triterpenů jsou následující: látka 1b - Lupa-2,20(29)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid, látka 8 - 30-Oxolupa-2,20(29)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid, látka 23 - (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl 3β-

hydroxylup-20(29)-en-28-oate, látka 24 - (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl 3-oxolup-20(29)-en-28-oate.

Látky testované jakožto potenciální antagonisté c-Myc pro screening byly zakoupeny od společnosti Cayman Chemicals.

7.5 Stanovení NanoLuc aktivity

Buňky byly při vysetí umístěny do bílých 96jamkových nebo 384jamkových destiček pro tkáňové kultury (CulturePlate, PerkinElmer) a kultivovány po dobu 24 hodin před ošetřením látkami nebo siRNA. Poté byl podle protokolu výrobce přidán stejný objem Nano-Glo HiBiT lytického činidla (Promega N3030), které se skládá z Nano-Glo HiBiT lytického pufru, Nano-Glo HiBiT lytického substrátu a LgBiT proteinu, jako byl objem média. Buňky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě s třepáním. Luminiscence byla poté měřena pomocí přístroje EnVision (PerkinElmer).

7.6 Izolace RNA z buněčných linií, kvantifikace mRNA a Sangerovo sekvenování

Celková RNA byla izolována pomocí komerčního činidla TRIzol (Invitrogen, USA) podle pokynů výrobce. Tři mikrogramy celkové RNA byly reverzně přepsány pomocí náhodných primerů (C1181, Promega, USA) a reverzní transkriptázy RevertAid H Minus (EP0451, Thermo Scientific™, USA). Dva µl výsledné cDNA byly PCR-amplifikovány na přístroji LightCycler® Instrument 480 II/96 (05015278001, Roche, Švýcarsko) pomocí Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England Biolabs, UK) s barvivem EvaGreen® (#31000-T, Biotium, USA). Sekvence primerů použitých k hodnocení hladin mRNA RPS7 byly následující: RPS7_F 5'-ACTGGCAGTTCTGTGATGCTAA-3', RPS7_R 5' CAGTCACCCACATGGTTATGTC-3', GAPDH_F 5'-GAAGATGTGATGGGATTTC-3' a GAPD_R 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (Generi Biotech, Česká republika). GAPDH byl použit jako vnitřní kontrola. Ke stanovení násobných změn relativní genové exprese byla použita metoda delta-delta Ct. PCR amplifikace pro Sangerovo sekvenování cDNA byla provedena s použitím stejných primerů, ale bez barviva EvaGreen®.

7.7 Analýza buněčného cyklu

Buněčné linie RPS7-WT a RPS7-mut byly nasazeny v hustotě $0,5 \times 10^6$ buněk na misku tkáňové kultury o průměru 22,1 cm² a poté byly po 48 hodinách sklizeny a

shromážděny spolu s plovoucími buňkami. Vzniklé buněčné pelety byly promyty studeným 1 x PBS, fixovány ve studeném 70% ethanolu přidaném po kapkách, uloženy přes noc při -20 °C, promyty v 1 x citrátovém pufru, barveny 15 min v 50 µg/ml propidium jodidu (SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C a ošetřeny dalších 15 min 0,5 mg/ml RNAse A (060M7000V, Sigma-Aldrich, USA). Nakonec byly ošetřené vzorky stabilizovány uložením při 4 °C po dobu 1 hodiny a byla provedena průtoková cytometrie pomocí průtokového cytometru vybaveného argonovým laserem o vlnové délce 488 nm (BD FACSAria II Sotp). Výsledná data byla analyzována pomocí softwaru Kaluza Analysis verze 2.1 (Beckman Coulter, USA).

7.8 Analýza inkorporace BrdU

Buňky byly kultivovány podle výše uvedeného popisu s tím rozdílem, že 30 minut před sklizní bylo přidáno 10 µM 5-bromo-2'-deoxyuridinu (125H0932, Sigma-Aldrich, USA) pro pulzní značení nově syntetizované DNA. Připojené buňky byly poté sebrány spolu s plovoucími buňkami. Buněčné pelety byly promyty studeným 1 x PBS, fixovány ve studeném 70% ethanolu přidávaném po kapkách a uloženy přes noc při -20 °C. Druhý den byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 30 minut v 2M HCl obsahující 0,5 % Tritonu X-100, aby došlo k denaturaci DNA. Po neutralizaci 0,1 M Na₂B₄O₇ (pH = 8,5) byly buňky promyty 1 x PBS obsahujícím 0,5 % Tween-20 a 0,1 % BSA před barvením primární protilátkou proti BrdU (klon MoBu-1, 11-286-C100, Exbio, Česká republika) po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě. Poté byly buňky promyty 1 x PBS obsahujícím 0,5 % Tween-20 a 0,1 % BSA a obarveny sekundární protilátkou, anti-myším IgG-FITC (F2883, Sigma-Aldrich, USA), po dobu 30 min při pokojové teplotě. Po dalším promytí 1 x PBS obsahujícím 0,5 % Tween-20 a 0,1 % BSA a inkubaci s propidiumjodidem (50 µg/ml, SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA) a RNázou A (10 mg/ml, 060M7000V, Sigma-Aldrich, USA) po dobu 30 min při pokojové teplotě ve tmě byly vzorky stabilizovány při 4 °C po dobu 30 min. Poté byla provedena průtoková cytometrie pomocí průtokového cytometru vybaveného argonovým laserem s vlnovou délkou 488 nm (BD FACSAria II Sotp; Becton Dickinson, USA). Výsledná data byla analyzována pomocí softwaru Kaluza Analysis verze 2.1 (Beckman Coulter, USA).

7.9 Analýza proteosyntézy

Inhibice celkové biosyntézy proteinů v buněčných liniích byla zkoumána pomocí soupravy Click-iT™ AHA Alexa Fluor™ 488 Protein Synthesis HCS Assay (C10289, Invitrogen, USA). Buňky byly nasazeny v hustotě $1,5 \times 10^6$ buněk na 60 cm^2 misku pro tkáňové kultury a po 48 hodinách sklizeny spolu s plovoucími buňkami. Po promytí 1 x PBS byly buňky inkubovány 1 hodinu v médiu bez methioninu, aby se vyčerpaly jejich zásoby methioninu. Poté byl do média bez methioninu přidán L-azidohomoalanin na konečnou koncentraci $142,9 \mu\text{M}$ a buňky byly inkubovány po dobu 1 hodiny, aby se umožnila inkorporace L-azidohomoalaninu, analogu L-methioninu s azidovou funkcí, do nově syntetizovaných proteinů. Buňky byly promyty 1 x PBS, fixovány v 1 x PBS obsahujícím 4 % formaldehyd po dobu 15 minut při pokojové teplotě, permeabilizovány 0,25 % Tritonem X-100 v PBS po dobu 15 minut a promyty v 3 % BSA v 1 x PBS. Po promytí byly buňky inkubovány s reakčním koktejlem Click-iT® po dobu 30 min při pokojové teplotě a chráněny před světlem. Koktejl obsahoval alkyn konjugovaný s AlexaFluor 488 v konečné koncentraci $19,4 \text{ nM}$. Tento alkyn reaguje s azidy prostřednictvím mědi katalyzované click reakce za vzniku fluorescenční sloučeniny. Výsledný fluorescenční signál nově syntetizovaných proteinů byl měřen pomocí průtokového cytometru vybaveného argonovým laserem o vlnové délce 488 nm (BD FACSAria II Sorp, Becton Dickinson, USA) a výsledná data byla analyzována pomocí softwaru Kaluza Analysis verze 2.1 (Beckman Coulter, USA). Jako pozitivní kontrola bylo k buňkám v médiu bez methioninu přidáno antibiotikum cykloheximid (01810, Sigma-Aldrich, USA), známý silný inhibitor syntézy proteinů, v konečné koncentraci $80 \mu\text{g/ml}$ po dobu 2 hodin. Buňky ošetřené cykloheximidem byly poté inkubovány s L-azidohomoalaninem a zpracovány podle výše uvedeného postupu.

7.10 Western blotting

Buněčné linie RPS7-WT a RPS7-mut byly nasazeny a odebrány za stejných podmínek jako pro analýzu průtokovou cytometrií. Buněčné pelety byly promyty studeným 1 x PBS a lyzovány v pufru RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % deoxycholátu sodného, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA a cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (04693116001, Roche, Švýcarsko)). Koncentrace proteinů byla stanovena

pomocí sady Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Scientific, USA). Celkem 30 µg buněčných proteinů bylo denaturováno v Laemmliho pufru (10% β-merkapt ethanol, 0,06% bromfenolová modř, 47% glycerol, 12% SDS, 0,5M Tris pH 6,8), separováno pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy a přeneseno na nitrocelulózovou membránu pomocí Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (1704150, Bio-Rad, USA). Membrány byly poté inkubovány s primárními protilátkami proti c-Myc (ab32072, Abcam, UK), cyklinu D1 (2978, Cell Signaling Technology, USA), E2F1 (ab179445, Abcam, UK), BCCIP (ab97577, Abcam, UK), Bim (2933, Cell Signaling Technology, USA), MDM2 (ab16895, Abcam, UK), β-katenin (ab32572, Abcam, UK), Noxa (ab13654, Abcam, UK), nukleolin (ab22758, Abcam, UK), p21 (2947, Cell Signaling Technology, USA), p53 (ab1101, Abcam, UK), p53 Antibody Sampler Kit (37909, Cell Signaling Technology, USA), PUMA (ab33906, Abcam, UK), ubikvitin (3933, Cell Signaling Technology, USA), RPS7 (ab57637, Abcam, UK) a β-aktinu (A2228, Sigma Aldrich, USA) přes noc při 4 °C a následné inkubaci s příslušnou sekundární protilátkou vázanou na peroxidázu (A-2304 nebo A-0545, Sigma Aldrich, USA). Chemiluminiscenční signály byly vizualizovány pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA).

7.11 Northern blotting

Druhy pre-rRNA byly analyzovány metodou northern blottingu. 10 µg celkové RNA bylo smícháno s 1 objemem nakládacího pufru (50% formamid, 0,06% formaldehyd, 10% glycerol, 0,05% bromfenolová modř v 1x MOPS pufru) a separováno na 2% agarózovém gelu v 1x MOPS pufru (20mM MOPS, 5mM octan sodný, 2mM EDTA, pH 7,0) obsahujícím 2% formaldehyd při 23 V přes noc při 4 °C. RNA byla poté přenesena na nylonovou membránu (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare, USA). Po fixaci UV zesíťováním byly membrány předhybridizovány po dobu 1 h při 45 °C v DIG Easy Hyb (DIG Northern Starter Kit, Roche, Švýcarsko). Poté byla přidána oligodeoxynukleotidová sonda značená digoxigeninem a inkubována přes noc při 45 °C. V této studii byly použity tyto sondy: ITS1 (5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'), ITS2b (5'-CTGCGAGGGAACCCAGCCGCGCGCA-3'), ITS2d/e (5'-GCGCGACGGCGACGACCGCGCGGTC-3') (Generi Biotech, Česká republika). (288). Pro detekci ITS2 byly sondy ITS2b a ITS2d/e smíchány ve stejném množství. Po

hybridizaci sond byly provedeny čtyři stringenční promývání - dvě pomocí 2 x SSC (0,15 M NaCl, 15 mM citrát sodný, pH 7,0) obsahující 0,1 % SDS po dobu 5 min při pokojové teplotě, poté dvě pomocí 0,25 x SSC s 0,1 % SDS po dobu 15 min. Před blokovacím krokem byly membrány krátce promyty v promývacím pufru (0,1 M kyselina maleinová, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 7,5), poté blokovány v blokovacím roztoku po dobu 30 min a inkubovány s protilátkou proti digoxigeninu-AP (obě DIG Northern Starter Kit, Roche, Švýcarsko) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Nenavázané protilátky byly odstraněny dvojitým promytím promývacím pufrům vždy po dobu 15 min. Před měřením chemiluminiscenčního signálu byly membrány 5 min ekvilibrovány v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5), poté byl přidán substrát CDP-Star a signály byly získány pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA).

7.12 Statistická analýza

Všechny údaje jsou uvedeny jako průměr \pm SEM na základě nejméně tří biologických opakování. Statistická významnost rozdílů byla hodnocena pomocí analýzy variance ANOVA s použitím prahu významnosti $p < 0,05$ (GraphPad Prism verze 8.0).

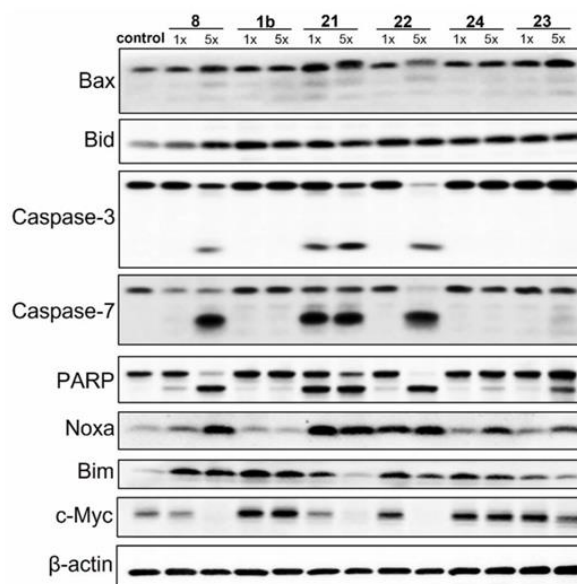
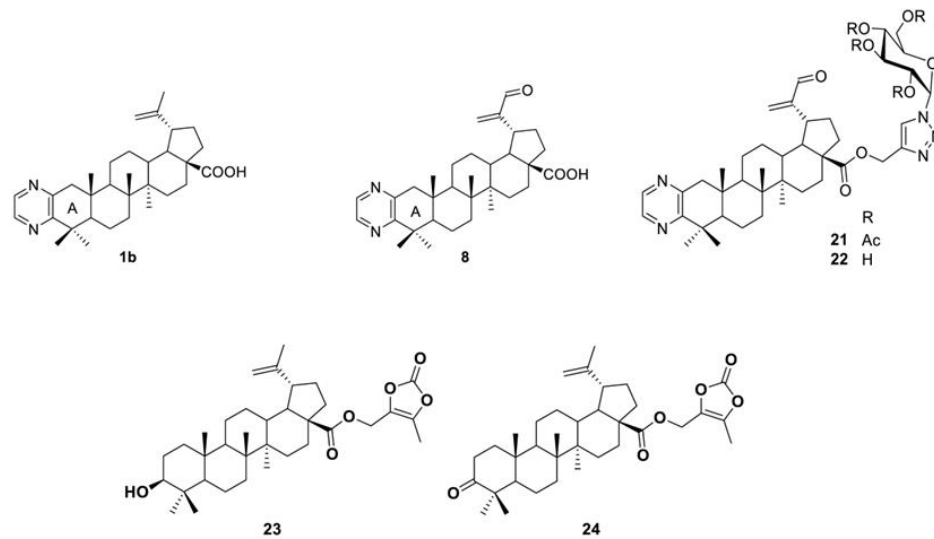
8 Výsledky

8.1 Vliv triterpenoidních pyridinů a pyrazinů na expresi proteinů souvisejících s apoptózou a buněčným cyklem

Triterpeny jsou přírodní sloučeniny, které mají různé biologické aktivity, včetně antimalarické (289), antileishmaniální (290), anti-HIV (291), protizánětlivé (292) a mnoho dalších (293). Mezi těmito aktivitami je pravděpodobně nejstudovanější a nejdůležitější protinádorová aktivita. Mnoho výzkumných skupin připravuje polosyntetické triterpeny s vysokou a selektivní cytotoxicitou vůči nádorovým buňkám (294). Triterpeny obsahující heterocyklus sloučený s jejich skeletem jsou jednou z největších a nejdůležitějších tříd takových sloučenin (295–297). Již dříve bylo na našem pracovišti skupinou pana doc. Urbana připraveno několik typů heterocyklických triterpenů. Mezi nimi aminothiazoly a pyraziny připravené z kyseliny betulonové měly IC_{50} v nízkých mikromolárních hodnotách (298).

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat cytotoxicitu triterpenoidních pyridinů a pyrazinů a najít možné vztahy mezi strukturou a aktivitou triterpenoidních 3-oxoderivátů a jim odpovídajících pyrazinů a pyridinů. K objasnění mechanismu, kterým studované sloučeniny indukují apoptózu, byla provedena imunodetekce několika proteinů patřících do drah programované buněčné smrti Obrázek 4. Po 24hodinovém působení studovaných triterpenových derivátů byla zjištěna akumulace Bax a Bid, klíčových komponent pro buněčnou apoptózu vyvolanou mitochondriálním stresem. Po apoptotické stimulaci tvoří Bax oligomery nebo interaguje s Bid a přemísťuje se z cytosolu do vnější mitochondriální membrány (299). Prostřednictvím interakcí s pórovými proteiny na mitochondriální membráně zvyšují komplexy Bax a Bax/Bid permeabilitu membrány, což v konečném důsledku vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následnému apoptosomový komplex s Apaf-1 a pro-kaspázou-9, což vede k aktivaci kaspázy-9 (300). Imunodetekce Bax odhalila přítomnost jeho štěpných produktů, které silněji indukují apoptózu, což se projevuje vyšším uvolňováním cytochromu c, aktivací kaspázy-3/7 a fragmentací DNA, potenciálně v důsledku jejich zvýšené homooligomerizace v mitochondriálních membránách (301). Pro-apoptotické proteiny Bax a Bid tedy přenášejí apoptotický signál z buněčného povrchu do mitochondrií a spouštějí aktivaci kaspáz (302). Proto jsme se

dále zaměřili na kritické vykonavatele apoptózy včetně kaspázy-3 a kaspázy-7, protože jsou buď částečně, nebo zcela zodpovědné za proteolytické štěpení mnoha klíčových proteinů, jako je jaderný enzym poly(ADP-ribóza) polymeráza (PARP). Zdá se, že PARP, jaderná poly (ADP-ribóza) polymeráza o velikosti 116 kDa, se podílí na opravě DNA v reakci na environmentální stres (303). Tento protein může být štěpen mnoha kaspázami podobnými ICE *in vitro* a je jedním z hlavních cílů štěpení kaspázy-3 *in vivo* (304,305). U lidského PARP dochází ke štěpení mezi Asp214 a Gly215, který odděluje aminoterminální DNA vazebnou doménu PARP (24 kDa) od karboxy-terminální katalytické domény (89 kDa) (305). PARP pomáhá buňkám udržet si životaschopnost; štěpení PARP usnadňuje buněčný rozpad a slouží jako marker buněk procházejících apoptózou. V buňkách CCRF-CEM ošetřených látkami v uvedených koncentracích bylo zjištěno zjevné štěpení PARP: 1 × IC₅₀ a 5 × IC₅₀ 8, 1 × IC₅₀ a 5 × IC₅₀ 21, 1 × IC₅₀ a 5 × IC₅₀ 22, 5 × IC₅₀ 24, 5 × IC₅₀ 23. Dále jsme se zaměřili na hladiny proteinů patřících do rodiny "BH3-only". Členové rodiny "BH3-only" (např. Noxa, Bad, Bim, Puma, Bid, Bik a Hrk) jsou vysoce regulované proteiny, které indukují apoptózu prostřednictvím interakce závislé na BH3 s anti-apoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 (306). Jako první jsme vybrali Noxu, malý protein, který hraje klíčovou roli při zprostředkování apoptotické signalizace. Obsahuje jednu doménu homologie Bcl-2 (BH3) a lokalizuje se v mitochondriích, kde váže anti-apoptotické proteiny Mcl-1 a A1/Bfl-1 (307,308). S Mcl-1 také soutěží o vazbu na mitochondriální protein Bak. Zvýšená exprese Noxy pěkně koreluje se štěpením PARP a naznačuje probíhající apoptózu v důsledku účinku triterpenu na buňky CCRF CEM. Dále jsme se zaměřili na Bim, který podobně jako Noxa obsahuje doménu BH3 a indukuje apoptózu tím, že se váže na anti-apoptotické členy rodiny Bcl-2, konkrétně Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1 a BHRF-1, a antagonizuje je (309). Nakonec byl imunodetekován c-Myc, marker zvýšené buněčné proliferace, který je často indukován u mnoha typů nádorů (24). Jeho exprese byla výrazně snížena jako odpověď na léčbu triterpenovými deriváty: 1 × IC₅₀ a 5 × IC₅₀ 8, 1 × IC₅₀ a 5 × IC₅₀ 21, 5 × IC₅₀ 22, 5 × IC₅₀ 23. Toto zjištění jde ruku v ruce s údaji z analýzy buněčného cyklu, kde byla zjištěna akumulace buněk ve fázích sub-G₁ a G₀/G₁ na úkor fází S, G₂ a M.



Obrázek 4: A – Struktury testovaných derivátů triterpenů. B - Výsledky western blot analýzy buněk CCRF-CEM ošetřených látkami 8, 1b, 21, 22, 24 a 23 v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $5 \times IC_{50}$ po dobu 24 h. Pro detekci kaspáz-3/7 byly použity protilátky specificky rozpoznávající prekurzorovou i aktivní formu. Pomocí protilátky anti-PARP byl detekován protein plné délky i fragment vzniklý štěpením kaspáz. Pro kontrolu stejného množství detekovaných proteinů byla použita protilátka proti β -aktinu. Jako kontrola byly použity neošetřené buňky.

8.2 Reporterové buněčné modely dvou majoritních izoform c-Myc

V lidském těle téměř nenajdeme protein, který by neměl rozsáhlou sekvenční homologii s některým členem své rodiny nebo izoformou, protože lidská buňka potřebuje k zajištění nepřetržité funkčnosti redundanci. Isoformy proteinů jsou někdy kódovány různými geny a často mají konkrétní geny více transkriptů, které produkují mírně odlišné proteiny v závislosti na tom, jak jsou sestřihovány. Mnoho onemocnění je charakterizováno převažující expresí specifických izoform enzymů a exprese různých izoform se často kvantifikuje na úrovni RNA pomocí RT-qPCR, sekvenování nebo mikročipy. Na druhé straně je kvantifikace hladin vysoce homologních proteinů obtížná a omezená dostupností protilátek specifických pro izoformy. Kromě toho přesné identifikaci proteinů touto metodou někdy brání odchylky ve kvalitě protilátek mezi jednotlivými šaržemi a také rozpoznávání nesespecifických vazebných partnerů. Navíc při studiu nově identifikovaných izoform nebo méně prozkoumaných proteinových rodin často nejsou k dispozici pro izoformu specifické monoklonální protilátky. Na tento problém jsme narazili při zkoumání izoform transkripčního faktoru c-Myc.

Protože exprese proteinů a jejich posttranslační modifikace mají zásadní význam pro buněčnou fyziologii může jejich narušení vést k patofyziologickým stavům jako jsou nádorová, neurodegenerativní a zánětlivá onemocnění. Objasnění vnitřní dynamiky těchto procesů tak může nabídnout vhled do mechanismů onemocnění a poskytnout prediktivní modely pro objevování léčiv. Dynamické procesy v buňkách se rutinně studují pomocí proteinových fúzí s reporterovými značkami nejčastěji GFP nebo podobnými autofluorescenčními proteiny. Obvykle se toho v savčích buňkách dosahuje nadměrnou expresí rekombinantních proteinů z vektorů obsahujících silné konstitutivní promotory. Vynecháním endogenních genetických lokusů pro expresi proteinů však může při absenci správných regulačních prvků způsobit nerovnováhu v hladinách proteinů, což vede k nefyziologickým artefaktům.

V posledních letech se CRISPR/Cas9 stal významnou technologií pro editaci genomu díky své jednoduchosti a snadnému použití. Kombinací vlastností CRISPR/Cas9, tj. štěpit specifická místa s přirozenými buněčnými mechanismy opravy DNA lze přesně vkládat reportery do endogenních lokusů. Byly zaznamenány případy integrace reporterů

GFP a luciferázy zprostředkované CRISPR/Cas9 ačkoli tyto postupy jsou obecně náročné a relativně neúčinné. Nedávno byla popsána možnost značit endogenní proteiny peptidem o 16 aminokyselinách odvozeným od GFP. Tato peptidová značka (GFP11) generuje fluorescenci při koexpresi se svým komplementárním fragmentem GFP1-10. Malá velikost značky umožnila, aby donorové DNA templáty kódující GFP11 byly vyrobeny jako syntetické jednořetězcové oligodeoxynukleotidy (ssODN). V kombinaci s ribonukleoproteinovým komplexem (RNP) obsahujícím syntetickou guide RNA (gRNA) a purifikovaný Cas9 to umožnilo účinnou editaci genomu bez využití klonování (310).

Ačkoli produktivita tohoto přístupu podporuje značení celého proteomu detekční citlivost GFP může být nedostatečná pro úroveň exprese většiny endogenních proteinů. Zejména proteiny zapojené do buněčné signalizace bývají exprimovány v relativně nízkých hladinách, a proto mohou být obtížně detekovatelné. Navíc zrání fluoroforu rekonstituovaného komplexu GFP je poměrně pomalé, což omezuje jeho vhodnost pro kvantifikaci dynamických procesů. Naopak luciferázové reportery jsou uznávány proto, že poskytují vysoce citlivou detekci a rychlou kvantifikaci v rozsáhlém koncentračním rozsahu. Abychom využili všech těchto výhod, rozhodli jsme se použít podobný přístup pro značení endogenních proteinů založený na velmi jasné luciferáze NanoLuc. Tato luciferáza je přibližně 100krát jasnější než Firefly nebo Renilla luciferáza a její molekulová hmotnost (19 kDa) je podstatně nižší než GFP (311).

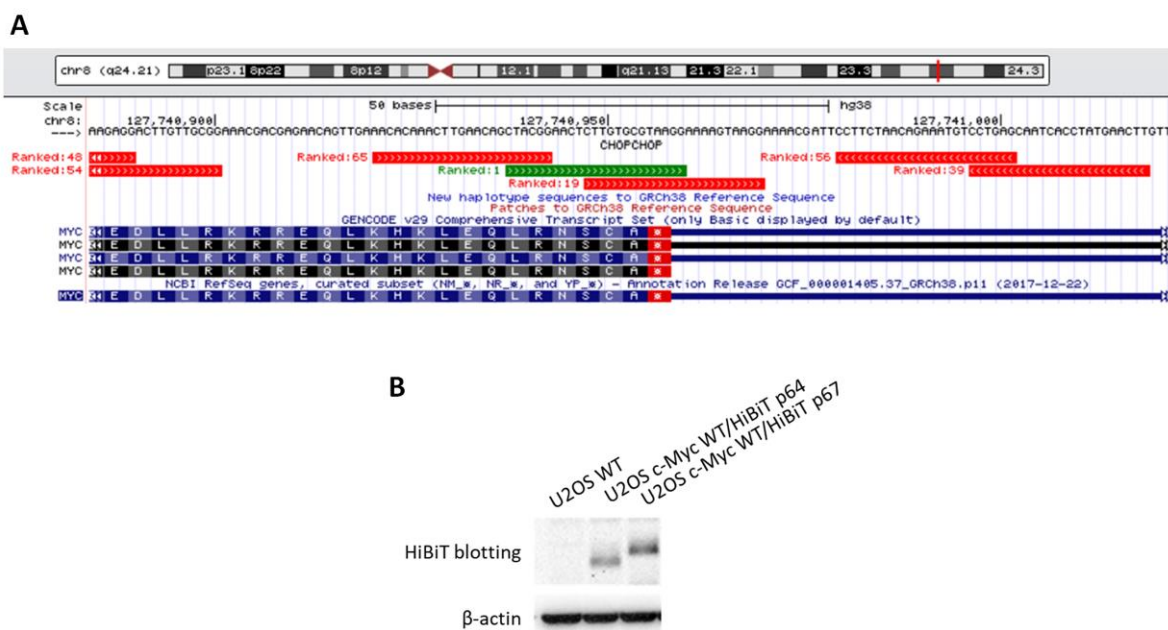
Komplementární podjednotky rozdělené NanoLuc luciferázy byly navrženy tak, aby přesně měřily dynamiku interakcí proteinů v buňkách. Tento reporterový systém (NanoBiT) se skládá z peptidu o 11 aminokyselinách (HiBiT) který interaguje s mimořádně vysokou afinitou ($K_D = 700 \text{ pM}$) s polypeptidem o velikosti 18 kDa (LgBiT) a vytváří luminiscenční komplex. Díky své schopnosti účinně se komplexovat LgBiT a HiBiT slouží jako kvantitativní luminiscenční peptidová značka. Vzhledem k jeho malé velikosti je HiBiT vhodný pro účinné značení endogenních proteinů pomocí ssODN donorových templátů spolu s CRISPR/Cas9 RNP komplexy (312).

Abychom mohli provést fenotypový screening modulátorů exprese dvou majoritních c-Myc izoforem p64 a p67 snažili jsme se vytvořit prostředí, ve kterém by bylo možné hodnotit expresi c-Myc při minimálním zásahu do lokusu. Za tímto účelem jsme

použili technologie NanoBiT a CRISPR/Cas9 k vytvoření reporterových buněčných linií u nichž bylo možné sledovat expresi obou izoform c-Myc pomocí nového typu reporteru. Pro úspěšnou editaci se gRNA, která se váže velmi blízko požadovanému místu vložení značky HiBiT, zkomplexuje s Cas9 a doplní se jednořetězcovými donorovými DNA templáty (ssODN) pro homologicky řízenou opravu DNA. Několik dní po elektroporaci buněk ribonukleoproteinovým komplexem, sestávajícím z Cas9, gRNA a ssODN, lze pomocí detekce signálu NanoLuc luciferázy vyhodnotit, zda byl do buněk vložen HiBiT tag. Donorové templáty byly navrženy tak, aby se zabránilo opětovnému stříhu editovaných genů narušením cílové sekvence gRNA. Protože exprese peptidové značky přímo z templátu ssODN je vysoce nepravděpodobná, stejně jako náhodná integrace vedoucí k expresi funkčního peptidu znamená luminiscence v přítomnosti LgBiT expresi HiBiT v cílových lokusech. Jelikož luminiscenční signál v hromadně editovaném poolu buněk v kultuře byl během jejich proliferace relativně nestabilní pro spolehlivou kvantifikaci proteinu doporučujeme derivovat monoklonální populace se 100 % buněk exprimujících HiBiT tag v požadovaném lokusu. K ověření, že luminiscence pochází ze správného proteinu značeného HiBiT byla použita technika blotování bez protilátek, takzvaný HiBiT blotting, která potvrdila jediný luminiscenční band odpovídající správné molekulové hmotnosti obou izoform c-Myc viz Obrázek 5. HiBiT blotting se provádí separací lyzátů pomocí SDS-PAGE, přenosem proteinů na nitrocelulózu membránu, inkubací membrány s purifikovaným LgBiT a substrátem s následnou detekcí chemiluminiscence NanoLuc luciferázy.

Ačkoli buněčné pooly editované pomocí HiBiT vykazují dostatečný luminiscenční signál a stabilitu pro mnoho experimentálních potřeb klonální buněčné linie jsou potenciálně výhodné tam, kde nízká míra integrace, slabá exprese cíle nebo nízká stabilita poolu omezují sílu signálu. Za účelem prozkoumání jednoduchosti, s jakou lze generovat validované klonální linie a posouzení výkonnostních charakteristik těchto linií byly z původních heterogenních poolů pomocí limitního ředění jednotlivých buněk generovány klony. Přibližně 3 týdny po provedení limitního ředění byly klony podrobeny screeningu luminiscence za účelem identifikace klonů, které nesou inzerci HiBiT. Ve všech případech bylo izolováno více pozitivních klonů, které vykazovaly zlepšení luminiscence v rozmezí 4 až 8násobku oproti odpovídajícímu buněčnému poolu. Tyto

výsledky naznačují, že buněčné linie exprimující fúze s HiBiT tagem na fyziologických úrovních exprese lze rychle vytvořit pomocí jednoduché subklonovací procedury. Na rozdíl od generování stabilních buněčných linií náhodnou integrací není nutná selekce antibiotiky, což proces urychluje a zefektivňuje, a protože je modifikován pouze endogenní lokus s vysokou specifičností je méně pravděpodobné zavedení biologických artefaktů spojených s náhodnou integrací do genomu.

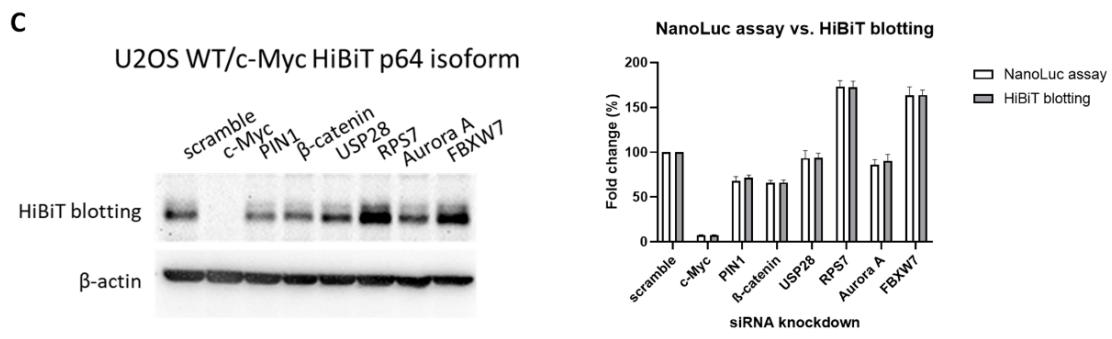
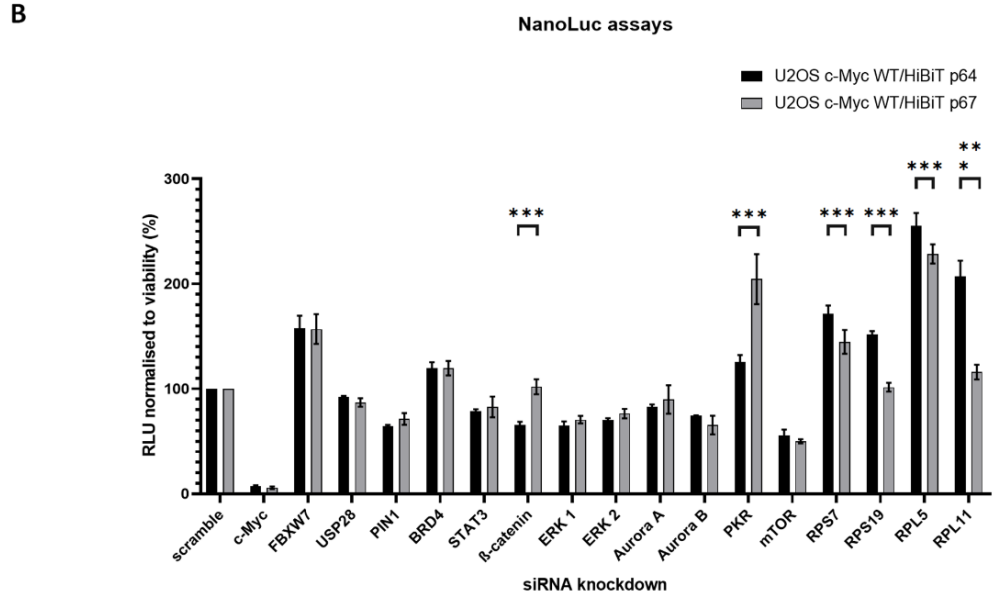
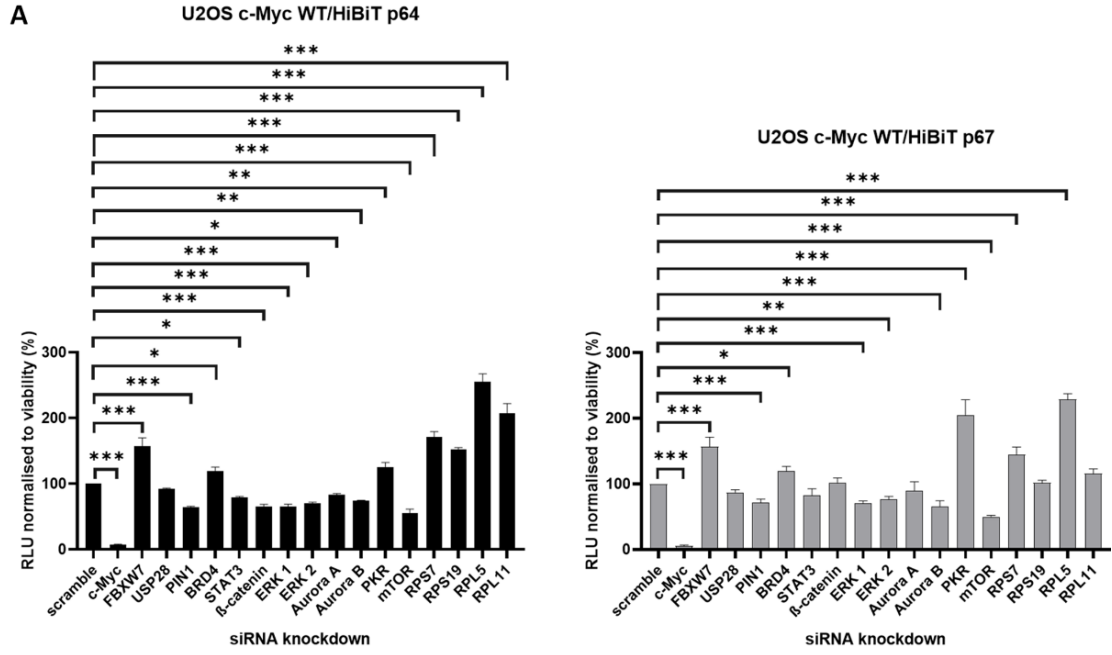


Obrázek 5: A - Znárodnění nasedání jednotlivých gRNA navržených programem CHOPCHOP v rámci lokusu c-Myc. B - Výsledek specifické detekce izoforem p64 a p67 c-Myc v reporterových buněčných liniích provedené pomocí HiBiT blottingu.

Z buněčného poolu s geneticky modifikovaným c-Myc lokusem obsahujícím HiBiT tag bylo izolováno celkem 30 monoklonálních buněčných linií nesoucích tuto reporterovou značku. Pro každou z těchto linií jsme provedli HiBiT blotting k detekci značeného proteinu. Zajímavým zjištěním bylo, že pouze jedna z těchto 30 monoklonálních buněčných linií vykazovala specifické značení izoformy p67 c-Myc, zatímco u zbývajících linií byla vždy značena izoforma p64 c-Myc.

Pro další práci a podrobnější charakterizaci c-Myc reporterů byly vybrány 2 buněčné klony (p67 c-Myc a p64 c-Myc). Jejich výsledky HiBiT blottingu jsou zobrazeny na Obrázek 5. Následně jsme se zaměřili na podrobnou charakterizaci obou reporterů pro

c-Myc pomocí potlačení exprese genů ovlivňujících stabilitu a degradaci tohoto transkripčního faktoru pomocí siRNA. Postup experimentu byl následující: Pro potlačení exprese vybraných genů jsme použili 50 nM siRNA, která byla transfekována do obou reporterových buněčných linií. Po 72 hodinách byla stanovena aktivita reporterů pomocí NanoLuc eseje. Po přidání detekčního činidla došlo k lyzi buněk. LgBiT se navázal na HiBiT umístěný na C-terminálním konci c-Myc proteinu, což vedlo ke komplementaci luciferázy NanoLuc a uvolnění luminiscenčního signálu. Tento signál, přímo úměrný hladině proteinu c-Myc, jsme následně normalizovali vzhledem k viabilitě buněk, která byla stanovena pomocí MTS eseje.



Obrázek 6: A, B - Validace reporterových linií U2OS c-Myc^{WT/HiBiT p64} a U2OS c-Myc^{WT/HiBiT p67} za použití siRNA ke specifickému snížení exprese genů modulujících hladinu c-Myc. C - Srovnání získaných dat metodami luciferázové eseje NanoLuc a HiBiT blotting.

Jako první siRNA jsme zvolili c-Myc siRNA, což vedlo k výraznému poklesu luminiscenčního signálu u obou reporterů p64 a p67 c-Myc na 7,6 % a 5,7 %, jak je znázorněno na Obrázek 6. Dále jsme zkoumali geny ovlivňující degradaci c-Myc. Snížení exprese E3 ubikvitin ligázy FBXW7 způsobilo zvýšení hladin izoform p64 a p67 c-Myc o 57 % oproti kontrolní siRNA. U ubikvitin specifické proteázy USP28, která odstraňuje navázané ubikvitiny z transkripčního faktoru c-Myc, nedošlo k výrazné změně hladin obou izoform. Při snížení exprese peptidyl-prolyl izomerázy Pin1, která přímo ovlivňuje fosforylaci serinu 62 a threoninu 58 u proteinu c-Myc a tím jeho stabilitu, bylo zaznamenáno snížení hladin p64 c-Myc na 64 % a p67 c-Myc na 71 % ve srovnání s kontrolou scramble siRNA. Dalším analyzovaným proteinem byl bromodoménový protein BRD4, který přímo ovlivňuje fosforylaci threoninu 58, čímž podporuje degradaci c-Myc. Snížení hladiny BRD4 prostřednictvím siRNA vedlo u obou buněčných reporterů ke zvýšení exprese o 19 % v porovnání s kontrolní skupinou. Funkčnost našich vytvořených buněčných reporterů byla rovněž ověřena snížením hladiny STAT3, což vedlo k poklesu exprese obou izoform c-Myc o 20 % ve srovnání s příslušnými kontrolami. Mezi další transkripční faktory, které přímo regulují expresi c-Myc, patří kromě STAT3 rovněž β -katenin, součást kanonické WNT signální dráhy. Snížení exprese β -kateninu vedlo k poklesu hladin pouze izoformy p64 c-Myc o 35 %, zatímco u izoformy p67 c-Myc jsme nezaznamenali změnu v její expresi. Další zkoumání zahrnovalo analýzu kináz, které pozitivně ovlivňují stabilitu c-Myc fosforylací Ser62. Snížení hladiny ERK1 vedlo k poklesu exprese p64 a p67 c-Myc o 35 % a 30 %, zatímco snížení hladiny ERK2 mělo za následek pokles o 30 % a 24 %, odpovídající hladině kontroly (scramble siRNA). Nízká hladina Aurora A kinázy nezpůsobila výrazné změny jinak tomu ovšem bylo v případě Aurora B, jejíž downregulace způsobila pokles hladin p64 c-Myc na 74 % a p67 c-Myc na 65 %. V rámci našeho experimentu testování funkčnosti reporterů c-Myc jsme dále zkoumali dva geny, které byly dříve identifikovány jako jediné, jejichž změněná exprese vede k odlišné expresi obou izoform c-Myc. Prvním z těchto genů je kináza PKR. Nízká hladina PKR stimulovala expresi proteinu c-Myc u obou jeho izoform. U izoformy p64 c-Myc došlo k nárůstu o 25 % v porovnání s kontrolní skupinou, zatímco nejvýrazněji byla aktivována

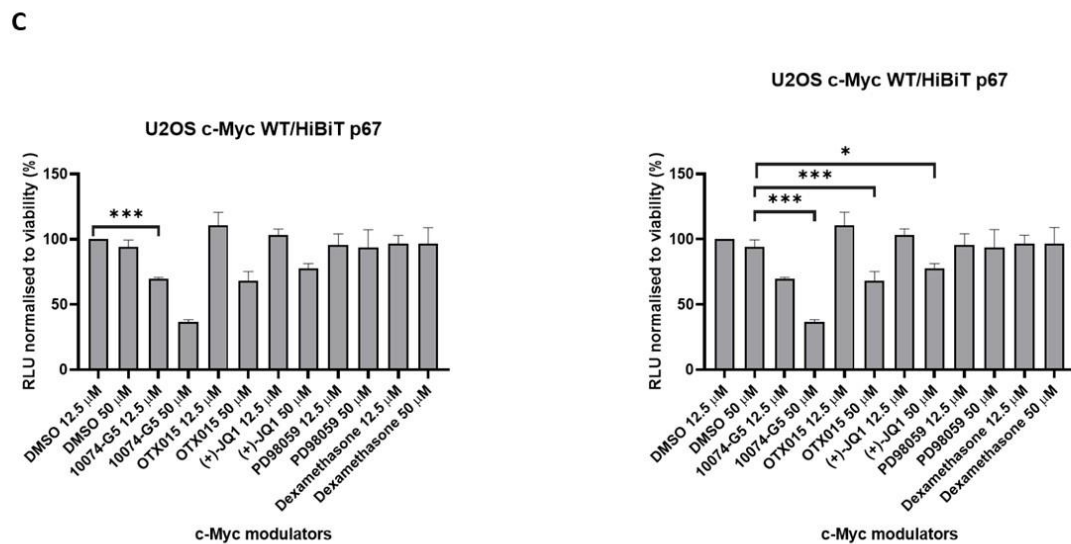
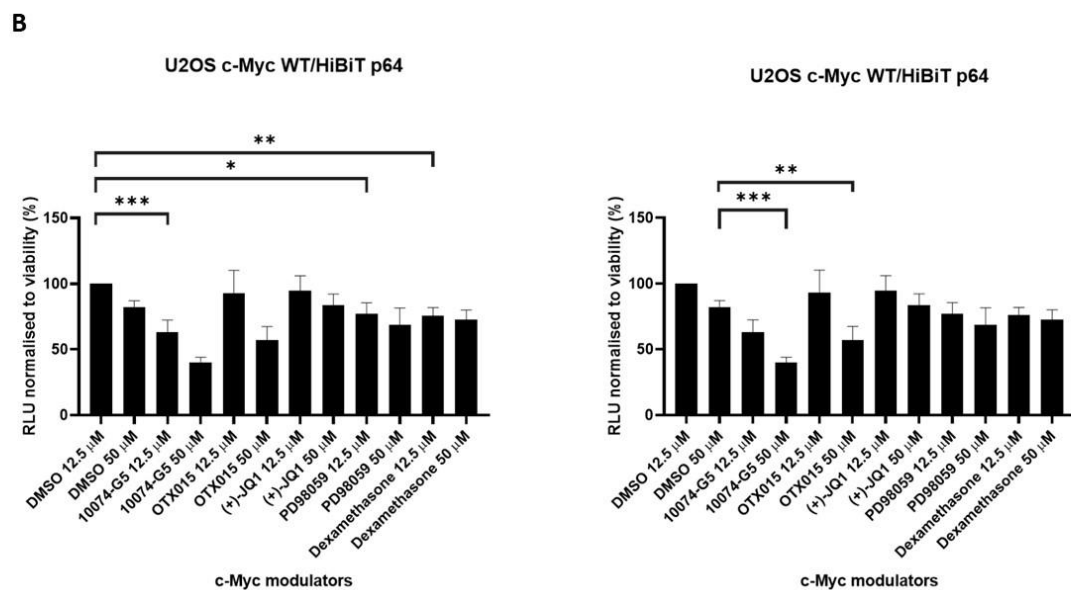
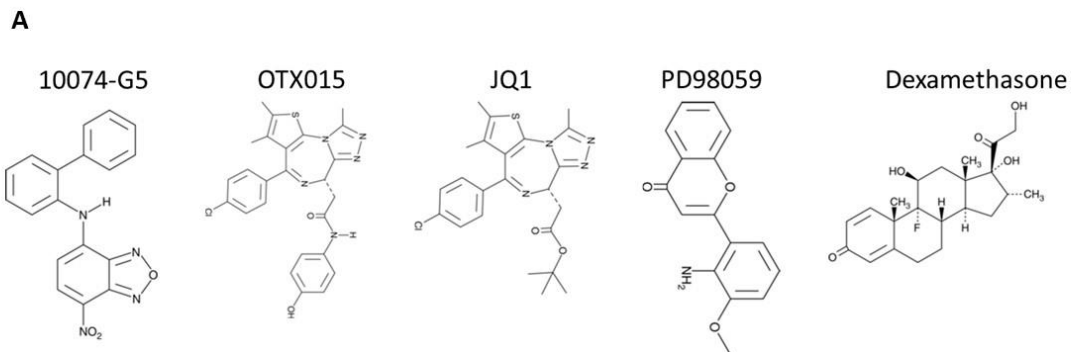
exprese izoformy p67, a to na dvojnásobek v porovnání se scramble siRNA. Druhým zkoumaným genem byla kináza mTOR, u níž je známo, že její inhibice rapamycinem vede ke zvýšení exprese izoformy p67 c-Myc. Otázkou zůstává, jaká změna nastane po použití siRNA knockdownu, což dosud nebylo popsáno. Během našeho experimentu došlo k současnému snížení obou hladin p64 a p67 c-Myc na polovinu ve srovnání s kontrolní skupinou. V rámci validačního experimentu jsme zařadili geny, jejichž exprese je přímo regulována studovaným transkripčním faktorem. Konkrétně se jedná o geny kódující ribozomální proteiny, mezi něž patří RPS7 a RPS19, tvořící malou ribozomální podjednotku, a RPL5 společně s RPL11, strukturní složky velké ribozomální podjednotky. Je dobře známo, že RPL11 a RPL5 nejenže jsou regulovány prostřednictvím c-Myc, ale zpětně ovlivňují i expresi tohoto onkogenu prostřednictvím degradace jeho mRNA. Snížením hladiny RPL5 jsme pozorovali výrazný nárůst exprese obou izoform c-Myc. V případě p64 byl nárůst až o 155 % oproti kontrolní skupině, zatímco v případě p67 dosáhl 128 %. Při snížení exprese RPL11 jsme pozorovali dvojnásobný nárůst hladiny p64 c-Myc, zatímco u p67 c-Myc byl nárůst méně výrazný, pouze o 15 % oproti scramble siRNA. Podobné změny byly zaznamenány při snížení exprese ribozomálních proteinů malé podjednotky. U RPS7 došlo ke zvýšení exprese p64 izoformy o 71 % a u p67 izoformy o 44 % oproti kontrolní skupině. U RPS19 knockdownu došlo pouze k ovlivnění exprese p64 izoformy, jejíž hladina narostla o 52 % oproti kontrole, přičemž hladina p67 izoformy zůstala nezměněna.

Lze tedy konstatovat, že se nám nejenom úspěšně podařilo validovat fyziologickou funkci a vhodnost reporterových systémů, založených na malé modifikaci endogenního lokusu, ale rovněž jsme odhalili dosud nepopsané geny, které diferenciálně regulují expresi hlavních izoform c-Myc, konkrétně p64 a p67. Mezi již dříve známé geny, jako jsou PKR a mTOR, jsme nově zařadili β -katenin a ribozomální proteiny RPS7, RPS19, RPL5 a RPL11.

Dalším zajímavým aspektem bylo porovnání dat získaných pomocí NanoLuc eseje a HiBiT blottingu, zejména pokud jde o jejich normalizaci na viabilitu. Toto srovnání jsme provedli na náhodně vybraných vzorcích po downregulaci výše zmíněných genů pomocí siRNA. Výsledky obou metod, buď normalizované na viabilitu v případě NanoLuc eseje

nebo na hladinu proteinu β -aktinu v případě HiBiT blottingu, generují srovnatelná data, jak ilustruje Obrázek 6.

Po úspěšné fenotypové validaci obou nových reporterových buněčných systémů pro detekci hladin p64 a p67 c-Myc jsme přistoupili k optimalizaci NanoLuc eseje pro vysokokapacitní testování knihoven chemických látek. Pro transformaci eseje na testování látek pomocí robotické platformy (označované zkratkou HTS, z anglického high throughput screening) jsme nejprve potřebovali vybrat účinného referenčního antagonistu. Při výběru potenciálních antagonistů pro HTS jsme se rozhodli začít komerčně dostupnou látkou 10074-G5, která je známým inhibitorem heterodimerizace c-Myc s jeho vazebným partnerem Max. Dalšími látkami byly již známé inhibitory BET proteinů, u kterých bylo dříve popsáno, že rovněž snižují hladinu c-Myc. Prvotním inhibitorem BET byla látka JQ1, jejíž vlastnosti byly později optimalizovány vytvořením derivátu OTX015. Jako čtvrtou látku s potenciálním účinkem vůči c-Myc jsme zahrnuli do testování nekompetitivní inhibitor MAPK signální dráhy, který zabraňuje aktivaci MEK kinázy, konkrétně PD98059. Poslední látkou zařazenou do tohoto testování byl glukokortikoid dexametazon, který má výborné protizánětlivé účinky a je také jedním z léků pro pacienty trpící Diamond-Blackfanovou anémií, o které bude pojednávat další část této práce. Již dříve jsme studovali účinky dexametazonu a bylo nám známo, že má vliv na hladinu c-Myc, proto jsme jej do tohoto testování rovněž zařadili. Struktury pěti hodnocených látek jsou uvedeny na Obrázek 7.

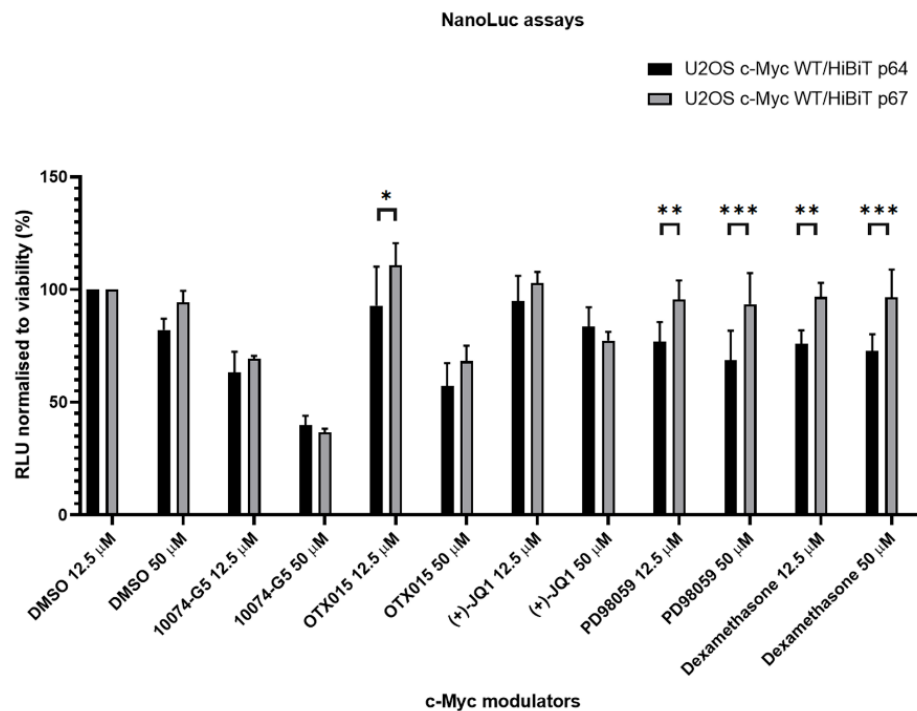


Obrázek 7: Validace reporterových linií U2OS c-Myc^{WT/HiBiT p64} (B) a U2OS c-Myc^{WT/HiBiT p67} (C) pro použití k vysokokapacitnímu screeningu. A - Struktury látek zvolených ke specifickému snížení exprese c-Myc a výsledky testování daných látek na obou reporterových liniích.

Všech pět potenciálních referenčních antagonistů prošlo testováním v podmínkách, při kterých by probíhal i plánovaný vysokokapacitní screening, tedy ve formátu 384 jamkových kultivačních panelů. Aktivita těchto látek byla analyzována pomocí NanoLuc esejí, které zaznamenávají hladinu obou izoform c-Myc, a následně byla normalizována vůči viabilitě buněk, jež byla stanovena MTS esejemi. Testované látky byly hodnoceny v koncentračním rozsahu o sedmi koncentracích, začínajících na 12,2 nM a postupujících v násobcích čísla 4 až do maximální koncentrace 50 µM. V rámci optimalizace bylo využito pět různých inkubačních intervalů, po nichž následovalo měření. Tyto intervaly byly stanoveny na 3 hodiny, 6 hodin, 9 hodin, 16 hodin a 24 hodin. Pro přehlednost jsou uvedena pouze data, při nichž byla zaznamenána nejlepší účinnost testovaných látek, a byl dosažen výborný Z-faktor esejí pro HTS. Konkrétně jsou uvedena data po 6hodinové inkubaci s testovanými látkami v koncentracích 12,5 µM a 50 µM. Tyto výsledky jsou prezentovány na Obrázek 7.

Při nižší testované koncentraci 12,5 µM se jako jediná látka osvědčila 10074-G5, která významně snížila expresi izoformy p64 na 63 % a izoformy p67 na 69 %. U ostatních látek byl jejich vliv zanedbatelný ve srovnání s kontrolou DMSO, případně regulovaly expresi pouze jedné z izoform. Toto bylo patrné zejména u látek PD98059 a dexametazonu, což nebylo vhodné pro plánovaný vysokokapacitní screening. Při testování vybraných látek o koncentraci 50 µM jsme zaznamenali vliv samotného DMSO na hladinu p64 c-Myc, která byla snížena na 82 % ve srovnání s 12,5 µM DMSO, a v případě izoformy p67 na 94 %. Nejúčinnější látkou z testovaného souboru byla opět 10074-G5, která snížila expresi p64 c-Myc na 40 % a p67 izoformy na 36 %. Druhou nejúčinnější látkou byla OTX015, jejíž působení způsobilo pokles exprese p64 izoformy na 57 % a p67 izoformy na 68 %. Druhý BET inhibitor JQ1 snížil hladinu p64 izoformy na 83 % a p67 izoformy na 77 %. U posledních testovaných látek, PD98059 a dexametazonu, byl, stejně jako při nižší koncentraci, zaznamenán efekt pouze na snížení exprese jedné z izoform c-Myc, což je diskvalifikovalo z plánovaného použití pro HTS. Pro úplnost námi získaných dat uvádíme graf srovnání hladin exprese p64 a p67 izoformem po působení

těchto pěti kandidátních látek, kde pouze MAPK inhibitor PD98059 a glukokortikoid dexametazon společně s BET inhibitorem OTX015 byly schopny narušit poměr exprese c-Myc izoformem ve prospěch p67 viz Obrázek 8.



Obrázek 8: Vzájemné porovnání efektů látek modulujících hladiny izoformem c-Myc p64 a p67.

8.3 Buněčné modely s haploinsuficiencí vybraných ribozomálních proteinů malé a velké podjednotky

Český a slovenský registr DBA v současnosti zahrnuje 62 pacientů. U 50 z těchto pacientů (81 %) byly dříve pomocí masivního paralelního sekvenování identifikovány příčinné mutace v genech kódujících *RPS19*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11* a *RPS17* (313,314).

Nová nesynonymní zárodečná heterozygotní transverze hg38 chr2:g.3,580,153G>T vedoucí k aminokyselinové substituci p.V134F byla identifikována pomocí MPS v exonu 6 genu *RPS7* (NM_001011) u jedné pacientky s DBA a dvou jejích asymptomatických příbuzných (313). Mutace byla následně potvrzena sekvenováním cDNA. Ultrahluboké sekvenování cDNA (průměrné pokrytí: 78 285x) ukázalo, že exprese mutované alely je v souladu s genotypem (proband: 55 % *RPS7*^{wt} / 45 % *RPS7*^{mut}, matka: *RPS7*^{wt} / 42 % *RPS7*^{mut}, sestra: *RPS7*^{wt} / 37 % *RPS7*^{mut}). Jiné změny genů pro ribozomální proteiny nebyly u pacientky ani jejích příbuzných zjištěny (313).

Valin 134 je v *RPS7* vysoce konzervovaný a substituce fenylalaninem v této pozici je považována za pravděpodobně škodlivou podle SIFT (skóre 0,01); PolyPhen (skóre 0,976); MetaLR (skóre 0,572); Provean (-2,526) a Mutation Assessor (skóre 0,929). Tato varianta byla předpovězena jako benigní pomocí Revel (skóre 0,407) a CADD (skóre 26). Vzhledem k tomu, že většina prediktorů popsala tuto variantu jako patologickou, rozhodli jsme se přistoupit k jejímu dalšímu experimentálnímu ověření. Prediktory stability proteinu *in silico* I-Mutant a MUpro navíc naznačují, že záměna snižuje stabilitu proteinu *RPS7*: index spolehlivosti I-Mutant pro tuto záměnu je 9 a skóre MUpro je -0,97 při použití metody neuronové sítě a -1 při použití metody Support Vector Machine. Ačkoli tato varianta byla hlášena v nedávné aktualizaci českého a slovenského registru DBA (313), žádná jiná SNV *RPS7* nebyla dříve popsána, proto jsme důkladně prozkoumali její patogenitu a základní mechanismy onemocnění pomocí geneticky modifikovaného buněčného modelu.

Zatímco fenotyp DBA se obvykle projevuje v erytroidní linii, ribozomální stres vyvolaný aberací RP je přítomen v mnoha tkáních pacienta, což vede k četným strukturálním, signálním a metabolickým abnormalitám. Z tohoto důvodu jsme zvolili

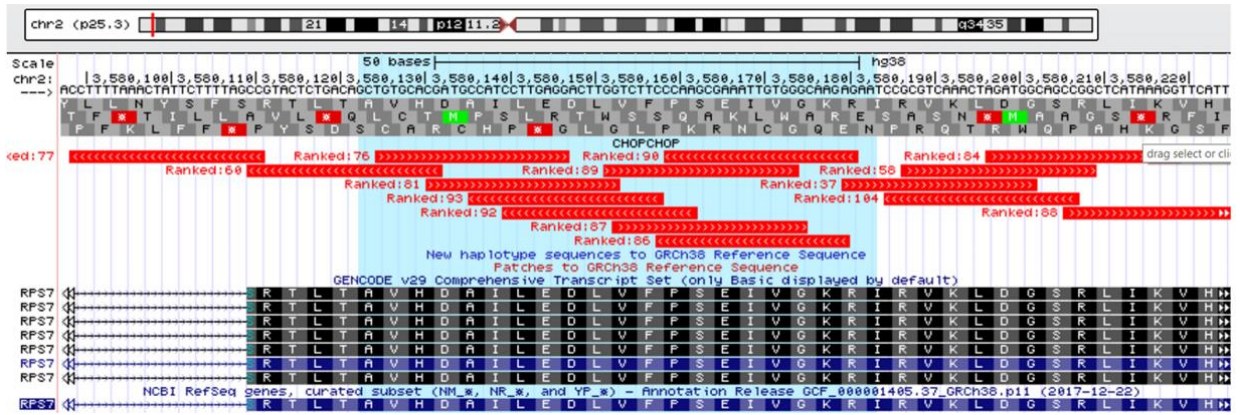
buněčnou linii U2OS osteosarkomu, která se často používá pro studie u DBA a je rutinně používána jako buněčný model pro ribozomální stres, zejména při studiu morfologie jadérek (315–318).

Pro účely podrobného studia DBA fenotypu byly využity dva typy buněčných modelů. Prvním z nich byly buňky, jejichž genom byl stabilně upraven pomocí technologie CRISPR-Cas9. Druhým modelem byl systém, u něhož byla exprese studovaných genů tranzientně snížena prostřednictvím siRNA. Studovanými geny byly geny kódující ribozomální proteiny RPS7, tvořící součást malé ribozomální podjednotky, a gen RPL11, klíčovou strukturní část velké ribozomální podjednotky. V rámci studia byla analyzována jednobodová mutace RPS7 p.V134F, zjištěná u rodiny trpící Diamond-Blackfanovou anémií. Na Obrázek 9 jsou zobrazené lokusy genů RPS7 a RPL11 s detailním popisem nasedání jednotlivých gRNA.

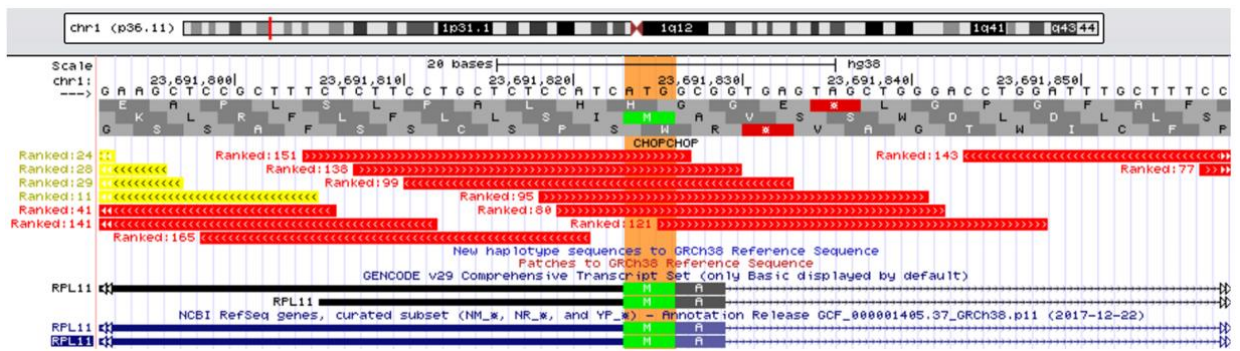
Pro modifikaci buněčných linií lidského osteosarkomu U2OS byla použita elektroporace ribonukleovými komplexy obsahujícími gRNA a Cas9 nukleázu, čímž vznikla polyklonální populace. Následně bylo nezbytné izolovat jednotlivé monoklonální linie a genotypizovat je s cílem získat uniformní buněčný model pro další experimentální práci a detailní charakterizaci fenotypu. Obrázek 9 prezentuje výsledky primárního screeningu monoklonálních linií derivovaných z polyklonální populace nesoucí mutaci RPS7 p.V134F. První screening zahrnoval restriční profilování s využitím endonukleázy SbfI ke štěpení PCR produktů obsahujících cílenou mutaci. Monoklonální linie s mutací RPS7 p.V134F nepodléhaly štěpení SbfI v porovnání s parentální buněčnou linií U2OS WT. Obdobný postup byl aplikován při vývoji buněčného modelu haploinsuficientního na protein RPL11, kde byl start kodon nahrazen kodonem stop.

V rámci sekundárního screeningu byla provedena PCR amplifikace modifikovaných lokusů v genomu buněčných linií a následné Sangerovo sekvenování. Získané genetické profily jsou prezentovány na Obrázek 10. Technologií CRISPR-Cas9 se tedy podařilo vytvořit dva specifické buněčné modely pro studium fenotypů buněk s haploinsuficiencí v genech RPS7 a RPL11.

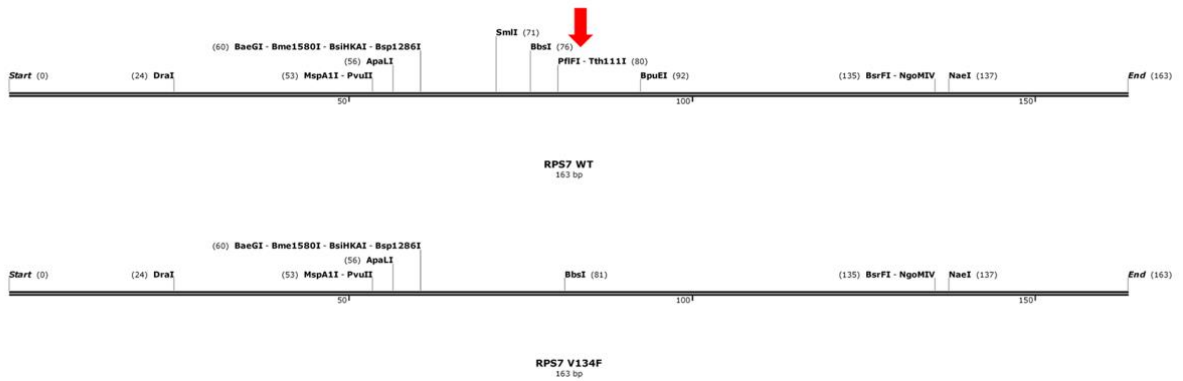
A



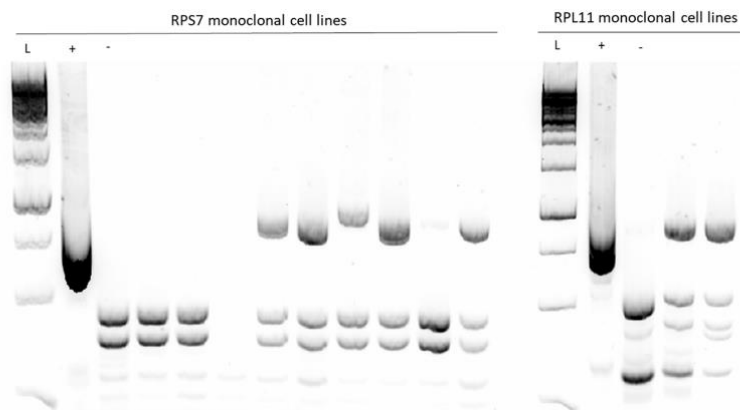
B



C



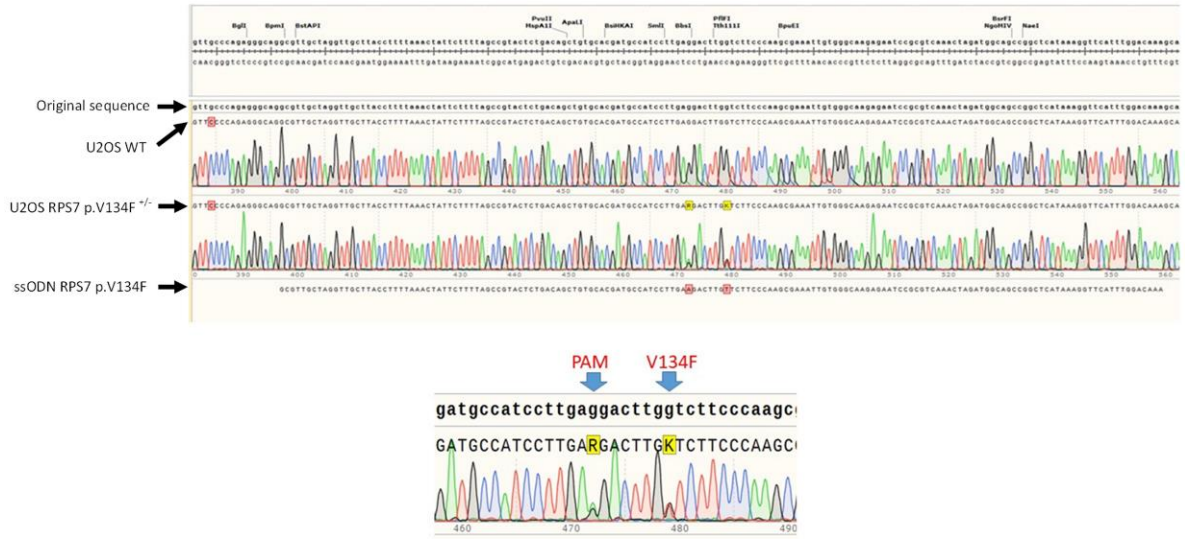
D



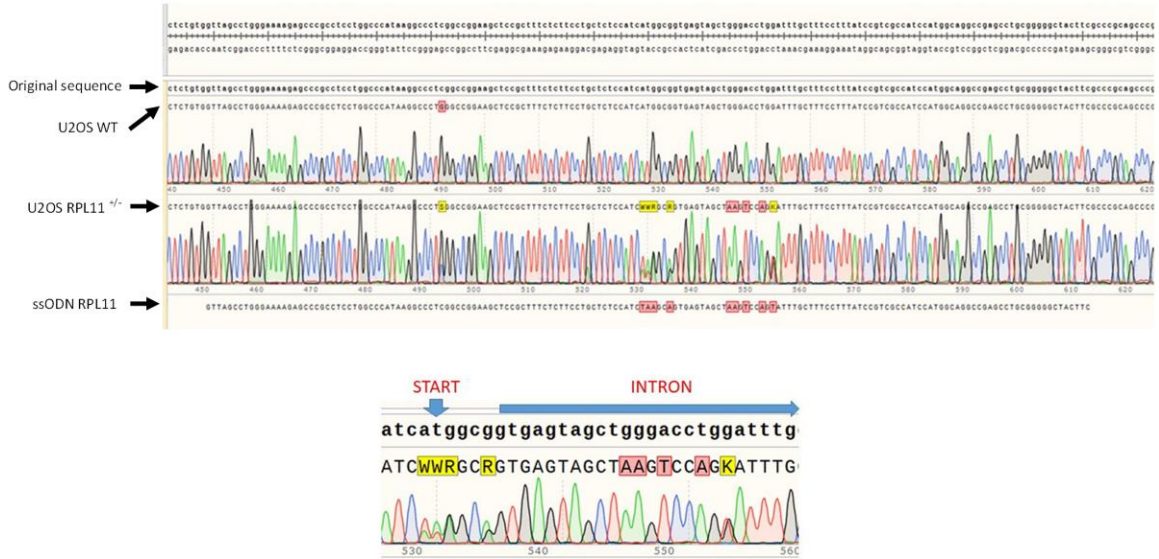
Obrázek 9: Znázornění nasedání jednotlivých gRNA navržených programem CHOPCHOP v rámci lokusů RPS7 (A) a RPL11 (B). C, D - Schéma restričního profilování znázorněného na restriční mapě a výsledky restričního profilování monoklonálních RPS7 a RPL11 buněčných linií.

Pro srovnání byly také využity buněčné linie U2OS s tranzientně sníženou expresí RPS7 a RPL11 pomocí siRNA. Postup transfekce byl optimalizován tak, aby studované buněčné linie měly sníženou expresi RPS7 nebo RPL11 na úroveň 50 % oproti kontrole ošetřené scramble siRNA. V grafu jsou prezentovány výsledky porovnání exprese RPS7 a RPL11 na úrovni mRNA u kontrolních vzorků (U2OS WT a scramble siRNA) ve srovnání s liniemi s knockdownem pomocí siRNA a modifikovanými technologií CRISPR-Cas9. V případě genu RPL11 došlo ke 50% snížení exprese na úrovni mRNA jak u siRNA buněčného modelu, tak u CRISPR-Cas9 buněčného modelu s nahrazeným start kodonem. V případě genu RPS7 byl patrný 50% pokles exprese u buněčné populace po siRNA downregulaci, avšak v případě CRISPR-Cas9 buněčného modelu s mutací RPS7 p.V134F nedocházelo k poklesu exprese mRNA studovaného genu. Profily exprese studovaných ribozomálních proteinů odpovídaly na úrovni mRNA i proteinů, jak je zřejmé z Obrázek 10 a Obrázek 12.

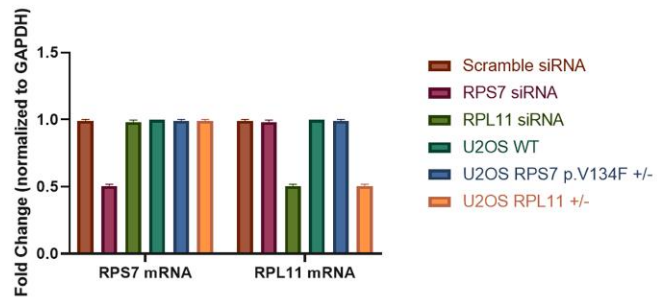
A



B



C

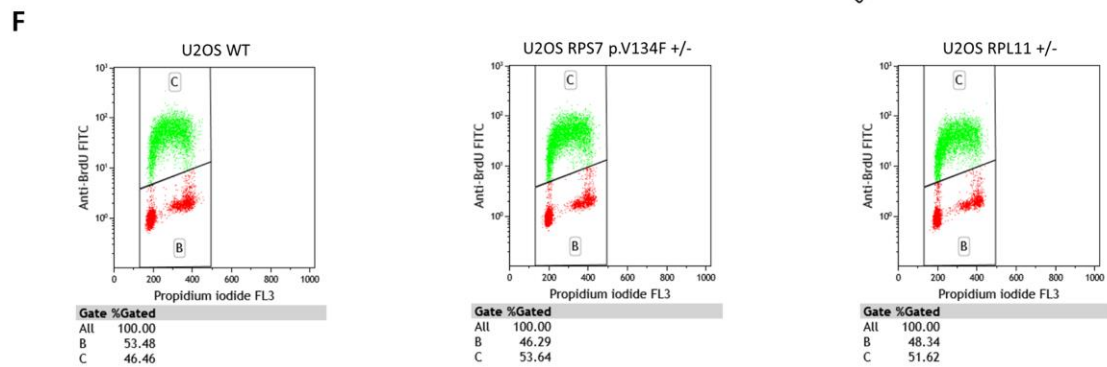
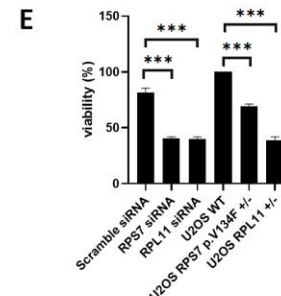
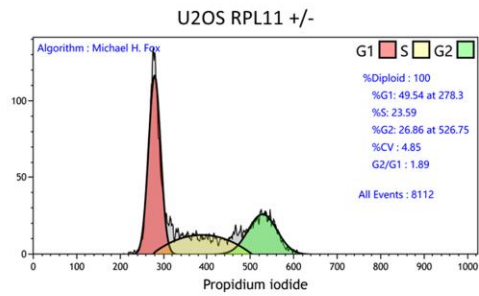
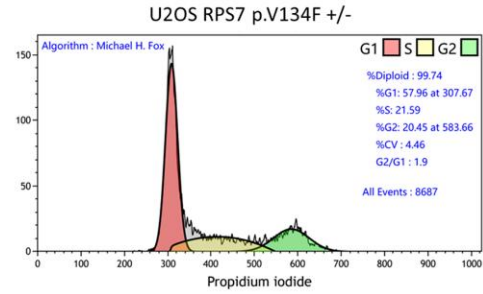
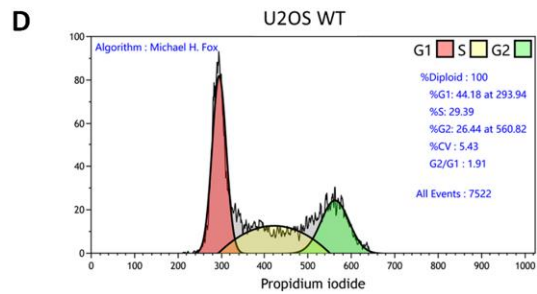
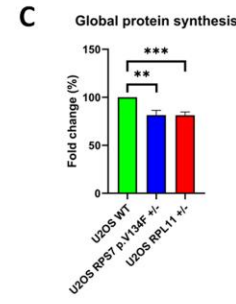
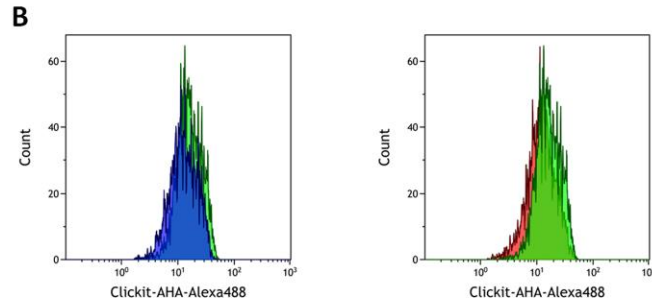
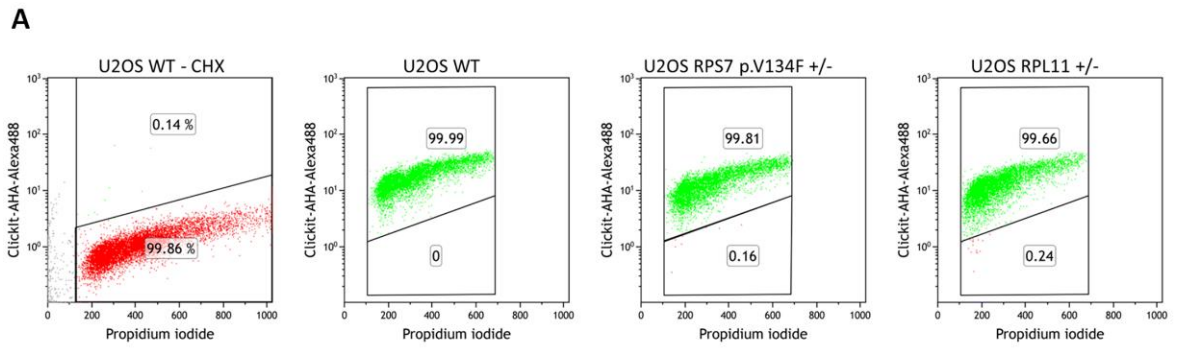


Obrázek 10: A - Identifikace mutace RPS7 u buněčných linií a potvrzení heterozygotní mutace hg38 chr2:g.3,580,153G>T v RPS7 pomocí Sangerova sekvenování. B – Identifikace záměny START kodonu za STOP kodon v RPL11 lokusu pomocí Sangerova sekvenování. C - Hladiny mRNA RPS7 a RPL11 detekovaných v siRNA a CRISPR/Cas9 buněčných modelech.

Z předchozích výzkumů je dobře známo, že nedostatek ribozomálních proteinů má za následek snížení proteosyntézy. V rámci našeho studia jsme se rozhodli sledovat rychlost syntézy nascentních proteinů. Nejprve jsme vystavili zkoumané buněčné linie deficitu methioninu a následně jsme jim podali jeho analog L-azidohomoalanin, který se integruje do nascentních proteinů místo methioninu. L-azidohomoalanin byl následně specificky detekován pomocí protilátky konjugované s FITC prostřednictvím průtokové cytometrie. Obrázek 11 obsahuje získaná data, přičemž horní část zahrnuje dot plot diagramy, znázorňující populaci buněk s různou mírou fluorescence v zeleném kanálu v závislosti na integrovaném L-azidohomoalaninu do proteinů. V dolní části Obrázek 11, týkající se proteosyntézy, jsou uvedeny histogramy pro porovnání parentálních buněčných linií s liniemi haploinsuficientními pro RPS7 nebo RPL11 gen. V případě CRISPR-Cas9 buněčného modelu RPL11 bylo zjištěno celkové snížení proteosyntézy na 75 % oproti parentální buněčné linii. V případě modelu CRISPR-Cas9 RPS7 p.V134F byl zaznamenán pokles na 70 % oproti parentální buněčné linii.

Vzhledem k tomu, že haploinsuficience ribozomálních proteinů ovlivňuje rychlost proteosyntézy, předpokládáme, že má také negativní vliv na buněčnou proliferaci. Pro posouzení míry ovlivnění proliferace u modifikovaných buněčných linií jsme použili dva metodické postupy: test viability MTS a analýzu buněčného cyklu u asynchronně kultivovaných populací. V prvním kroku jsme provedli test viability u buněčných modelů, jehož výsledky jsou graficky zobrazeny na Obrázek 11. Deficience RPS7 a RPL11 genů způsobila v obou případech významný pokles proliferace u studovaných buněčných modelů. Po aplikaci siRNA na RPS7 bylo dosaženo 50% snížení proliferace takto ošetřené buněčné linie po 72 hodinách od transfekce ve srovnání s parentální buněčnou linií vystavenou působení kontrolní siRNA. Stejný efekt byl zaznamenán i po 72 hodinách od transfekce siRNA vůči RPL11. V případě haploinsuficience RPL11 u CRISPR-Cas9 buněčného modelu bylo rovněž zjištěno 50% snížení proliferace oproti U2OS WT. Proliferace buněčné linie RPS7 p.V134F byla snížena pouze na 75% oproti parentální buněčné linii.

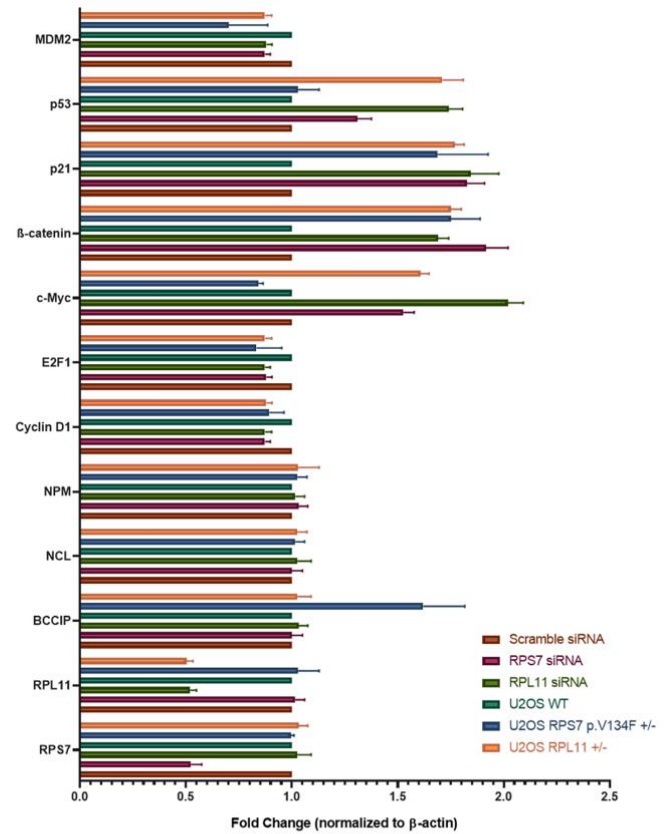
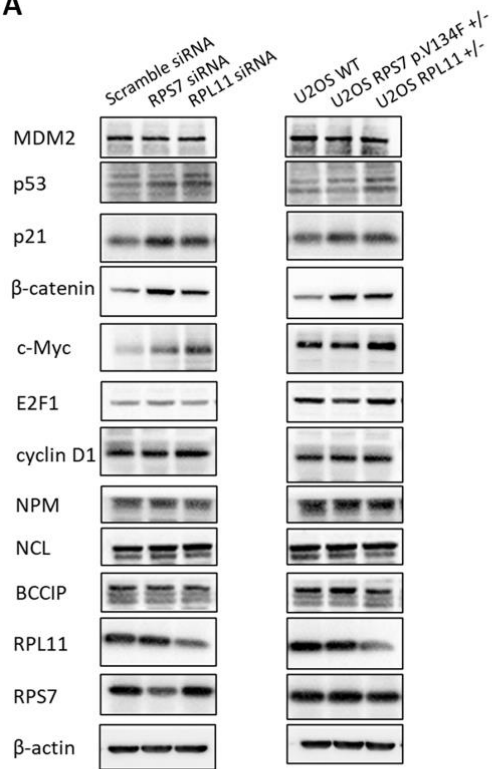
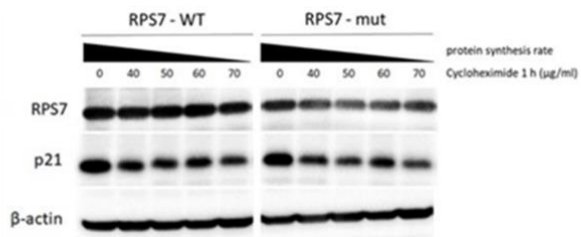
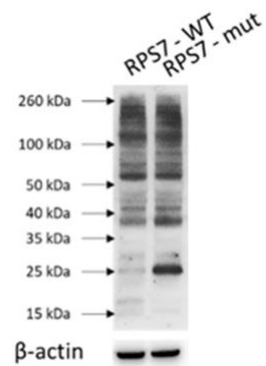
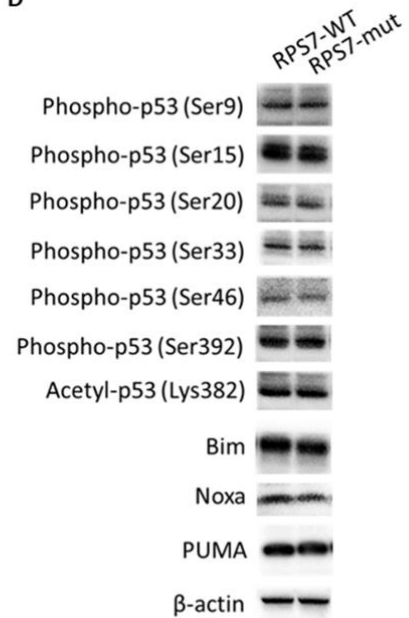
Snížení proliferace linií s deficiencí v ribozomálních genech bylo způsobeno akumulací buněk v G1/G0 fázi buněčného cyklu. V případě RPS7 p.V134F buněčného modelu došlo k 10% nárůstu počtu buněk v G1/G0 fázi buněčného cyklu, zatímco u haploinsuficientního modelu RPL11 došlo k akumulaci o 5% více oproti kontrole. Odpovídající histogramy jsou zobrazeny na Obrázek 11. Dále jsme provedli detailní studium syntézy DNA měřením inkorporace analogu thyminu, 2-deoxybromouridinu do nascentní DNA. Touto metodou jsme srovnali rychlost syntézy DNA mezi parentální linií a CRISPR-Cas9 modely. V případě RPS7 p.V134F byla syntéza DNA zvýšena o 7 % u modelu RPL11 o 5 % ve srovnání s U2OS WT. Mírný nárůst syntézy DNA je pravděpodobně způsoben zvýšeným oxidativním stresem, což bylo nedávno popsáno u DBA.



Obrázek 11: Cytometrická analýza syntézy proteinů v CRISPR – Cas9 buněčných modelech DBA. (A) Horní gate představuje populaci buněk aktivně syntetizujících proteiny. U2OS CHX představuje negativní kontrolu ošetřenou inhibitorem proteosyntézy cykloheximidem. (B, C) Celková rychlost syntézy proteinů byla stanovena podle intenzity inkorporovaného L-azidohomoalaninu v populaci buněk aktivně syntetizujících proteiny. Analýza parametrů buněčné proliferace. (D) buněčný cyklus, (E) míra proliferace, (F) syntéza DNA.

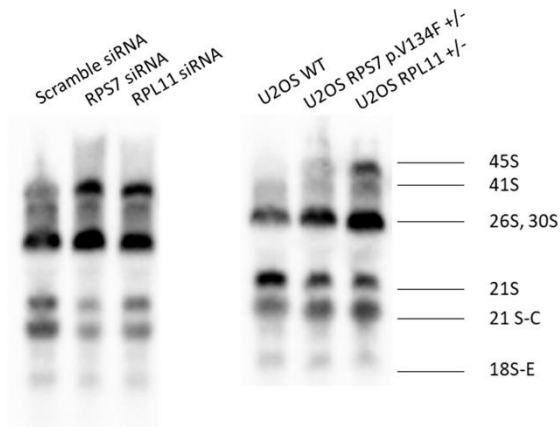
Zjištění, že buněčné linie modelující Diamond-Blackfanovu anémii vykazují sníženou proliferaci s akumulací v G0/G1 fázi buněčného cyklu, nás motivovalo podrobněji charakterizovat jednotlivé signální dráhy účastníci se ribozomálního stresu. Rozhodli jsme se nejprve zaměřit na proteiny spojené se signální dráhou transkripčního faktoru p53 pomocí metody western blottingu. Zaznamenali jsme významné zvýšení hladiny samotného p53 proteinu o 31 % u buněčných linií transfekovaných siRNA proti RPS7 ve srovnání s kontrolní siRNA. V případě RPL11 byl pozorován nárůst o 74 %. U haploinsuficientního modelu RPL11 vytvořeného pomocí technologie CRISPR-Cas9 došlo ke zvýšení hladiny p53 proteinu o 81 %, což je srovnatelné s siRNA modelem tohoto genu. Naopak, u linie RPS7 p.V134F nedošlo ke změně v hladině p53 v porovnání s U2OS WT. Dále jsme sledovali hladinu proteinu p21, specifického inhibitoru CDK kináz. Protein p21 byl výrazně více exprimován u tranzientních buněčných modelů RPS7 a RPL11 o 81 % a 84 % ve srovnání s kontrolní siRNA. CRISPR-Cas9 modely DBA také prokázaly signifikantní upregulaci p21, a to o 68 % u linie s mutací RPS7 p.V134F a 77 % u haploinsuficientního modelu RPL11 ve srovnání s parentální buněčnou linií. Rovněž jsme se zaměřili na monitorování hladin proteinu MDM2, přirozeného inhibitoru p53. V případě siRNA modelů DBA RPS7 a RPL11 došlo k poklesu na 88 % a 87 % při porovnání s kontrolní siRNA. Nižší hladiny proteinu MDM2 byly také pozorovány u haploinsuficientního modelu RPL11 získaného pomocí technologie CRISPR-Cas9, kde dosahovaly pouze 87 % oproti buněčné linii U2OS WT. V případě modelu RPS7 p.V134F došlo ke významnému poklesu hladin MDM2 na 70 %. Při studiu dráhy Wnt, která má vyvažující účinek na následky ribozomálního stresu, jsme zkoumali hladinu transkripčního faktoru β -kateninu. U tranzientních modelů se sníženou hladinou proteinů RPS7 a RPL11 jsme zaznamenali výrazné zvýšení hladiny β -kateninu. Například, knockdown RPS7 způsobil nárůst o 91 %, zatímco v případě RPL11 byl nárůst o 69 %. Podobně byl pozorován shodný 75% nárůst u CRISPR-Cas9 modelů RPS7 p.V134F a RPL11 haploinsuficientního modelu. Dále jsme stanovili hladiny markerů jadérek, které se podílejí

na zpracování ribozomální RNA (rRNA), a to nukleolinu a nukleofosminu. Oba tyto proteiny nevykazovaly změny v expresi při srovnání mezi parentálními liniemi a buněčnými modely DBA. Snažili jsme se rovněž objasnit molekulární podstatu mírnějšího fenotypu DBA u modelu nesoucího mutaci RPS7 p.V134F. Při studiu dostupné literatury jsme narazili na zmínku, že protein RPS7 je integrován do malé podjednotky ribozomů prostřednictvím proteinu BCCIP. Proto jsme stanovili hladinu BCCIP, která byla signifikantně změněna pouze u buněčného modelu RPS7 p.V134F v porovnání s parentální buněčnou linií. V siRNA modelech nedošlo k podobným změnám. Lze tedy usuzovat, že protein RPS7 nesoucí mutaci p.V134F je méně efektivně začleňován do malé ribozomální podjednotky, což vede ke signifikantně zvýšené expresi BCCIP o 62 %. Akumulace buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu nás vedla k myšlence detekovat hladiny cyklinu D1 a dvou transkripčních faktorů E2F1 a c-Myc. Byla zjištěna snížená exprese cyklinu D1 u obou siRNA buněčných modelů, a to na 87 % oproti kontrole. Snížení hladiny cyklinu D1 bylo také pozorováno u RPS7 p.V134F buněčného modelu, a to na 89 % oproti parentální buněčné linii, a u RPL11 haploinsuficientního modelu na 88 %. Transkripční faktor E2F1 byl rovněž méně exprimován v siRNA buněčných modelech, kde došlo k poklesu na 88 % v případě RPS7 a na 87 % u RPL11 siRNA modelu. Snížená hladina E2F1 byla zaznamenána u RPL11 CRISPR-Cas9 buněčného modelu na 87 % a v případě modelu RPS7 p.V134F na 83 % oproti parentální buněčné linii. Snížení hladin ribozomálních proteinů RPS7 a RPL11 vyvolalo výrazný nárůst exprese transkripčního faktoru c-Myc. V případě transientního modelu RPS7 byl pozorován nárůst o 52 %, zatímco u odpovídajícího modelu RPL11 byl nárůst dvojnásobný oproti kontrolní siRNA. Haploinsuficientní model RPL11 vykazoval 60 % nárůst exprese transkripčního faktoru c-Myc oproti parentálním buněčným liniím. V případě modelu RPS7 p.V134F byl zaznamenán pokles hladiny c-Myc na 84 % oproti parentální buněčné linii.

A**B****C****D**

Obrázek 12: Rozdíly v expresi, stabilitě a posttranslačních modifikacích proteinů mezi DBA buněčnými modely. (A) Vlevo: Western bloty zobrazující hladiny MDM2, p53, p21, β -kateninu, c-Myc, E2F1, cyklinu D1, nukleolinu, nukleofosminu, BCCIP, RPS7 a β -aktinu. Vpravo: relativní exprese stejných proteinů v obou buněčných liniích normalizovaná vůči expresi β -aktinu. (B) Stabilita proteinů RPS7 a p21 po inhibici translace pomocí zvyšujících se koncentrací cykloheximidu u linií U2OS WT (RPS7-WT) a U2OS RPS7 p.V134F^{-/-} (RPS7-mut). (C) Celkový obsah ubikvitinu. (D) Western bloty ukazující hladiny posttranslačně modifikovaného p53 a expresi jeho následných cílových genů.

Lze si snadno představit, že protein RPS7 p.V134F, který není začleněn do ribozomů bude podléhat zvýšené degradaci prostřednictvím ubikvitin proteazomového systému. Zaměřili jsme se tedy na ověření této hypotézy nejen detekcí celkových ubikvitinovaných proteinů, ale také jsme stanovili stabilitu RPS7. Potvrdilo se že mutace RPS7 p.V134F výrazně snížila stabilitu proteinu. Zajímavé je, že protein p21 byl také méně stabilní u RPS7 p.V134F linie (na Obrázek 12 označeno RPS7-mut) než u U2OS WT (na Obrázek 12 označeno RPS7-WT). Navíc imunodetekce celkového množství ubikvitinovaných proteinů v obou buněčných liniích odhalila band přítomný u RPS7 p.V134F linie (na Obrázek 12 označeno RPS7-mut), ale ne u U2OS WT (na Obrázek 12 označeno RPS7-WT). Molekulová hmotnost tohoto bandu přibližně 25 kDa odpovídá molekulové hmotnosti očekávané pro ubikvitinovanou formu RPS7. Předpokládáme proto, že změny v translaci proteinu a/nebo začlenění proteinu RPS7 p.V134F do ribozomu aktivují cílenou ubikvitinaci a degradaci RPS7 p.V134F; to může v konečném důsledku snížit jeho buněčnou koncentraci a zhoršit tak nedostatek RPS7. Jelikož exprese celkového p53 nebyla ovlivněna pouze u modelu RPS7 p.V134F. Rozhodli jsme se blíže zaměřit na posttranslační modifikace proteinu p53 a expresi příslušných downstream genů. Nebyl však nalezen přesvědčivý důkaz o rozdílné aktivaci dráhy p53 v buněčných liniích RPS7 p.V134F oproti U2OS WT.



Obrázek 13: Detekce pre-ribosomální RNA metodou Northern blottingu v DBA buněčných modelech.

Analyzovali jsme také zrání prekurzorů pre-rRNA ve všech DBA modelech. Experimenty ukázaly akumulaci 45S, 41S, 30S a 26S pre-rRNA spolu se snížením hladin pre-rRNA 21S a 21S-C a 18S-E viz Obrázek 13. Tato data naznačují, že mutace v ribosomálních proteinech negativně ovlivňují zrání prekurzorů pre-rRNA, což může dále přispívat k patogenezi DBA.

9 Diskuze

9.1 *Vliv triterpenoidních pyridinů a pyrazinů na expresi proteinů souvisejících s apoptózou a buněčným cyklem*

V této části práce jsme testovali mechanismus účinku vybraných triterpenoidních pyridinů a pyrazinů. Látky 1b, 8, 21, 22, 23 a 24 způsobovaly selektivní apoptózu v buňkách CCRF-CEM, přičemž nejvýraznější účinek měly sloučeniny 8, 21 a 22 (296). Je dobře zdokumentováno, že mitochondrie představují hlavní buněčný cíl pro triterpeny. Proto byla provedena podrobná analýza členů rodiny Bcl-2, kteří představují klíčové regulátory mitochondriální cesty apoptózy. Nejprve jsme se zaměřili na multidomérové proapoptotické proteiny Bax a Bid, které ovlivňují permeabilitu mitochondriální membrány. Všechny sloučeniny způsobily významnou regulaci proteinů Bax i Bid (296). Dále jsme studovali vliv sloučenin na expresi vybraných proteinů patřících do podskupiny "BH3-only" s antagonizující funkcí vůči anti-apoptotickým proteinům z rodiny Bcl-2. Vliv sloučenin na expresi Bid a Bx jsme zkoumali na základě výsledků studie. Zjistili jsme, že 8, 21 a 22 dramaticky zvyšují expresi Noxa proteinu, a navíc všechny sloučeniny významně zvýšily expresi Bim. Nakonec jsme zkoumali vliv sloučenin na hlavní exekuční kaspasy-3/7 a PARP, jako zástupce jejich downstream substrátů. Zjistili jsme zřejmou aktivaci kaspázy-3/7 vyvolanou látkami 8, 21 a 22, což dokládá snížená hladina prekursorových forem a přítomnost jejich aktivních forem a dobře odpovídající štěpení PARP. Všechny tyto výsledky korelují s měřením Annexinu V viz Příloha II (296).

9.2 *Reporterové buněčné modely dvou majoritních izoforem c-Myc a faktory regulující expresi p64 a p67*

Studie se zaměřila na vytvoření reporterových buněčných linií pro sledování expresí dvou majoritních izoforem c-Myc, p64 a p67, s minimálním zásahem do genetického lokusu. Kombinací technologií NanoBiT a CRISPR/Cas9 byly vytvořeny buněčné linie s HiBiT tagem, umožňujícím sledování exprese obou izoforem pomocí nového reporteru. Pro editaci buněčných linií byla použita gRNA nasedající blízko požadovaného místa vložení HiBiT tagu, tedy v oblasti stop kodonu c-Myc, a také ssODN templát pro homologní opravu DNA nesoucí sekvenci vkládaného tagu. Metoda umožnila sledování dynamické exprese c-Myc izoforem pomocí NanoLuc luciferázy, která vzniká

spojením HiBiT s katalytickou podjednotkou LgBiT. HiBiT blotting potvrdil správnou integraci tagu a specifickou značení obou izoform c-Myc. Klonální linie byly generovány z původních heterogenních buněčných poolů pomocí limitního ředění. Screenování přítomnosti luminiscence identifikovalo klony s výrazně zlepšenou luminiscencí oproti odpovídajícím buněčným poolům. Vybrány byly dva klony (p67 c-Myc a p64 c-Myc) pro další charakterizaci.

Dále byla provedena podrobná charakterizace obou reporterů pro c-Myc. Za použití siRNA byla specificky snížena exprese genů, o kterých je známo, že ve značné míře ovlivňují hladinu proteinu c-Myc. K validaci reporterových linií jsme celkem použili 18 siRNA z nichž 16 lze rozčlenit na čtyři skupiny dle funkcí jejich cílových genů. První testovanou siRNA byla zvolena siRNA cílící přímo c-Myc a dle očekávání jejím vlivem došlo k rapidnímu snížení hladin obou izoform c-Myc.

První pomyslnou skupinou je osm genů ovlivňujících post-translační modifikace proteinu c-Myc. Stabilita c-Myc je značně ovlivněna fosforylací Thr58 a Ser62. Přičemž c-Myc s fosforylovaným Thr58 je označen k degradaci prostřednictvím ubikvitin proteazomového systému. Naopak fosforylace Ser62 vede ke stabilizaci c-Myc, který je jinak považován za velmi nestabilní protein s poločasem rozpadu pouhých 30 minut (319). Proteozomální degradace c-Myc je z velké míry řízena ubikvitin ligázou FBXW7. FBXW7 je substrátovou rozpoznávací složkou E3 ubikvitin-protein ligázového komplexu SCF (SKP1 – cullin – F-box protein), který zprostředkovává ubikvitinaci a následnou proteozomální degradaci cílových proteinů. FBXW7 rozpoznává a váže fosforylovaná místa tzv. fosfodegrony v cílových proteinech a následně je přivádí do komplexu SCF k ubikvitinaci (320). Mezi identifikované substráty patří např. cyklin-E, JUN, c-Myc, NOTCH1, NOTCH2, MCL1, RICTOR a pravděpodobně také PSEN1. Mutace v tomto genu byly zjištěny v buněčných liniích nádorů vaječníků a prsu, což naznačuje možnou roli tohoto genu v patogenezi onkologických onemocnění (321). Vyřazení FBXW7 prostřednictvím siRNA způsobilo očekávaný razantní nárůst množství proteinu obou izoform c-Myc. Proces degradace proteinů může být během průběhu zvrácen například odstraněním ubikvitinů. Touto funkcí je známá USP28, deubikvitináza zapojená do kontrolního bodu reakce na poškození DNA a stability protoonkogenu c-Myc (322). Podílí

se na apoptóze vyvolané poškozením DNA tím, že specificky deubikvitinuje proteiny dráhy poškození DNA. Kromě toho deubikvitinuje c-Myc v nukleoplazmě, což vede k zabránění jeho degradace proteasomem. Nadměrná exprese tohoto genu byla pozorována u několika typů nádorů. Nízká exprese USP28 by tedy měla vést ke snížení hladiny c-Myc. To jsme ovšem nepozorovali ani u jedné z izoform c-Myc po knockdownu USP28. Příčinou může být pravděpodobně nedostatečné snížení exprese USP28. Na fosfodegrony cílí nejen kinázy a fosfatázy, ale také izomerázy, mezi něž řadíme PIN1. PIN1 je peptidyl-prolyl cis/trans izomeráza (PPIáza) vázající na specifické pSer/Thr-Pro motivy a izomerizuje je. Tím, že vyvolává konformační změny v podskupině fosforylovaných proteinů, působí jako molekulární přepínač v mnoha buněčných procesech (323). Konformační regulace katalyzovaná touto PPIázou má zásadní vliv na klíčové proteiny zapojené do regulace buněčného růstu, genotoxických a jiných stresových reakcí, imunitní odpovědi, indukce a udržování pluripotence, vývoje zárodečných buněk, diferenciace neuronů a přežití. Tento enzym hraje také klíčovou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby a mnoha druhů nádorů (324). Při snížení hladiny izomerázy PIN1 jsme pozorovali také pokles množství proteinu c-Myc. BRD4 má mnoho funkcí. Rozpoznává a váže acetylované histony, hraje klíčovou roli v přenosu epigenetické paměti napříč buněčnými děleními a v regulaci transkripce. Zůstává spojen s acetylovaným chromatinem během celého buněčného cyklu a zajišťuje epigenetickou paměť pro postmitotickou transkripci genů G₁ fáze tím, že zachovává stav acetylovaného chromatinu a udržuje chromatinovou strukturu (325). Během interfáze se spojuje s komplexem P-TEFb a rekrutuje ho k promotorům. BRD4 rovněž přímo ovlivňuje fosforylaci Thr58, čímž podporuje degradaci c-Myc (326). V souladu s tímto faktem byl po downregulaci BRD4 zaznamenán nárůst exprese obou izoform c-Myc.

Dosud je známo jen omezené množství kináz, které jsou schopné pozitivně ovlivnit stabilitu c-Myc. Do této skupiny náleží ERK1, ERK2, Aurora A a Aurora B. MAPK1/ERK2 a MAPK3/ERK1 jsou serin/treoninové kinázy, které působí jako základní součásti signální dráhy MAP kináz. MAP kinázy, známé také jako kinázy regulované extracelulárním signálem (ERK), fungují jako integrační bod pro mnoho biochemických signálů a podílejí se na široké škále buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace, regulace transkripce a vývoje. Aktivace ERK vyžaduje jejich fosforylaci předřazenými kinázami. Po

aktivaci se ERK přemísťuje do jádra stimulovaných buněk, kde fosforyluje jaderné cíle (327). Pro ERK již bylo objeveno přibližně 160 substrátů. Mnohé z těchto substrátů jsou lokalizovány v jádře a zřejmě se podílejí na regulaci transkripce. Další substráty se však nacházejí v cytosolu i v jiných buněčných organelách a ty jsou zodpovědné za procesy, jako je translace, mitóza a apoptóza. Mezi substráty patří transkripční faktory (například c-Myc, ATF2, BCL6, ELK1, ERF, FOS), cytoskeletální prvky (například CANX, CTTN, GJA1, MAP2, MAPT, PXN), regulátory apoptózy (například BAD, BTG2, CASP9, DAPK1, MCL1), regulátory translace (například EIF4EBP1 a FXR1) a různé další molekuly související se signalizací. Proteinové kinázy (jako RAF1, RPS6KA/RSK, SYK, MKNK/MNK, MAPKAPK) a fosfatázy (jako např. DUSP4, DUSP6 nebo DUSP16) jsou dalšími substráty, které umožňují šíření signálu MAPK/ERK na další cytosolické a jaderné cíle (327). O ERK1 a ERK2 je známo, že stabilizují c-Myc fosforylací Ser62 (105). Po snížení exprese ERK1 a ERK2 vyvolaném příslušnými siRNA byl sledován pokles množství obou izoform c-Myc. Aurora A a Aurora B kinázy se podílejí na regulaci uspořádání a segregaci chromozomů během mitózy a meiózy prostřednictvím spojení s mikrotubuly. Aurora A je mitotická serin/treoninová kináza, která se podílí na regulaci progresu buněčného cyklu (328). Během mitózy se spojuje s centrozomem a mikrotubuly vřeténka a hraje klíčovou roli při sestavení mitotického vřeténka, duplikaci centrozomu, separaci centrozomů a cytokineze. Aurora B je rovněž serin/treonin proteinkináza, součást chromozomálního komplexu, který působí jako klíčový regulátor mitózy (328). Komplex má zásadní funkce při zajišťování správného uspořádání a segregace chromozomů a je nezbytný pro stabilizaci mikrotubulů a sestavení vřeténka indukované chromatinem. Aurora B se podílí na připojení mikrotubulů vřeténka ke kinetochorům a je klíčovým regulátorem pro nástup cytokineze během mitózy, je nutná pro sestavení centrálního vřeténka (329). Obě kinázy fosforylují řadu cílových proteinů, včetně c-Myc. Nízká hladina Aurora A kinázy nezpůsobila výrazné změny, jinak tomu ovšem bylo v případě Aurora B, jejíž downregulace způsobila pokles hladin obou izoform c-Myc.

Druhá skupina je tvořena dvojicí transkripčních faktorů přímo řídících expresi c-Myc. STAT3 je členem rodiny proteinů STAT. V reakci na cytokiny a růstové faktory jsou členové rodiny STAT fosforylováni kinázami spojenými s receptory a poté tvoří homo- nebo heterodimery, které se přemísťují do buněčného jádra, kde působí jako aktivátory

transkripce. Tento protein zprostředkovává expresi řady genů v reakci na buněčné podněty, a hraje tak klíčovou roli v mnoha buněčných procesech, jako je buněčný růst, apoptóza a regulace odpovědi hostitele na virové a bakteriální infekce (330). Cytoplazmatický STAT3 potlačuje autofagii tím, že inhibuje aktivitu PKR (331). Snížení hladiny STAT3 vedlo k poklesu exprese obou izoform c-Myc při srovnání s příslušnými kontrolami, což odpovídá poznatku, že STAT3 řídí expresi námi studovaného genu. β -katenin je klíčovou složkou kanonické signální dráhy Wnt. V nepřítomnosti Wnt ligandu tvoří komplex s AXIN1, AXIN2, APC, CSNK1A1 a GSK3 β , který podporuje fosforylaci a ubikvitinaci β -kateninu a jeho následnou degradaci proteasomem. V přítomnosti ligandu Wnt není β -katenin ubikvitinován a hromadí se v jádře, kde působí jako koaktivátor pro transkripční faktory rodiny TCF/LEF, což vede k aktivaci genů reagujících na Wnt. V případě, že je β -katenin v jádře, je jeho aktivace ukončena (332). Působí jako negativní regulátor soudržnosti centrozomů. Podílí se na regulaci buněčné adheze jako součást adhezního komplexu E-cadherin:catenin, které tvoří adherentní spoje. Adherentní spoje jsou nezbytné pro vytváření a udržování vrstev epiteliálních buněk tím, že regulují růst buněk a adhezi mezi nimi. β -katenin také ukotvuje aktinový cytoskelet a může být zodpovědný za přenos signálu kontaktní inhibice, který způsobuje, že se buňky přestanou dělit, jakmile je epitelová vrstva dokončena (333). V souvislosti s siRNA mediovaným snížením exprese jsme pozorovali snížení exprese pouze u p64 c-Myc izoformy. Tento efekt je zcela novým poznatkem, přičemž se domníváme, že rozdílná regulace p64 a p67 c-Myc souvisí s ovlivněním kontaktní inhibice, které β -katenin rovněž zprostředkovává.

Dále jsme se zaměřili na studium genů, o kterých bylo uvedeno, že regulují expresi námi studovaných izoform c-Myc. Dosud byly popsány pouze tři geny mrt1, mTOR a PKR, přičemž siRNA je komerčně dostupná pouze vůči dvěma posledně jmenovaným. PKR je interferony indukovaná dsRNA-dependentní serin/treonin-proteinkináza, která fosforyluje eIF-2- α a hraje klíčovou roli ve vrozené imunitní odpovědi na virovou infekci. Podílí se také na regulaci přenosu signálu, apoptózy, buněčné proliferace a diferenciace, fosforyluje další substráty, včetně p53, PPP2R5A, DHX9, ILF3, IRS1 (334). Kromě serin/treonin-proteinkinázové aktivity má také tyrosin-proteinkinázovou aktivitu a při poškození DNA indukuje degradaci CDK1. Buď jako adaptorový protein a/nebo prostřednictvím své kinázové aktivity může regulovat různé signální dráhy (p38 MAPK,

NF- κ B a inzulínovou signální dráhu) a transkripční faktory (JUN, STAT1, STAT3, IRF1, ATF3), které se podílejí na expresi genů kódujících prozánětlivé cytokiny a interferony. O PKR je známo, že specifické snížení její exprese způsobuje overexpresi p67 c-Myc, což jsme v souladu s tím pozorovali (331). Tím se také prokázala funkčnost našeho reporterového systému z hlediska sledování aktivity p64 a p67 c-Myc. mTOR, serin/treoninová proteinkináza, která je ústředním regulátorem buněčného metabolismu, růstu a přežití v reakci na hormony, růstové faktory, živiny, energii a stresové signály. mTOR přímo nebo nepřímo reguluje fosforylaci nejméně 800 proteinů. Funguje jako součást dvou strukturně a funkčně odlišných signálních komplexů mTORC1 a mTORC2 (mTOR komplex 1 a 2) (335). Aktivovaný mTORC1 zvyšuje syntézu proteinů fosforylací klíčových regulátorů translace mRNA a syntézy ribozomů. Patří sem také signální kaskáda mTORC1, která řídí MiT/TFE faktory TFEB a TFE3. V přítomnosti živin zprostředkovává fosforylaci TFEB a TFE3, čímž podporuje jejich retenci v cytosolu a inaktivaci. Při nedostatku živin nebo lysozomálním stresu inhibice mTORC1 vyvolává defosforylaci a jadernou translokaci TFEB a TFE3, čímž podporuje jejich aktivitu transkripčních faktorů. Jako součást komplexu mTORC2 může mTOR regulovat další buněčné procesy včetně přežívání a organizace cytoskeletu. Reguluje osteoklastogenezi úpravou exprese izoform C/EBP. Tento protein působí jako cíl pro zastavení buněčného cyklu a imunosupresivní účinky komplexu FKBP12-rapamycin. Inhibitory mTOR se používají při transplantacích orgánů jako imunosupresiva (103). Inhibitor mTOR, rapamycin způsobuje deregulaci poměru p67:p64 ve prospěch p67 c-Myc (336). Nebylo dosud ovšem známé, jaká změna nastane po použití siRNA knockdownu mTOR. Během našeho experimentu došlo k současnému snížení obou hladin p64 a p67 c-Myc ve srovnání s kontrolní skupinou. Inhibice kinázové aktivity pravděpodobně má jiné následky než snížení množství této kinázy.

V rámci validačního experimentu jsme do poslední skupiny zařadili geny, jejichž exprese je přímo regulována studovaným transkripčním faktorem. Konkrétně se jedná o geny kódující ribozomální proteiny, mezi něž patří RPS7 a RPS19, tvořící malou ribozomální podjednotku, a RPL5 společně s RPL11, strukturní složky velké ribozomální podjednotky. Tyto podjednotky se společně skládají ze čtyř druhů rRNA a přibližně 80 strukturně odlišných proteinů (42,248). RPS19 je součástí podjednotky 40S. Patří do

rodiny ribozomálních proteinů S19E a nachází se v cytoplazmě. Mutace v tomto genu způsobují u části pacientů Diamondovu-Blackfanovu anémii, erytroblastopenii charakterizovanou chybějícími nebo sníženými erytroidními prekurzory. To naznačuje možnou funkci tohoto genu při diferenciaci a proliferaci erytroidní linie, kromě jeho ribozomální funkce. Byla pozorována vyšší hladina exprese tohoto genu v některých primárních karcinomech tlustého střeva (337,338). RPS7 je také součástí podjednotky 40S a náleží do rodiny ribozomálních proteinů S7E. Nachází se v cytoplazmě a jeho další funkce nejsou blíže specifikovány (17,339). RPL5 a RPL11 jsou součástí 5S RNP částic a také nezbytnými prvky velké podjednotky, která je nutná pro tvorbu a zrání rRNA. Spojuje také biogenezi ribozomů s aktivací p53. Jako součást 5S RNP se RPL5 a RPL11 hromadí v nukleoplazmě a při narušení biogeneze ribozomů inhibují MDM2, čímž zprostředkovávají stabilizaci a aktivaci p53. Také plní funkci inhibitorů tumorigeneze prostřednictvím aktivace nádorových supresorů a snížení exprese onkoproteinů. Mutace v těchto genech byly také identifikovány u pacientů s Diamond-Blackfanovou anémií. Je dobře známo, že RPL11 a RPL5 nejenže jsou regulovány prostřednictvím c-Myc, ale zpětně ovlivňují i expresi tohoto onkogenu prostřednictvím degradace jeho mRNA (340). Při snížení exprese jmenovaných ribozomálních proteinů jsme docílili výrazného zvýšení exprese c-Myc, a to především p64 izoformy. Vliv ribozomálních proteinů a poměr exprese p64:p67 nebyl dosud popsán.

Výsledky naznačují, že reportery umožňují spolehlivé sledování endogenní exprese izoform c-Myc a jsou vhodné pro další experimenty včetně vysokokapacitního screeningu k odhalení látek modulujících hladiny tohoto těžko regulovatelného transkripčního faktoru. Dále byly identifikovány nové geny (β -katenin, RPS7, RPS19, RPL5, RPL11) diferenciaciálně regulující expresi p64 a p67 c-Myc. Porovnání dat získaných pomocí NanoLuc eseje a HiBiT blottingu ukázalo srovnatelnost výsledků obou metod po normalizaci na viabilitu nebo hladinu proteinu β -aktinu.

Studie se dále zaměřila na optimalizaci NanoLuc eseje pro vysokokapacitní testování látek. Vybrané látky byly testovány s cílem najít vhodného referenčního antagonistu pro HTS. Výběr zahrnoval inhibitor heterodimerizace c-Myc s Max (10074-G5) (341), inhibitory BET proteinů (JQ1, OTX015) (342,343), nekompetitivní inhibitor

MAPK signální dráhy (PD98059) (344) a glukokortikoid dexametazon (345). Tyto látky byly testovány ve formátu 384jamkových kultivačních panelů a jejich aktivita byla analyzována pomocí NanoLuc esejí. Ze získaných dat jsme zvolili nejen vhodnou kontrolní látku, kterou byla 10074-G5, ale také další parametry pro primární screening – dobu inkubace a koncentraci testovaných látek.

9.3 *Studium změny fenotypu v důsledku haploinsuficience ribozomálních proteinů RPS7 a RPL11*

Studie zaměřená na podrobný výzkum DBA fenotypu využila dva typy buněčných modelů. První skupinu tvořily buňky s genomem modifikovaným pomocí technologie CRISPR-Cas9, konkrétně byla analyzována jednobodová mutace RPS7 p.V134F (viz Příloha III (17)) a haploinsuficience RPL11, obě deficiencie jsou spojené s Diamond-Blackfanovou anémií. Druhým modelem byl systém s tranzientně sníženou expresí genů RPS7 a RPL11 pomocí siRNA. Oba modely byly vytvořeny na buněčných liniích lidského osteosarkomu U2OS.

První fáze výzkumu zahrnovala modifikaci buněčných linií pomocí elektroporace ribonukleovými komplexy obsahujícími gRNA a Cas9 nukleázu, čímž vznikly polyklonální populace. Následovala izolace jednotlivých monoklonálních linií a genotypizace pro získání uniformního buněčného modelu. V primárním screeningu bylo použito restriktivního profilování, zatímco sekundární screening zahrnoval PCR amplifikaci modifikovaných lokusů a Sangerovo sekvenování. Výsledky ukázaly, že CRISPR-Cas9 technologií byly úspěšně vytvořeny specifické buněčné modely pro studium fenotypů spojených s haploinsuficiencí v genech RPS7 a RPL11. Pro srovnání byly využity i buněčné linie s tranzientně sníženou expresí pomocí siRNA.

Další fáze studie se zaměřila na sledování rychlosti syntézy nascentních proteinů. Zkoumané buněčné linie byly vystaveny deficitu methioninu, a poté byl použit analog L-azidohomoalanin, jehož inkorporace do proteinů byla detekována pomocí protilátky a průtokové cytometrie. Výsledky ukázaly předpokládané celkové snížení proteosyntézy v DBA buněčných modelech (243). Následně byl zkoumán vliv haploinsuficience zvolených RP na proliferaci buněk. Test viability MTS a analýza buněčného cyklu prokázaly významný pokles proliferace a akumulaci buněk v G₀/G₁ fázi u buněčných modelů s deficiencí RPS7 a RPL11 (346). Studie též zaznamenala zvýšenou syntézu DNA, pravděpodobně způsobenou zvýšeným oxidativním stresem (347).

Dále jsme se zaměřili na charakterizaci buněčných modelů Diamond-Blackfanovy anémie (DBA) s důrazem na signální dráhy spojené s ribozomálním stresem (348).

Zjištění, že buněčné linie modelující DBA vykazují sníženou proliferaci s akumulací v G_0/G_1 fázi buněčného cyklu, vedlo k detailnějšímu zkoumání signálních drah spojených s transkripčním faktorem p53, který přímo souvisí s ribozomálním stresem. Pomocí metody western blottingu bylo zaznamenáno zvýšení hladiny p53 proteinu při snížené expresi genů RPS7 a RPL11. Tento nárůst byl pozorován u buněčných modelů s tranzientním knockdownem pomocí siRNA i u RPL11 modelu vytvořeného technologií CRISPR-Cas9. Dále byly analyzovány hladiny proteinu p21, MDM2, a transkripčního faktoru β -kateninu. Výsledky ukázaly významné změny v těchto proteinech u buněčných modelů DBA. Nárůst hladiny p21 a zároveň snížení MDM2 naznačuje aktivaci p53 dráhy. Také bylo zaznamenáno zvýšení hladiny β -kateninu, což souvisí s dráhou Wnt, jež pravděpodobně má vyvažující účinek na ribozomální stres (349,350).

Výzkum také upřesnil molekulární podstatu mírnějšího fenotypu DBA u modelu nesoucího mutaci RPS7 p.V134F. Bylo prokázáno, že mutace snižuje stabilitu proteinu RPS7 a aktivuje ubikvitinaci, což v konečném důsledku může vést k nedostatku RPS7 viz Příloha III (17,351,352). Analýza post-translačních modifikací proteinu p53 a downstream genů nenašla přesvědčivé důkazy o rozdílné aktivaci dráhy p53 v buněčných liniích RPS7 p.V134F oproti U2OS WT. Nebylo tedy přímo zjištěno, jakým, na p53 nezávislým způsobem, dochází k indukci p21 u RPS7 p.V134F modelu.

Závěrem bylo ukázáno, že mutace v ribozomálních proteinech negativně ovlivňují zrání prekurzorů pre-rRNA, což přispívá k patogenezi DBA (353).

Celkově lze konstatovat, že studie úspěšně využila CRISPR-Cas9 technologii k vytvoření buněčných modelů pro podrobné zkoumání DBA fenotypu, s důrazem na geny RPS7 a RPL11, a identifikovala několik důležitých aspektů, včetně vlivu na syntézu proteinů a proliferaci sníženou ribozomálním stresem.

10 Závěr

Tato práce sestává ze tří výzkumných záměrů, které mají společného jmenovatele známý onkogen c-Myc. Během podrobné charakterizace biologických účinků od přírodních látek derivovaných triterpenů jsme pozorovali spojitost mezi jejich proapoptotickým protinádorovým účinkem a sníženou hladinou c-Myc. Jelikož se naše pracoviště od svého počátku zabývá vývojem protinádorové léčby, včetně triterpenů a disponuje robotickou platformou pro vysokokapacitní screening, bylo dalším krokem vytvoření reporterové buněčné linie monitorující hladinu transkripčního faktoru c-Myc. Při designu této linie jsme pečlivě zvolili postup, při kterém byl zachován lokus c-Myc jen s drobnou úpravou, kterou bylo vnesení značky na C-koncovou oblast proteinu prostřednictvím CRISPR/Cas9. Zachována tak zůstala fyziologická exprese c-Myc, a navíc jsme získali zcela unikátní možnost sledovat dynamiku exprese dvou hlavních izoform c-Myc. Oba c-Myc reporterové systémy byly podrobně popsány a validovány. Pro účely vysokokapacitního screeningu byly optimalizovány podmínky a zvolen byl také referenční antagonist, látka 10074-G5. Nyní již provádíme vysokokapacitní primární screening komerčně dostupných knihoven chemických látek, přičemž našim cílem je vyfiltrovat látky, které budou snižovat proproliferační funkce c-Myc na úkor těch podporujících quiscenci nebo buněčnou smrt. Tedy látky zvyšující expresi p67 c-Myc na úkor p64 c-Myc. Během validace c-Myc reporterových linií jsme odhalili další regulátory exprese těchto izoform. Kromě známých kináz mTOR a PKR byl seznam rozšířen o transkripční faktor β -katenin a ribozomální proteiny.

Třetí pilíř této práce se zabývá právě ribozomální biogenezí, která je z podstatné části řízena právě c-Myc. Poslední část práce dokumentuje patofyziologické projevy ribozomálního stresu při haploinsuficienci RPS7 a RPL11. Pro tento účel jsme vytvořili dva buněčné modely první za použití siRNA knockdownu ke snížení exprese ribozomálních genů na polovinu oproti kontrole. Druhým bylo vyřazení exprese jedné z alel RPL11 a v případě RPS7 vnesení konkrétní unikátní bodové mutace za účelem popsání jejich vlivů na fyziologii buňky, prostřednictvím CRISPR/Cas9. Lze konstatovat, že oba postupy vedoucí k získání buněčných modelů s haploinsuficiencí ribozomálních proteinů vedly k patofyziologickým projevům asociovaným s Diamond-Blackfanovou

anémii a ribozomálním stresem. V případě dalšího výzkumu jsou mezi sebou nahraditelné modely vytvořené za použití siRNA knockdownu a vyřazení jedné alely při studiu kompletní ztráty exprese jedné z alel genu zájmu. Pokud ale chceme věrohodný buněčný model sloužící k popsání vlivu určitých mutací, má nezastupitelné místo CRISPR/Cas9 technologie.

Hlavním cílem naší práce bylo komplexně představit důvody, proč gen c-Myc hraje tak zásadní roli při určování osudu buněk. Vysvětlili jsme, jak exprese tohoto onkogenu může produkovat pět různých proteinů, z nichž každý má jedinečné vlastnosti a funkce. Tyto proteiny mají odlišnou strukturu, jsou lokalizovány v různých buněčných kompartmentech a plní jedinečné role Obrázek 3. Toto genomické uspořádání zdůrazňuje mnohostrannou povahu exprese a funkcí c-Myc.

Zabývali jsme se jedinečnými vlastnostmi genu c-Myc v lidském genomu a zaměřili jsme se na dvě dobře známé, ale kontroverzní role: stimulaci progresu buněčného cyklu a podporu zastavení růstu a apoptózy. Pečlivý výzkum těchto rolí může poskytnout informace o tom, proč je pro regulaci normální funkce c-Myc během buněčného růstu a zástavy nezbytná exprese pěti různých izoform proteinu c-Myc. Složitě regulační prostředí obklopující buněčnou dynamiku zprostředkovanou c-Myc je zdůrazněno různými mechanismy řídicími syntézu různých izoform c-Myc, které vykazují různé schopnosti aktivovat a regulovat transkripci.

Předchozí výzkum ukázal, že u nádorových buněčných linií s deregulovanou aktivitou c-Myc se často vyskytují poruchy rovnováhy mezi dvěma specifickými izoformami proteinu c-Myc, p64 a p67. Tyto nerovnováhy v poměru izoform mohou přímo přispívat ke ztrátě kontroly nad buněčným růstem, což je běžný rys nádorového bujení. Pochopení molekulárních složitostí, které určují, jak se c-Myc podílí na regulaci buněčného cyklu, je vzhledem k časté deregulaci u lidských nádorů zásadní. Vztahy mezi různými izoformami proteinu c-Myc, zejména specifický vliv na kontrolu a zastavení buněčného cyklu, otevírají nové možnosti terapeutických zásahů. Definitivní pochopení komplexní souhry mezi c-Myc, apoptózou a progresí buněčného cyklu by mohlo významně přispět k řešení celé řady maligních onemocnění.

Závěrem lze říci, že probíhající snahy o pochopení regulačních mechanismů, které jsou základem kontroly buněčného cyklu zprostředkovaného c-Myc, nabízejí slibné vyhlídky na inovativní terapeutické strategie proti nádorům souvisejícím s c-Myc (97). Při navrhování zásahů je však nezbytné vzít v úvahu dvojí roli c-Myc, tj. podporu apoptózy a podporu přežívání a diferenciaci buněk. Další odhalování složitosti funkce c-Myc umožní výzkumníkům hlouběji pochopit, jak tento transkripční faktor přispívá k biologii onkologických onemocnění. Domníváme se, že nejúčinnější terapeutický potenciál spočívá v obnovení rovnováhy mezi p64 a p67, jak ukázaly studie, které zahrnovaly inhibici PKR a translace zprostředkované IRES (100,101,101,331,334). Optimální využití tohoto regulačního mechanismu bude vyžadovat další výzkum dalších proteinů, které mohou tuto rovnováhu ovlivňovat. Látky, které modulují aktivitu PKR, translaci zprostředkovanou IRES a další relevantní proteiny, by mohly mít zásadní význam pro cílenou léčbu agresivních malignit. Rozšíření spektra modulátorů c-Myc bude mít zásadní význam pro identifikaci alternativních strategií v případech rezistence a umožní personalizovanou léčbu nádorů různého původu.

11 Přehled použité literatury

1. Amati B, Frank SR, Donjerkovic D, Taubert S. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Mar 21;1471(3):M135-145.
2. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006 Aug;16(4):253–64.
3. Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, et al. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*. 2001 Mar 29;20(14):1688–702.
4. Xiao L, Wang Y, Liang W, Liu L, Pan N, Deng H, et al. LRH-1 drives hepatocellular carcinoma partially through induction of c-myc and cyclin E1, and suppression of p21. *Cancer Manag Res*. 2018;10:2389–400.
5. Zhang J, Song N, Zang D, Yu J, Li J, Di W, et al. c-Myc promotes tumor proliferation and anti-apoptosis by repressing p21 in rhabdomyosarcomas. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):4089–94.
6. Gruszka R, Zakrzewski K, Liberski PP, Zakrzewska M. mRNA and miRNA Expression Analyses of the MYC/E2F/miR-17-92 Network in the Most Common Pediatric Brain Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 7;22(2).
7. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1849(5):506–16.
8. Spencer CA, Groudine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;56:1–48.
9. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Jan;19(1):23–36.
10. c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment. Vol. 21. England; 2023.
11. Chanvorachote P, Sriratanasak N, Nonpanya N. C-myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target. *Anticancer Res*. 2020 Feb;40(2):609–18.
12. Di Y, Jing X, Hu K, Wen X, Ye L, Zhang X, et al. The c-MYC-WDR43 signalling axis promotes chemoresistance and tumour growth in colorectal cancer by inhibiting p53 activity. *Drug Resist Updat*. 2023 Jan;66:100909.
13. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):119–28.
14. McMahan SB. MYC and the control of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Jul 1;4(7):a014407.
15. Kotulova J, Lonova K, Kubickova A, Vrbkova J, Kourilova P, Hajduch M, et al. 2-CI-IB-MECA regulates the proliferative and drug resistance pathways, and facilitates chemosensitivity in pancreatic and liver cancer cell lines. *Int J Mol Med*. 2022 Mar;49(3):31.
16. Yoshida GJ. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jul 27;37(1):173.
17. Kubickova A, Maceckova Z, Vojta P, Ondra M, Volejnikova J, Koralkova P, et al. Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress. *Blood Cells Mol Dis*. 2022 Nov;97:102690.
18. Macečková Z, Kubíčková A, Sanctis JBD, Hajdúch M. Effect of Glucocorticosteroids in Diamond-Blackfan Anaemia: Maybe Not as Elusive as It Seems. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 8;23(3).
19. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):313–7.

20. Llombart V, Mansour MR. Therapeutic targeting of 'undruggable' MYC. *EBioMedicine*. 2022 Jan;75:103756.
21. Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet*. 1986;20:361–84.
22. Lüscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part I. *Myc. Genes Dev*. 1990 Dec;4(12A):2025–35.
23. Ryan KM, Birnie GD. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J*. 1996 Mar 15;314 (Pt 3)(Pt 3):713–21.
24. Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 1996;68:109–82.
25. Hann SR, Eisenman RN. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol*. 1984 Nov;4(11):2486–97.
26. Ramsay G, Evan GI, Bishop JM. The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Dec;81(24):7742–6.
27. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251(4998):1211–7.
28. Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*. 1990 Nov 23;250(4984):1149–51.
29. Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*. 1991 Jan 11;251(4990):186–9.
30. Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*. 1993 Jan 29;72(2):233–45.
31. Amin C, Wagner AJ, Hay N. Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. *Mol Cell Biol*. 1993 Jan;13(1):383–90.
32. Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*. 1992 Oct 1;359(6394):426–9.
33. Kato GJ, Barrett J, Villa-Garcia M, Dang CV. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol*. 1990 Nov;10(11):5914–20.
34. Gu W, Bhatia K, Magrath IT, Dang CV, Dalla-Favera R. Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science*. 1994 Apr 8;264(5156):251–4.
35. Maheswaran S, Lee H, Sonenshein GE. Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1994 Feb;14(2):1147–52.
36. Grandori C, Mac J, Siëbelt F, Ayer DE, Eisenman RN. Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. *EMBO J*. 1996 Aug 15;15(16):4344–57.
37. Boyd KE, Farnham PJ. Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements. *Mol Cell Biol*. 1997 May;17(5):2529–37.
38. O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W, Ren X, Mateyak MK, et al. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):12563–73.
39. Hölzel M, Kohlhuber F, Schlosser I, Hölzel D, Lüscher B, Eick D. Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. *EMBO Rep*. 2001 Dec;2(12):1125–32.
40. Choi H, Jackson NL, Shaw DR, Emanuel PD, Liu YL, Tousson A, et al. mrtI-A translation/localization regulatory protein encoded within the human c-myc locus and distributed throughout the endoplasmic and nucleoplasmic reticular network. *J Cell Biochem*. 2008 Nov 1;105(4):1092–108.
41. Arabi A, Wu S, Ridderstråle K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):303–10.

42. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol.* 2005 Mar;7(3):311–8.
43. Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature.* 2003 Jan 16;421(6920):290–4.
44. Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development.* 2003 Jun;130(12):2793–808.
45. Shio Y, Donohoe S, Yi EC, Goodlett DR, Aebersold R, Eisenman RN. Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function. *EMBO J.* 2002 Oct 1;21(19):5088–96.
46. Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ.* 1997 Oct;8(10):1039–48.
47. Sakamuro D, Eviner V, Elliott KJ, Showe L, White E, Prendergast GC. c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene.* 1995 Dec 7;11(11):2411–8.
48. Blume SW, Miller DM, Guarcello V, Shrestha K, Meng Z, Snyder RC, et al. Inhibition of tumorigenicity by the 5'-untranslated RNA of the human c-myc P0 transcript. *Exp Cell Res.* 2003 Aug 1;288(1):131–42.
49. Marin MC, Hsu B, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ. The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp Cell Res.* 1995 Apr;217(2):240–7.
50. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2424–33.
51. Klein G. Dysregulation of lymphocyte proliferation by chromosomal translocations and sequential genetic changes. *Bioessays.* 2000 May;22(5):414–22.
52. Ge K, Duhadaway J, Sakamuro D, Wechsler-Reya R, Reynolds C, Prendergast GC. Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int J Cancer.* 2000 Feb 1;85(3):376–83.
53. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995 Aug 11;82(3):349–52.
54. Fearhead HO, McCurrach ME, O'Neill J, Zhang K, Lowe SW, Lazebnik YA. Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells. *Genes Dev.* 1997 May 15;11(10):1266–76.
55. Armstrong DK, Isaacs JT, Ottaviano YL, Davidson NE. Programmed cell death in an estrogen-independent human breast cancer cell line, MDA-MB-468. *Cancer Res.* 1992 Jun 15;52(12):3418–24.
56. Fukasawa K, Wiener F, Vande Woude GF, Mai S. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene.* 1997 Sep;15(11):1295–302.
57. Kubickova A, De Sanctis JB, Hajduch M. Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 15;24(24).
58. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):993–1000.
59. Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 1998 Oct 1;12(19):2984–91.
60. Watt R, Nishikura K, Sorrentino J, ar-Rushdi A, Croce CM, Rovera G. The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human c-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Oct;80(20):6307–11.

61. Bentley DL, Groudine M. Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B-cell lymphomas. *Mol Cell Biol.* 1986 Oct;6(10):3481–9.
62. Ray D, Robert-Lézénès J. Coexistence of a c-myc mRNA initiated in intron 1 with the normal c-myc mRNA and similar regulation of both transcripts in mammalian cells. *Oncogene Res.* 1989;5(1):73–8.
63. Nanbru C, Prats AC, Droogmans L, Defrance P, Huez G, Kruys V. Translation of the human c-myc P0 tricistronic mRNA involves two independent internal ribosome entry sites. *Oncogene.* 2001 Jul 12;20(31):4270–80.
64. Hann SR, King MW, Bentley DL, Anderson CW, Eisenman RN. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell.* 1988 Jan 29;52(2):185–95.
65. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. myc function and regulation. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:809–60.
66. Hann SR, Dixit M, Sears RC, Sealy L. The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev.* 1994 Oct 15;8(20):2441–52.
67. Cory S. Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Adv Cancer Res.* 1986;47:189–234.
68. Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, et al. The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell.* 1983 Oct;34(3):779–87.
69. Bernard O, Cory S, Gerondakis S, Webb E, Adams JM. Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *EMBO J.* 1983;2(12):2375–83.
70. Bentley DL, Groudine M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature.* 1986 Jun 12;321(6071):702–6.
71. Nepveu A, Marcu KB. Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc locus. *EMBO J.* 1986 Nov;5(11):2859–65.
72. Yang JQ, Remmers EF, Marcu KB. The first exon of the c-myc proto-oncogene contains a novel positive control element. *EMBO J.* 1986 Dec 20;5(13):3553–62.
73. Hann SR, Sloan-Brown K, Spotts GD. Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev.* 1992 Jul;6(7):1229–40.
74. Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol.* 2007 Jul;17(7):318–24.
75. Philipp A, Schneider A, Väsrik I, Finke K, Xiong Y, Beach D, et al. Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol.* 1994 Jun;14(6):4032–43.
76. Freytag SO, Geddes TJ. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science.* 1992 Apr 17;256(5055):379–82.
77. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science.* 1991 Jan 18;251(4991):288–92.
78. Xiao Q, Claassen G, Shi J, Adachi S, Sedivy J, Hann SR. Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3803–8.
79. Spotts GD, Patel SV, Xiao Q, Hann SR. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol.* 1997 Mar;17(3):1459–68.
80. Cazalla D, Zhu J, Manche L, Huber E, Krainer AR, Cáceres JF. Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol Cell Biol.* 2002 Oct;22(19):6871–82.
81. Galmozzi E, Casalini P, Iorio MV, Casati B, Olgiati C, Ménard S. HER2 signaling enhances 5'UTR-mediated translation of c-Myc mRNA. *J Cell Physiol.* 2004 Jul;200(1):82–8.

82. Notari M, Neviani P, Santhanam R, Blaser BW, Chang JS, Galiotta A, et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2507–16.
83. Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*. 1998 Jan 22;16(3):423–8.
84. Le Quesne JP, Stoneley M, Fraser GA, Willis AE. Derivation of a structural model for the c-myc IRES. *J Mol Biol*. 2001 Jun 29;310(1):111–26.
85. Ji MH, Kim SK, Kim CY, Phi JH, Jun HJ, Blume SW, et al. Physiological Expression and Accumulation of the Products of Two Upstream Open Reading Frames mrt1 and MycHex1 Along With p64 and p67 Myc From the Human c-myc Locus. *Journal of Cellular Biochemistry* [Internet]. 2016;117(6):1407–18. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.25431>
86. Thiry M, Lafontaine DLJ. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*. 2005 Apr;15(4):194–9.
87. Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet*. 2011 Aug;27(8):295–306.
88. Gazin C, Rigolet M, Briand JP, Van Regenmortel MH, Galibert F. Immunochemical detection of proteins related to the human c-myc exon 1. *EMBO J*. 1986 Sep;5(9):2241–50.
89. Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol*. 1997 Feb 10;136(3):531–44.
90. Broers JL, Machiels BM, van Eys GJ, Kuijpers HJ, Manders EM, van Driel R, et al. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 (Pt 20):3463–75.
91. Johnson N, Krebs M, Boudreau R, Giorgi G, LeGros M, Larabell C. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation*. 2003 Sep;71(7):414–24.
92. Lagace TA, Ridgway ND. The rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine synthesis regulates proliferation of the nucleoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2005 Mar;16(3):1120–30.
93. Echevarría W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):440–6.
94. Mickleburgh I, Burtle B, Hollås H, Campbell G, Chrzanowska-Lightowlers Z, Vedeler A, et al. Annexin A2 binds to the localization signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA. *FEBS J*. 2005 Jan;272(2):413–21.
95. Zaidi SK, Young DW, Javed A, Pratap J, Montecino M, van Wijnen A, et al. Nuclear microenvironments in biological control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7(6):454–63.
96. Marinkovic T, Marinkovic D. Obscure Involvement of MYC in Neurodegenerative Diseases and Neuronal Repair. *Mol Neurobiol*. 2021 Aug;58(8):4169–77.
97. Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer*. 2021 Jan 4;20(1):3.
98. Ahmadi SE, Rahimi S, Zarandi B, Chegeni R, Safa M. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol*. 2021 Aug 9;14(1):121.
99. Whitfield JR, Soucek L. The long journey to bring a Myc inhibitor to the clinic. *J Cell Biol*. 2021 Aug 2;220(8).
100. Vaklavas C, Meng Z, Choi H, Grizzle WE, Zinn KR, Blume SW. Small molecule inhibitors of IRES-mediated translation. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(10):1471–85.
101. Vaklavas C, Grizzle WE, Choi H, Meng Z, Zinn KR, Shrestha K, et al. IRES inhibition induces terminal differentiation and synchronized death in triple-negative breast cancer and glioblastoma cells. *Tumour Biol*. 2016 Oct;37(10):13247–64.

102. Shi Y, Sun F, Cheng Y, Holmes B, Dhakal B, Gera JF, et al. Critical Role for Cap-Independent c-MYC Translation in Progression of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2022 Apr 1;21(4):502–10.
103. Holmes B, Lee J, Landon KA, Benavides-Serrato A, Bashir T, Jung ME, et al. Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Inhibition Synergizes with Reduced Internal Ribosome Entry Site (IRES)-mediated Translation of Cyclin D1 and c-MYC mRNAs to Treat Glioblastoma. *J Biol Chem.* 2016 Jul 1;291(27):14146–59.
104. Waters CM, Littlewood TD, Hancock DC, Moore JP, Evan GI. c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene.* 1991 May;6(5):797–805.
105. Kerkhoff E, Houben R, Löffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR. Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signalling. *Oncogene.* 1998 Jan 15;16(2):211–6.
106. Grigorieva I, Grigoriev VG, Rowney MK, Hoover RG. Regulation of c-myc transcription by interleukin-2 (IL-2). Identification of a novel IL-2 response element interacting with STAT-4. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10;275(10):7343–50.
107. Lee WH, Liu FH, Lin JYC, Huang SY, Lin H, Liao WJ, et al. JAK pathway induction of c-Myc critical to IL-5 stimulation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *J Cell Biochem.* 2009 Apr 1;106(5):929–36.
108. Domínguez-Cáceres MA, García-Martínez JM, Calcabrini A, González L, Porque PG, León J, et al. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene.* 2004 Sep 23;23(44):7378–90.
109. Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene.* 2002 Oct 17;21(47):7137–46.
110. Gómez-Casares MT, García-Alegria E, López-Jorge CE, Ferrándiz N, Blanco R, Alvarez S, et al. MYC antagonizes the differentiation induced by imatinib in chronic myeloid leukemia cells through downregulation of p27(KIP1.). *Oncogene.* 2013 Apr 25;32(17):2239–46.
111. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997 Oct 15;16(20):6151–61.
112. Samanta AK, Lin H, Sun T, Kantarjian H, Arlinghaus RB. Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2006 Jul 1;66(13):6468–72.
113. Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(10):3758–62.
114. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2000 Jan 17;19(2):263–72.
115. Wang H, Mannava S, Grachtchouk V, Zhuang D, Soengas MS, Gudkov AV, et al. c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene.* 2008 Mar 20;27(13):1905–15.
116. Rottmann S, Lüscher B. The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;302:63–122.
117. van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr;10(4):301–9.
118. Liu YC, Li F, Handler J, Huang CRL, Xiang Y, Neretti N, et al. Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS One.* 2008 Jul 16;3(7):e2722.
119. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 1;15(21):6479–83.
120. Qiu Q, Yang L, Feng Y, Zhu Z, Li N, Zheng L, et al. HDAC I/IIb selective inhibitor Purinostat Mesylate combined with GLS1 inhibition effectively eliminates CML stem cells. *Bioact Mater.* 2023 Mar;21:483–98.

121. Kolenda T, Guglas K, Kopczyńska M, Sobocińska J, Teresiak A, Bliźniak R, et al. Good or not good: Role of miR-18a in cancer biology. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2020 Oct;25(5):808–19.
122. Qu A, Jiang C, Cai Y, Kim JH, Tanaka N, Ward JM, et al. Role of Myc in hepatocellular proliferation and hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*. 2014 Feb;60(2):331–8.
123. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008 Jan;40(1):43–50.
124. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7713–22.
125. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1812(5):592–601.
126. Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Ohhata T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Dec;70(24):4785–94.
127. Ouyang Q, Chen G, Zhou J, Li L, Dong Z, Yang R, et al. Neurotensin signaling stimulates glioblastoma cell proliferation by upregulating c-Myc and inhibiting miR-29b-1 and miR-129-3p. *Neuro Oncol*. 2016 Feb;18(2):216–26.
128. Shen MY, Wang Y, Cui SY, Wu XL, Guo Y, Xu RR. MicroRNA-125a regulates proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia through targeting NF- κ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 May;23(9):3594–601.
129. Karkhanis V, Alinari L, Ozer HG, Chung J, Zhang X, Sif S, et al. Protein arginine methyltransferase 5 represses tumor suppressor miRNAs that down-regulate CYCLIN D1 and c-MYC expression in aggressive B-cell lymphoma. *J Biol Chem*. 2020 Jan 31;295(5):1165–80.
130. Lin TC, Lin PL, Cheng YW, Wu TC, Chou MC, Chen CY, et al. MicroRNA-184 Downregulated by the MicroRNA-21 Promotes Tumor Malignancy and Poor Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer via Targeting CDC25A and c-Myc. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S1532-1539.
131. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, et al. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2229–34.
132. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*. 2003 May 1;17(9):1115–29.
133. Song A, Ye J, Zhang K, Sun L, Zhao Y, Yu H. Lentiviral vector-mediated siRNA knockdown of c-MYC: cell growth inhibition and cell cycle arrest at G2/M phase in Jijoye cells. *Biochem Genet*. 2013 Aug;51(7–8):603–17.
134. Yang Y, Xue K, Li Z, Zheng W, Dong W, Song J, et al. c-Myc regulates the CDK1/cyclin B1 dependent-G2/M cell cycle progression by histone H4 acetylation in Raji cells. *Int J Mol Med*. 2018 Jun;41(6):3366–78.
135. García-Gutiérrez L, Bretones G, Molina E, Arechaga I, Symonds C, Acosta JC, et al. Myc stimulates cell cycle progression through the activation of Cdk1 and phosphorylation of p27. *Sci Rep*. 2019 Dec 10;9(1):18693.
136. Sanjari M, Kordestani Z, Safavi M, Mashrouteh M, FekriSoofiAbadi M, Ghaseminejad Tafreshi A. Enhanced expression of Cyclin D1 and C-myc, a prognostic factor and possible mechanism for recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep*. 2020 Mar 20;10(1):5100.
137. Min Y, Ding Y, Huang Q, Xu Y, Li J. Cordycepin inhibited the retinoblastoma cell proliferation, migration, and invasion as well as lung metastasis via modulating c-Myc/cyclin D1 pathway. *Chem Biol Drug Des*. 2023 Mar;101(3):605–13.
138. Tang LJ, Li Y, Liu YL, Wang JM, Liu DW, Tian QB. USP12 regulates cell cycle progression by involving c-Myc, cyclin D2 and BMI-1. *Gene*. 2016 Mar 1;578(1):92–9.
139. Zhou Y, Geng Y, Zhang Y, Zhou Y, Chu C, Sharma S, et al. The requirement for cyclin E in c-Myc overexpressing breast cancers. *Cell Cycle*. 2020 Oct;19(20):2589–99.

140. Gurung SK, Dana S, Mandal K, Mukhopadhyay P, Mondal N. Downregulation of c-Myc and p21 expression and induction of S phase arrest by naphthalene diimide derivative in gastric adenocarcinoma cells. *Chem Biol Interact.* 2019 May 1;304:106–23.
141. Xia P, Zhang H, Xu K, Jiang X, Gao M, Wang G, et al. MYC-targeted WDR4 promotes proliferation, metastasis, and sorafenib resistance by inducing CCNB1 translation in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2021 Jul 9;12(7):691.
142. Lolli G, Johnson LN. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle.* 2005 Apr;4(4):572–7.
143. Zhong S, Zhang Y, Yin X, Di W. CDK7 inhibitor suppresses tumor progression through blocking the cell cycle at the G2/M phase and inhibiting transcriptional activity in cervical cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:2137–47.
144. Cowling VH, Cole MD. The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Mol Cell Biol.* 2007 Mar;27(6):2059–73.
145. Lui GYL, Grandori C, Kemp CJ. CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *J Clin Pathol.* 2018 Nov;71(11):957–62.
146. Kim YJ, Park SJ, Maeng KJ, Lee SC, Lee CS. Multi-Platform Omics Analysis for Identification of Molecular Characteristics and Therapeutic Targets of Uveal Melanoma. *Sci Rep.* 2019 Dec 17;9(1):19235.
147. Moreira DC, Venkataraman S, Subramanian A, Desisto J, Balakrishnan I, Prince E, et al. Targeting MYC-driven replication stress in medulloblastoma with AZD1775 and gemcitabine. *J Neurooncol.* 2020 May;147(3):531–45.
148. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* [Internet]. 1996 Aug 1;382(6591):511–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/382511a0>
149. Leal MF, Ribeiro HF, Rey JA, Pinto GR, Smith MC, Moreira-Nunes CA, et al. YWHAE silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAE role in the tumor development and metastasis process. *Oncotarget.* 2016 Dec 20;7(51):85393–410.
150. Ribeiro HF, Sant' Anna C de C, Kato V de JO, de Sousa Brasil RM, Bona AB, da Costa DF, et al. CDC25B Inhibition by Menadione: A Potential New Therapeutical Approach. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022;22(17):2927–32.
151. Jung P, Hermeking H. The c-MYC-AP4-p21 cascade. *Cell Cycle.* 2009 Apr 1;8(7):982–9.
152. Vaqué JP, Navascues J, Shiio Y, Laiho M, Ajenjo N, Mauleon I, et al. Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1112–22.
153. Wong PP, Miranda F, Chan KV, Berlato C, Hurst HC, Scibetta AG. Histone demethylase KDM5B collaborates with TFAP2C and Myc to repress the cell cycle inhibitor p21(cip) (CDKN1A). *Mol Cell Biol.* 2012 May;32(9):1633–44.
154. Ishida T, Ueyama T, Ihara D, Harada Y, Nakagawa S, Saito K, et al. c-Myc/microRNA-17-92 Axis Phase-Dependently Regulates PTEN and p21 Expression via ceRNA during Reprogramming to Mouse Pluripotent Stem Cells. *Biomedicines.* 2023 Jun 16;11(6).
155. Choi SH, Koh DI, Ahn H, Kim JY, Kim Y, Hur MW. Cell fate decisions by c-Myc depend on ZBTB5 and p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Dec 17;533(4):1247–54.
156. Liu M, Yao B, Gui T, Guo C, Wu X, Li J, et al. PRMT5-dependent transcriptional repression of c-Myc target genes promotes gastric cancer progression. *Theranostics.* 2020;10(10):4437–52.
157. Zheng L, Suzuki H, Nakajo Y, Nakano A, Kato M. Regulation of c-MYC transcriptional activity by transforming growth factor-beta 1-stimulated clone 22. *Cancer Sci.* 2018 Feb;109(2):395–402.

158. Du L, Liu W, Aldana-Masangkay G, Pozhitkov A, Pichiorri F, Chen Y, et al. SUMOylation inhibition enhances dexamethasone sensitivity in multiple myeloma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Jan 4;41(1):8.
159. Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6595–604.
160. Obaya AJ, Sedivy JM. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jan;59(1):126–42.
161. Khan F, Ricks-Santi LJ, Zafar R, Kanaan Y, Naab T. Expression of p27 and c-Myc by immunohistochemistry in breast ductal cancers in African American women. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Jun;34:170–4.
162. Luo Y, Gao Y, Liu W, Yang Y, Jiang J, Wang Y, et al. Myelocytomatosis-Protein Arginine N-Methyltransferase 5 Axis Defines the Tumorigenesis and Immune Response in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021 Oct;74(4):1932–51.
163. Seviour EG, Sehgal V, Lu Y, Luo Z, Moss T, Zhang F, et al. Functional proteomics identifies miRNAs to target a p27/Myc/phospho-Rb signature in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2016 Feb 11;35(6):691–701.
164. Zeller KI, Zhao X, Lee CWH, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, et al. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47):17834–9.
165. Valovka T, Schönfeld M, Raffeiner P, Breuker K, Dunzendorfer-Matt T, Hartl M, et al. Transcriptional control of DNA replication licensing by Myc. *Sci Rep*. 2013 Dec 6;3:3444.
166. Best S, Hashiguchi T, Kittai A, Bruss N, Paiva C, Okada C, et al. Targeting ubiquitin-activating enzyme induces ER stress-mediated apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Blood Adv*. 2019 Jan 8;3(1):51–62.
167. Young LA, O'Connor LO, de Renty C, Veldman-Jones MH, Dorval T, Wilson Z, et al. Differential Activity of ATR and WEE1 Inhibitors in a Highly Sensitive Subpopulation of DLBCL Linked to Replication Stress. *Cancer Res*. 2019 Jul 15;79(14):3762–75.
168. Zhang Y, Li Z, Hao Q, Tan W, Sun J, Li J, et al. The Cdk2-c-Myc-miR-571 Axis Regulates DNA Replication and Genomic Stability by Targeting Geminin. *Cancer Res*. 2019 Oct 1;79(19):4896–910.
169. Xuan F, Huang M, Zhao E, Cui H. MINA53 deficiency leads to glioblastoma cell apoptosis via inducing DNA replication stress and diminishing DNA damage response. *Cell Death Dis*. 2018 Oct 17;9(11):1062.
170. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *J Mol Endocrinol*. 2017 Feb;58(2):R129–46.
171. Bouillez A, Rajabi H, Pitroda S, Jin C, Alam M, Kharbanda A, et al. Inhibition of MUC1-C Suppresses MYC Expression and Attenuates Malignant Growth in KRAS Mutant Lung Adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1538–48.
172. Dilshara MG, Jayasooriya RGPT, Choi YH, Kim GY. Camptothecin induces c-Myc- and Sp1-mediated hTERT expression in LNCaP cells: Involvement of reactive oxygen species and PI3K/Akt. *Food Chem Toxicol*. 2019 May;127:53–60.
173. Zhang F, Wang S, Zhu J. ETS variant transcription factor 5 and c-Myc cooperate in derepressing the human telomerase gene promoter via composite ETS/E-box motifs. *J Biol Chem*. 2020 Jul 17;295(29):10062–75.
174. Yap CS, Peterson AL, Castellani G, Sedivy JM, Neretti N. Kinetic profiling of the c-Myc transcriptome and bioinformatic analysis of repressed gene promoters. *Cell Cycle*. 2011 Jul 1;10(13):2184–96.
175. Gruppetta M, Formosa R, Falzon S, Ariff Scicluna S, Falzon E, Degeatano J, et al. Expression of cell cycle regulators and biomarkers of proliferation and regrowth in human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2017 Jun;20(3):358–71.

176. Lin X, Yang Y, Guo Y, Liu H, Jiang J, Zheng F, et al. PTTG1 is involved in TNF- α -related hepatocellular carcinoma via the induction of c-myc. *Cancer Med*. 2019 Sep;8(12):5702–15.
177. Demin DE, Bogolyubova AV, Zlenko DV, Uvarova AN, Deikin AV, Putlyaeva LV, et al. [The Novel Short Isoform of Securin Stimulates the Expression of Cyclin D3 and Angiogenesis Factors VEGFA and FGF2, but Does Not Affect the Expression of MYC Transcription Factor]. *Mol Biol (Mosk)*. 2018 Jun;52(3):508–18.
178. Wang X, Duan W, Li X, Liu J, Li D, Ye L, et al. PTTG regulates the metabolic switch of ovarian cancer cells via the c-myc pathway. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40959–69.
179. Zeng J, Tian Q, Zeng Z, Cai J, Ye M, Liu Y, et al. Derlin-1 exhibits oncogenic activities and indicates an unfavorable prognosis in breast cancer. *Cell Biol Int*. 2020 Feb;44(2):593–602.
180. Xie C, Powell C, Yao M, Wu J, Dong Q. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C: a potential cancer biomarker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Feb;47:113–7.
181. Fu S, Liu Y, Zhang Z, Mei M, Chen Q, Wang S, et al. Identification of a Novel Myc-Regulated Gene Signature for Patients with Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. *J Oncol*. 2022;2022:3487859.
182. Wang X, Yu J, Yan J, Peng K, Zhou H. Single-cell sequencing reveals MYC targeting gene MAD2L1 is associated with prostate cancer bone metastasis tumor dormancy. *BMC Urol*. 2022 Mar 19;22(1):37.
183. Yan M, Song M, Bai R, Cheng S, Yan W. Identification of potential therapeutic targets for colorectal cancer by bioinformatics analysis. *Oncol Lett*. 2016 Dec;12(6):5092–8.
184. Schneider C, Setty M, Holmes AB, Maute RL, Leslie CS, Mussolin L, et al. MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 3;111(22):8185–90.
185. Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E, Spandidos DA. Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. *Br J Cancer*. 1987 Sep;56(3):251–9.
186. Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*. 1991 Oct;6(10):1915–22.
187. Zhang F, Zakaria SM, Höggqvist Tabor V, Singh M, Tronnorsjö S, Goodwin J, et al. MYC and RAS are unable to cooperate in overcoming cellular senescence and apoptosis in normal human fibroblasts. *Cell Cycle*. 2018;17(24):2697–715.
188. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):307–15.
189. Martín-Subero JI, Odero MD, Hernandez R, Cigudosa JC, Agirre X, Saez B, et al. Amplification of IGH/MYC fusion in clinically aggressive IGH/BCL2-positive germinal center B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Aug;43(4):414–23.
190. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep*. 2014 Jan 16;6(1):130–40.
191. Li W, Gupta SK, Han W, Kundson RA, Nelson S, Knutson D, et al. Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *J Hematol Oncol*. 2019 Jul 9;12(1):73.
192. Liu X, Xu S, Zhang J, Fan M, Xie J, Zhang B, et al. Targeting MYC and BCL2 by a natural compound for 'double-hit' lymphoma. *Hematol Oncol*. 2022 Aug;40(3):356–69.
193. Hu MH, Yu BY, Wang X, Jin G. Drug-like biimidazole derivatives dually target c-MYC/BCL-2 G-quadruplexes and inhibit acute myeloid leukemia. *Bioorg Chem*. 2020 Nov;104:104264.
194. Paul R, Das T, Debnath M, Chauhan A, Dash J. G-Quadruplex-Binding Small Molecule Induces Synthetic Lethality in Breast Cancer Cells by Inhibiting c-MYC and BCL2 Expression. *ChemBiochem*. 2020 Apr 1;21(7):963–70.

195. Donati G, Ravà M, Filipuzzi M, Nicoli P, Cassina L, Verrecchia A, et al. Targeting mitochondrial respiration and the BCL2 family in high-grade MYC-associated B-cell lymphoma. *Mol Oncol*. 2022 Mar;16(5):1132–52.
196. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985 Dec 12;318(6046):533–8.
197. Jacobsen KA, Prasad VS, Sidman CL, Osmond DG. Apoptosis and macrophage-mediated deletion of precursor B cells in the bone marrow of E mu-myc transgenic mice. *Blood*. 1994 Oct 15;84(8):2784–94.
198. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):331–3.
199. Letai A, Sorcinelli MD, Beard C, Korsmeyer SJ. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell*. 2004 Sep;6(3):241–9.
200. Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR. Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell*. 1999 Feb;3(2):169–79.
201. Chang DW, Claassen GF, Hann SR, Cole MD. The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol Cell Biol*. 2000 Jun;20(12):4309–19.
202. Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, et al. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature*. 2005 Aug 11;436(7052):807–11.
203. Li QC, Xu H, Wang X, Wang T, Wu J. miR-34a increases cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells in vitro through up-regulation of c-Myc and Bim signal. *Cancer Biomark*. 2017 Dec 12;21(1):135–44.
204. Guo Y, Ye Q, Deng P, Cao Y, He D, Zhou Z, et al. Spermine synthase and MYC cooperate to maintain colorectal cancer cell survival by repressing Bim expression. *Nat Commun*. 2020 Jun 26;11(1):3243.
205. Wirth M, Stojanovic N, Christian J, Paul MC, Stauber RH, Schmid RM, et al. MYC and EGR1 synergize to trigger tumor cell death by controlling NOXA and BIM transcription upon treatment with the proteasome inhibitor bortezomib. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(16):10433–47.
206. Nguyen HV, Vandenberg CJ, Ng AP, Robati MR, Anstee NS, Rimes J, et al. Development and survival of MYC-driven lymphomas require the MYC antagonist MNT to curb MYC-induced apoptosis. *Blood*. 2020 Mar 26;135(13):1019–31.
207. Nguyen HV, Vandenberg CJ, Robati MR, Ng AP, Cory S. MNT suppresses T cell apoptosis via BIM and is critical for T lymphomagenesis. *Cell Death Differ*. 2023 Apr;30(4):1018–32.
208. Muthalagu N, Junttila MR, Wiese KE, Wolf E, Morton J, Bauer B, et al. BIM is the primary mediator of MYC-induced apoptosis in multiple solid tissues. *Cell Rep*. 2014 Sep 11;8(5):1347–53.
209. Wood CD, Veenstra H, Khasnis S, Gunnell A, Webb HM, Shannon-Lowe C, et al. MYC activation and BCL2L1 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs. *Elife*. 2016 Aug 4;5:e18270.
210. Schmidt SCS, Jiang S, Zhou H, Willox B, Holthaus AM, Kharchenko PV, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A partially coincides with EBNA3C genome-wide and is tethered to DNA through BATF complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 13;112(2):554–9.
211. Delbridge ARD, Grabow S, Bouillet P, Adams JM, Strasser A. Functional antagonism between pro-apoptotic BIM and anti-apoptotic BCL-XL in MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene*. 2015 Apr 2;34(14):1872–6.
212. Huang W, Liu Z, Zhou G, Ling J, Tian A, Sun N. Silencing Bag-1 gene via magnetic gold nanoparticle-delivered siRNA plasmid for colorectal cancer therapy in vivo and in vitro. *Tumour Biol*. 2016 Aug;37(8):10365–74.

213. Gennaro VJ, Wedegaertner H, McMahon SB. Interaction between the BAG1S isoform and HSP70 mediates the stability of anti-apoptotic proteins and the survival of osteosarcoma cells expressing oncogenic MYC. *BMC Cancer*. 2019 Mar 22;19(1):258.
214. Zhang XY, Pfeiffer HK, Mellert HS, Stanek TJ, Sussman RT, Kumari A, et al. Inhibition of the single downstream target BAG1 activates the latent apoptotic potential of MYC. *Mol Cell Biol*. 2011 Dec;31(24):5037–45.
215. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):279–84.
216. Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Karnezis A, Shchors K, Bui DA, et al. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell*. 2008 Dec 9;14(6):447–57.
217. Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*. 2012 Sep 28;151(1):56–67.
218. Baluapuri A, Wolf E, Eilers M. Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 May;21(5):255–67.
219. Topham CH, Taylor SS. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Dec;25(6):780–5.
220. Othman NS, Mohd Azman DK. Andrographolide Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Glioblastoma DBTRG-05MG Cell Line via ERK1/2 /c-Myc/p53 Signaling Pathway. *Molecules*. 2022 Oct 8;27(19).
221. Valente LJ, Grabow S, Vandenberg CJ, Strasser A, Janic A. Combined loss of PUMA and p21 accelerates c-MYC-driven lymphoma development considerably less than loss of one allele of p53. *Oncogene*. 2016 Jul 21;35(29):3866–71.
222. Wang J, Ding S, Duan Z, Xie Q, Zhang T, Zhang X, et al. Role of p14ARF-HDM2-p53 axis in SOX6-mediated tumor suppression. *Oncogene*. 2016 Mar 31;35(13):1692–702.
223. Feng YC, Liu XY, Teng L, Ji Q, Wu Y, Li JM, et al. c-Myc inactivation of p53 through the pan-cancer lncRNA MILIP drives cancer pathogenesis. *Nat Commun*. 2020 Oct 5;11(1):4980.
224. Lee DH, Kim GW, Yoo J, Lee SW, Jeon YH, Kim SY, et al. Histone demethylase KDM4C controls tumorigenesis of glioblastoma by epigenetically regulating p53 and c-Myc. *Cell Death Dis*. 2021 Jan 18;12(1):89.
225. Li J, Hu Q, Li Z, Feng K, Li K. MT1G Regulates c-MYC/P53 Signal to Inhibit Proliferation, Invasion and Migration and Promote Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Curr Mol Med*. 2023 Mar 29;
226. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, et al. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. *Oncogene*. 2015 Jan 15;34(3):314–22.
227. Meng X, Carlson NR, Dong J, Zhang Y. Oncogenic c-Myc-induced lymphomagenesis is inhibited non-redundantly by the p19Arf-Mdm2-p53 and RP-Mdm2-p53 pathways. *Oncogene*. 2015 Nov 12;34(46):5709–17.
228. Faruq O, Zhao D, Shrestha M, Vecchione A, Zacksenhaus E, Chang H. Targeting an MDM2/MYC Axis to Overcome Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 21;14(6).
229. Amanullah A, Liebermann DA, Hoffman B. p53-independent apoptosis associated with c-Myc-mediated block in myeloid cell differentiation. *Oncogene*. 2000 Jun 15;19(26):2967–77.
230. Kurbegovic A, Trudel M. The master regulators Myc and p53 cellular signaling and functions in polycystic kidney disease. *Cell Signal*. 2020 Jul;71:109594.
231. Hagiyaama H, Adachi T, Yoshida T, Nomura T, Miyasaka N, Honjo T, et al. Signaling through the antigen receptor of B lymphocytes activates a p53-independent pathway of c-Myc-induced apoptosis. *Oncogene*. 1999 Jul 15;18(28):4091–8.

232. Boone DN, Qi Y, Li Z, Hann SR. Egr1 mediates p53-independent c-Myc-induced apoptosis via a noncanonical ARF-dependent transcriptional mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):632–7.
233. Destefanis F, Manara V, Bellosta P. Myc as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Cell Competition: A Link to Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 5;21(11).
234. Pelletier J, Thomas G, Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jan;18(1):51–63.
235. Dai MS, Lu H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J Cell Biochem*. 2008 Oct 15;105(3):670–7.
236. Elhamamsy AR, Metge BJ, Alsheikh HA, Shevde LA, Samant RS. Ribosome Biogenesis: A Central Player in Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance. *Cancer Res*. 2022 Jul 5;82(13):2344–53.
237. Mori T, Ato S, Knudsen JR, Henriquez-Olguin C, Li Z, Wakabayashi K, et al. c-Myc overexpression increases ribosome biogenesis and protein synthesis independent of mTORC1 activation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021 Oct 1;321(4):E551–9.
238. Ni C, Buszczak M. Ribosome biogenesis and function in development and disease. *Development*. 2023 Mar 1;150(5).
239. Popay TM, Wang J, Adams CM, Howard GC, Codreanu SG, Sherrod SD, et al. MYC regulates ribosome biogenesis and mitochondrial gene expression programs through its interaction with host cell factor-1. *Elife*. 2021 Jan 8;10.
240. Derenzini M, Montanaro L, Trerè D. Ribosome biogenesis and cancer. *Acta Histochem*. 2017 Apr;119(3):190–7.
241. Zhong WJ, Ma L, Yang F, Cao J, Tan J, Li B. Matriline, a potential c-Myc inhibitor, suppresses ribosome biogenesis and nucleotide metabolism in myeloid leukemia. *Front Pharmacol*. 2022;13:1027441.
242. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2019 Jun 20;88:281–306.
243. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2007 Dec;28(12):1178–82.
244. Zhang Y, Ear J, Yang Z, Morimoto K, Zhang B, Lin S. Defects of protein production in erythroid cells revealed in a zebrafish Diamond-Blackfan anemia model for mutation in RPS19. *Cell Death Dis*. 2014 Jul 24;5(7):e1352.
245. Böğürçü-Seidel N, Ritschel N, Acker T, Németh A. Beyond ribosome biogenesis: noncoding nucleolar RNAs in physiology and tumor biology. *Nucleus*. 2023 Dec;14(1):2274655.
246. Domostegui A, Peddigari S, Mercer CA, Iannizzotto F, Rodriguez ML, Garcia-Cajide M, et al. Impaired ribosome biogenesis checkpoint activation induces p53-dependent MCL-1 degradation and MYC-driven lymphoma death. *Blood*. 2021 Jun 17;137(24):3351–64.
247. Morcelle C, Menoyo S, Morón-Duran FD, Tauler A, Kozma SC, Thomas G, et al. Oncogenic MYC Induces the Impaired Ribosome Biogenesis Checkpoint and Stabilizes p53 Independent of Increased Ribosome Content. *Cancer Res*. 2019 Sep 1;79(17):4348–59.
248. Catez F, Dalla Venezia N, Marcel V, Zorbas C, Lafontaine DLJ, Diaz JJ. Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jan;159:74–81.
249. Devlin JR, Hannan KM, Hein N, Cullinane C, Kusnadi E, Ng PY, et al. Combination Therapy Targeting Ribosome Biogenesis and mRNA Translation Synergistically Extends Survival in MYC-Driven Lymphoma. *Cancer Discov*. 2016 Jan;6(1):59–70.
250. Gripp KW, Curry C, Olney AH, Sandoval C, Fisher J, Chong JXL, et al. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet A*. 2014 Sep;164A(9):2240–9.

251. Zheng J, Lang Y, Zhang Q, Cui D, Sun H, Jiang L, et al. Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes Dev.* 2015 Jul 15;29(14):1524–34.
252. Morgado-Palacin L, Varetto G, Llanos S, Gómez-López G, Martinez D, Serrano M. Partial Loss of Rpl11 in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Rep.* 2015 Oct 27;13(4):712–22.
253. Kapralova K, Jahoda O, Koralkova P, Gursky J, Lanikova L, Pospisilova D, et al. Oxidative DNA Damage, Inflammatory Signature, and Altered Erythrocytes Properties in Diamond-Blackfan Anemia. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 17;21(24).
254. Dai MS, Arnold H, Sun XX, Sears R, Lu H. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J.* 2007 Jul 25;26(14):3332–45.
255. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, De Keersmaecker K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res.* 2020 Feb 20;48(3):1013–28.
256. Orgebin E, Lamoureux F, Isidor B, Charrier C, Ory B, Lézot F, et al. Ribosomopathies: New Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020 Sep 11;9(9).
257. Boussaid I, Fontenay M. Translation defects in ribosomopathies. *Curr Opin Hematol.* 2022 May 1;29(3):119–25.
258. Haferlach T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology.* 2019;86(1):24–9.
259. Farley-Barnes KI, Ogawa LM, Baserga SJ. Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends Genet.* 2019 Oct;35(10):754–67.
260. Nakao S, Deeg HJ, Ishikawa T, Marsh J, List A, Tomonaga M. Myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol.* 2005 Dec;82(5):412–6.
261. Sulima SO, Kampen KR, De Keersmaecker K. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells.* 2019 Mar 11;8(3).
262. Kurzrock R. Myelodysplastic syndrome overview. *Semin Hematol.* 2002 Jul;39(3 Suppl 2):18–25.
263. Nakhoul H, Ke J, Zhou X, Liao W, Zeng SX, Lu H. Ribosomopathies: mechanisms of disease. *Clin Med Insights Blood Disord.* 2014;7:7–16.
264. Aspesi A, Ellis SR. Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019 Apr;19(4):228–38.
265. Suárez L, Vidriales MB, García-Laraña J, Sanz G, Moreno MJ, López A, et al. CD34+ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 15;10(22):7599–606.
266. Calvo T, Reina-Ortiz C, Giraldo D, Gascón M, Woods D, Asenjo J, et al. Expanded and activated allogeneic NK cells are cytotoxic against B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells with sporadic cases of resistance. *Sci Rep.* 2020 Nov 10;10(1):19398.
267. Mills EW, Green R. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science.* 2017 Nov 3;358(6363):eaan2755.
268. Geng X, Wang C, Gao X, Chowdhury P, Weiss J, Villegas JA, et al. GATA-3 is a proto-oncogene in T-cell lymphoproliferative neoplasms. *Blood Cancer J.* 2022 Nov 4;12(11):149.
269. Grzes KM, Swamy M, Hukelmann JL, Emslie E, Sinclair LV, Cantrell DA. Control of amino acid transport coordinates metabolic reprogramming in T-cell malignancy. *Leukemia.* 2017 Dec;31(12):2771–9.
270. Kampen KR, Sulima SO, Verbelen B, Girardi T, Vereecke S, Rinaldi G, et al. The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia.* 2019 Feb;33(2):319–32.
271. Danilova N, Gazda HT. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech.* 2015 Sep;8(9):1013–26.

272. Ball S. Diamond Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:487–91.
273. Engidaye G, Melku M, Enawgaw B. Diamond Blackfan Anemia: Genetics, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *EJIFCC*. 2019 Mar;30(1):67–81.
274. Devlin EE, Dacosta L, Mohandas N, Elliott G, Bodine DM. A transgenic mouse model demonstrates a dominant negative effect of a point mutation in the RPS19 gene associated with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2826–35.
275. Akram T, Fatima A, Klar J, Hoeber J, Zakaria M, Tariq M, et al. Aberrant splicing due to a novel RPS7 variant causes Diamond-Blackfan Anemia associated with spontaneous remission and meningocele. *Int J Hematol*. 2020 Dec;112(6):894–9.
276. Da Costa LM, Marie I, Leblanc TM. Diamond-Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021 Dec 10;2021(1):353–60.
277. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest*. 2012 Jul;122(7):2439–43.
278. Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3715–23.
279. Farooqui SM, Ward R, Aziz M. Shwachman-Diamond Syndrome. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
280. Nelson A, Myers K. Shwachman-Diamond Syndrome. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
281. Bezzetti V, Cipolli M. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives. *Mol Diagn Ther*. 2019 Apr;23(2):281–90.
282. Dall'oca C, Bondi M, Merlini M, Cipolli M, Lavini F, Bartolozzi P. Shwachman-Diamond syndrome. *Musculoskelet Surg*. 2012 Aug;96(2):81–8.
283. Dror Y. Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2005 Dec;45(7):892–901.
284. AlSabbagh MM. Dyskeratosis congenita: a literature review. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2020 Sep;18(9):943–67.
285. Savage SA. Dyskeratosis congenita and telomere biology disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2022 Dec 9;2022(1):637–48.
286. Stoopler ET, Shanti RM. Dyskeratosis Congenita. *Mayo Clin Proc*. 2019 Sep;94(9):1668–9.
287. Marszałek-Kruk BA, Wójcicki P, Dowgierd K, Śmigiel R. Treacher Collins Syndrome: Genetics, Clinical Features and Management. *Genes (Basel)*. 2021 Sep 9;12(9).
288. Carron C, O'Donohue MF, Choessel V, Faubladiet M, Gleizes PE. Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(1):280–91.
289. Rocha E Silva LF, Ramalheite C, Nogueira KL, Mulhovo S, Ferreira MJU, Pohlit AM. In vivo evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents. *Eur J Med Chem*. 2015 Sep 18;102:398–402.
290. Sousa MC, Varandas R, Santos RC, Santos-Rosa M, Alves V, Salvador JAR. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulic acid and betulonic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. *PLoS One*. 2014;9(3):e89939.
291. Aiken C, Chen CH. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol Med*. 2005 Jan;11(1):31–6.
292. Bednarczyk-Cwynar B, Wachowiak N, Szulc M, Kamińska E, Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, et al. Strong and Long-Lasting Antinociceptive and Anti-inflammatory Conjugate of Naturally Occurring Oleanolic Acid and Aspirin. *Front Pharmacol*. 2016;7:202.
293. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep*. 2006 Jun;23(3):394–411.

294. Heller L, Obernauer A, Csuk R. Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin. *Bioorg Med Chem*. 2015 Jul 1;23(13):3002–12.
295. Urban M, Sarek J, Kvasnica M, Tislerova I, Hajduch M. Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *J Nat Prod*. 2007 Apr;70(4):526–32.
296. Hodoň J, Frydrych I, Trhlíková Z, Pokorný J, Borková L, Benická S, et al. Triterpenoid pyrazines and pyridines - Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, preparation of prodrugs. *Eur J Med Chem*. 2022 Dec 5;243:114777.
297. Pokorny J, Borkova L, Urban M. Click Reactions in Chemistry of Triterpenes - Advances Towards Development of Potential Therapeutics. *Curr Med Chem*. 2018 Feb 13;25(5):636–58.
298. Urban M, Vlk M, Dzubak P, Hajduch M, Sarek J. Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorg Med Chem*. 2012 Jun 1;20(11):3666–74.
299. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727–30.
300. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAf-1 · cytochrome C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1999;274(17):11549–56. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0033596980&doi=10.1074%2fjbc.274.17.11549&partnerID=40&md5=9caf42ae4b0c67f4bacd3e8801489d20>
301. Cao X, Deng X, May WS. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2605–14.
302. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*. 2000 Dec;7(12):1166–73.
303. Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):356–8.
304. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994 Sep 22;371(6495):346–7.
305. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):801–9.
306. Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci*. 2002 Apr 15;115(Pt 8):1567–74.
307. Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1(Suppl 1):S84-92.
308. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000 May 12;288(5468):1053–8.
309. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*. 1998 Jan 15;17(2):384–95.
310. Lundqvist M, Thalén N, Volk AL, Hansen HG, von Otter E, Nygren PÅ, et al. Chromophore pre-maturation for improved speed and sensitivity of split-GFP monitoring of protein secretion. *Sci Rep*. 2019 Jan 22;9(1):310.
311. Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, et al. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol*. 2016 Feb 19;11(2):400–8.

312. Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K, Eggers CT, Dixon AS, Hurst R, et al. CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide. *ACS Chem Biol*. 2018 Feb 16;13(2):467–74.
313. Volejnikova J, Vojta P, Urbankova H, Mojžíkova R, Horvathova M, Hochova I, et al. Czech and Slovak Diamond-Blackfan Anemia (DBA) Registry update: Clinical data and novel causative genetic lesions. *Blood Cells Mol Dis*. 2020 Mar;81:102380.
314. Pospisilova D, Cmejlova J, Ludikova B, Stary J, Cerna Z, Hak J, et al. The Czech National Diamond-Blackfan Anemia Registry: clinical data and ribosomal protein mutations update. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Apr 15;48(4):209–18.
315. Idol RA, Robledo S, Du HY, Crimmins DL, Wilson DB, Ladenson JH, et al. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [Internet]. 2007 Jul [cited 2021 Dec 21];39(1):35–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979607000277>
316. Yang K, Yang J, Yi J. Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases. *Cell Stress*. 2018 May 10;2(6):125–40.
317. Holmberg Olausson K, Nistér M, Lindström MS. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells*. 2012 Oct 15;1(4):774–98.
318. Moudry P, Chroma K, Bursac S, Volarevic S, Bartek J. RNA-interference screen for p53 regulators unveils a role of WDR75 in ribosome biogenesis. *Cell Death Differ*. 2021 Oct 5;
319. Farrell AS, Sears RC. MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Mar 1;4(3).
320. Yeh CH, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*. 2018 Aug 7;17(1):115.
321. Fan J, Bellon M, Ju M, Zhao L, Wei M, Fu L, et al. Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. *Mol Cancer*. 2022 Mar 26;21(1):87.
322. Diefenbacher ME, Chakraborty A, Blake SM, Mitter R, Popov N, Eilers M, et al. Usp28 Counteracts Fbw7 in Intestinal Homeostasis and Cancer. *Cancer Research* [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2024 Jan 11];75(7):1181–6. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1726>
323. Farrell AS, Pelz C, Wang X, Daniel CJ, Wang Z, Su Y, et al. Pin1 Regulates the Dynamics of c-Myc DNA Binding To Facilitate Target Gene Regulation and Oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 2013 Aug 1;33(15):2930–49. Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.01455-12>
324. Dubiella C, Pinch BJ, Koikawa K, Zaidman D, Poon E, Manz TD, et al. Sulfolipin is a covalent inhibitor of Pin1 that blocks Myc-driven tumors in vivo. *Nature Chemical Biology* [Internet]. 2021 Sep 1;17(9):954–63. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00786-7>
325. Devaiah BN, Mu J, Akman B, Uppal S, Weissman JD, Cheng D, et al. MYC protein stability is negatively regulated by BRD4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jun 16;117(24):13457–67.
326. Li GQ, Guo WZ, Zhang Y, Seng JJ, Zhang HP, Ma XX, et al. Suppression of BRD4 inhibits human hepatocellular carcinoma by repressing MYC and enhancing BIM expression. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2462–74.
327. Lim DY, Shin SH, Lee MH, Malakhova M, Kurinov I, Wu Q, et al. A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Jun 7;7(23):35001–14.
328. Chi YH, Yeh TK, Ke YY, Lin WH, Tsai CH, Wang WP, et al. Discovery and Synthesis of a Pyrimidine-Based Aurora Kinase Inhibitor to Reduce Levels of MYC Oncoproteins. *J Med Chem*. 2021 Jun 10;64(11):7312–30.
329. Yang D, Liu H, Goga A, Kim S, Yuneva M, Bishop JM. Therapeutic potential of a synthetic lethal interaction between the MYC proto-oncogene and inhibition of aurora-B kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 3;107(31):13836–41.

330. Ning R, Chen G, Fang R, Zhang Y, Zhao W, Qian F. Diosmetin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis through STAT3/c-Myc signaling pathway in human osteosarcoma cells. *Biological Research* [Internet]. 2021 Dec 18;54(1):40. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00363-1>
331. Piazzzi M, Bavelloni A, Faenza I, Blalock W. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 and the double-strand RNA-dependent kinase, PKR: When two kinases for the common good turn bad. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Oct;1867(10):118769.
332. Katoh M, Katoh M. WNT signaling and cancer stemness. *Essays in Biochemistry* [Internet]. 2022 Sep 16 [cited 2024 Jan 11];66(4):319–31. Available from: <https://doi.org/10.1042/EBC20220016>
333. Pfister AS, Kühl M. Of Wnts and Ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018 Jan;153:131–55.
334. Blalock WL, Piazzzi M, Bavelloni A, Raffini M, Faenza I, D'Angelo A, et al. Identification of the PKR nuclear interactome reveals roles in ribosome biogenesis, mRNA processing and cell division. *J Cell Physiol*. 2014 Aug;229(8):1047–60.
335. Shin N, Lee HJ, Sim DY, Im E, Park JE, Park WY, et al. Apoptotic effect of compound K in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and Akt/mTOR/c-Myc signaling. *Phytotherapy Research* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jan 11];35(7):3812–20. Available from: <https://doi.org/10.1002/ptr.7087>
336. Sun L, Yan Y, Lv H, Li J, Wang Z, Wang K, et al. Rapamycin targets STAT3 and impacts c-Myc to suppress tumor growth. *Cell Chemical Biology* [Internet]. 2022 Mar 17;29(3):373–385.e6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451945621004402>
337. Fröjmark AS, Badhai J, Klar J, Thuveson M, Schuster J, Dahl N. Cooperative effect of ribosomal protein s19 and Pim-1 kinase on murine c-Myc expression and myeloid/erythroid cellularity. *Journal of Molecular Medicine* [Internet]. 2010 Jan 1;88(1):39–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0558-9>
338. Chen KC, Hsu WH, Ho JY, Lin CW, Chu CY, Kandaswami CC, et al. Flavonoids Luteolin and Quercetin Inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction. *J Food Drug Anal*. 2018 Jul;26(3):1180–91.
339. Zhang C, Qie Y, Yang T, Wang L, Du E, Liu Y, et al. Kinase PIM1 promotes prostate cancer cell growth via c-Myc-RPS7-driven ribosomal stress. *Carcinogenesis* [Internet]. 2019 Mar 12 [cited 2024 Jan 11];40(1):52–60. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy126>
340. Liao JM, Zhou X, Gatignol A, Lu H. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene*. 2014 Oct 9;33(41):4916–23.
341. Clausen DM, Guo J, Parise RA, Beumer JH, Egorin MJ, Lazo JS, et al. In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of 10074-G5, a novel small-molecule inhibitor of c-Myc/Max dimerization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Dec;335(3):715–27.
342. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S, Mele DA, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16669–74.
343. Coudé MM, Braun T, Berrou J, Dupont M, Bertrand S, Masse A, et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17698–712.
344. Hou L, Hou X, Wang L, Li Z, Xin B, Chen J, et al. PD98059 impairs the cisplatin-resistance of ovarian cancer cells by suppressing ERK pathway and epithelial mesenchymal transition process. *Cancer Biomark*. 2017 Dec 12;21(1):187–94.
345. Madamsetty VS, Mohammadinejad R, Uzielienė I, Nabavi N, Dehshahri A, García-Couce J, et al. Dexamethasone: Insights into Pharmacological Aspects, Therapeutic Mechanisms, and Delivery Systems. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 May 9;8(5):1763–90.

346. Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5310–20.
347. Kapralova K, Jahoda O, Koralkova P, Gursky J, Lanikova L, Pospisilova D, et al. Oxidative DNA Damage, Inflammatory Signature, and Altered Erythrocytes Properties in Diamond-Blackfan Anemia. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 17;21(24).
348. Bursać S, Brdovčak MC, Pfannkuchen M, Orsolić I, Golomb L, Zhu Y, et al. Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 11;109(50):20467–72.
349. Pfister AS, Kühl M. Of Wnts and Ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018 Jan;153:131–55.
350. Dannheisig DP, Bächle J, Tasic J, Keil M, Pfister AS. The Wnt/ β -Catenin Pathway is Activated as a Novel Nucleolar Stress Response. *J Mol Biol.* 2021 Jan 22;433(2):166719.
351. Fan J, Wray J, Meng X, Shen Z. BCCIP is required for the nuclear localization of the p21 protein. *Cell Cycle.* 2009 Sep 15;8(18):3019–24.
352. Ba Q, Li X, Huang C, Li J, Fu Y, Chen P, et al. BCCIP β modulates the ribosomal and extraribosomal function of S7 through a direct interaction. *J Mol Cell Biol.* 2017 Jun 1;9(3):209–19.
353. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 2008 Dec;83(6):769–80.

12 Seznam důležitých zkratk a symbolů

Rodina BET (Bromodomain and Extra-terminal Domain),

BCR (The Breakpoint Cluster Region Protein),

eIF4A (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A),

PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase),

CDK (Cyclin-dependent kinase),

PIM1 (Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase),

PIN1 (Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerase, NIMA-Interacting 1),

PP2A (Protein phosphatase 2A),

SKP2 ((S-Phase Kinase Associated Protein 2),

USP7 (Ubiquitin Specific Peptidase 7),

JAK2 (Janusova kináza 2),

STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3),

NF-κB (Nuclear Factor Kappa B),

Src (SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase),

FBXW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7),

PLK-1 (Polo Like Kinase 1),

HUWE1 (HECT, UBA And WWE Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1),

HDAC (Histone Deacetylase),

Max (MYC Associated Factor X),

Myc (MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor).

13 Curriculum Vitae

Jméno a příjmení: Agáta Kubíčková
Narozena: 6.5.1992 v Olomouci
Bydliště: Jílová 503/35, 779 00 Olomouc

Vzdělání:
2016 – nyní Onkologie – doktorské studium
Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta
2014 – 2016 Molekulární a buněčná biologie – magisterské studium
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
2011 – 2014 Molekulární a buněčná biologie – bakalářské studium
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

Pedagogická činnost:

Vedoucí tří bakalářských prací studentek oboru Molekulární a buněčné biologie Kristýny Valáškové, Daniely Uhrinové a studentky oboru Experimentální biologie Hany Jančíkové.
Vyučující předmětů:

KBB / BAKP Bakalářská práce
KBB / ZBAKP Úvod do bakalářské práce
OCH / POC Cvičení z bioorganické chemie

Seznam publikovaných prací:

- 1) Kubickova A, De Sanctis JB, Hajdúch M. Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 15;24(24). IF = 5.6
- 2) Hodoň J, Frydrych I, Trhlíková Z, Pokorný J, Borková L, Kubíčková A, et al. Triterpenoid pyrazines and pyridines - Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, preparation of prodrugs. *Eur J Med Chem.* 2022 Dec 5;243:114777. IF = 6.7
- 3) Annadurai N, Hrubý J, Kubíčková A, Malina L, Hajdúch M, Das V. Time- and dose-dependent seeding tendency of exogenous tau R2 and R3 aggregates in cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023 Apr 23;653:102–5. IF = 3.1
- 4) Kotulova J, Lonova K, Kubickova A, Vrbkova J, Kourilova P, Hajdúch M, et al. 2-CI-IB-MECA regulates the proliferative and drug resistance pathways, and facilitates chemosensitivity in pancreatic and liver cancer cell lines. *Int J Mol Med.* 2022 Mar;49(3):31. IF = 4.1
- 5) Macečková Z, Kubíčková A, Sanctis JBD, Hajdúch M. Effect of Glucocorticosteroids in Diamond-Blackfan Anaemia: Maybe Not as Elusive as It Seems. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 8;23(3). IF = 5.9
- 6) Kubickova A, Maceckova Z, Vojta P, Ondra M, Volejnikova J, Koralkova P, et al. Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of

erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress. Blood Cells Mol Dis. 2022 Nov;97:102690. IF = 2.4

Kapitoly v knize:

- 1) Kapitola s názvem Transient transfection v knize: Agrawal K, Bouchal J, Das V, Drábek J, Džubák P, Hajdúch M, Koberna K, Ligasová A, Mistrík M, Sanctis JBD, Srovnal J Laboratory techniques in cellular and molecular medicine , 1st edition, Palacký University Olomouc, 2021, ISBN 978-80-244-6049-9
- 2) Kapitola s názvem Stable transduction by lentiviral particles v knize: Agrawal K, Bouchal J, Das V, Drábek J, Džubák P, Hajdúch M, Koberna K, Ligasová A, Mistrík M, Sanctis JBD, Srovnal J Laboratory techniques in cellular and molecular medicine , 1st edition, Palacký University Olomouc, 2021, ISBN 978-80-244-6049-9

Patenty a užité vzory:

- 1) Povrchově modifikované částice (Cígler) Patent: CZ 309422; Uděleno: 28.12.2022; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Vynálezci: Hajdúch Marián, Jaworek Hana, Ondra Martin, Kubíčková Agáta, Zveřejněná přihláška PCT/CZ2021/050103 pod WO 2022/068982 (7.4.2022).
- 2) Povrchově modifikované částice (Cígler) Užité vzor: CZ 34808; Uděleno: 10.2.2021; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Vynálezci: Mgr: Hajdúch Marián, Jaworek Hana, Ondra Martin, Kubíčková Agáta.
- 3) 1,2-dithiolanová sloučenina pro modifikaci povrchu kovů (Cígler) Užité vzor: CZ 34573; Uděleno: 24.11.2020; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Hajdúch Marián, Jaworek Hana, Ondra Martin, Kubíčková Agáta

Konferenční příspěvky:

- 1) Tracing main c-Myc isoforms endogenous expression for targeted anti-cancer therapies. Czech Annual Cancer Research Meeting, Olomouc, Česká republika, 20.-22.12.2023.
- 2) Tracing c-Myc Endogenous Expression by NanoBiT Technology for Small Molecules Identification. IMTM Reactor, Velké Karlovice, Česká republika, 3.-5.10.2022.
- 3) Tracing c-Myc Endogenous Expression for Small Molecules Discovery. EACR Conference on Cancer Metabolism, Bilbao, Španělsko, 11.–13.10.2022.
- 4) Unique reporter model for c-Myc protein level monitoring under physiological conditions. Czech Annual Cancer Research Meeting, Olomouc, Česká republika, 1.-2.12.2022.

- 5) A new high-throughput screening method for identifying c-Myc inhibitors. Translational Medicine Explained on Translational Research and Medicine Development, Barcelona, Španělsko, 13.-17.2.2023.
- 6) Tracing main c-Myc isoforms endogenous expression for targeted anti-cancer therapies. EACR 2023 Congress, Turín, Itálie, 12.–15.6. 2023.
- 7) Diamond-Blackfan Anemia disease models – development and phenotypization. OL4PERMED, Olomouc, Česká republika, 25-27.11.2021.
- 8) CRISPR/Cas9 technology - creating cellular models for human genetic disorders. IMTM Reactor, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika, 6.-8.10.2021.
- 9) Phenotypic changes caused by novel SNV of RPS7 gene. Interdisciplinary meeting of young life scientists, Milovy, Česká republika, 17.-20.5.2021.
- 10) Kubickova A, Vojta P, Ondra M, Volejnikova J, Maceckova Z, Koralkova P, Saxova Z, Mojzickova R, Cermak J, Horvathova M, Pospisilova D, Hajduch M Phenotypic changes caused by novel SNV of RPS7 gene. 25th European Hematology Association Congress, on-line, 2020.
- 11) CRISPR/Cas9 technology not only a genome editing tool. IMTM Reactor, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika, 7.-9.9.2020.
- 12) CRISPR/Cas9 technology as a tool for the development of Diamond Blackfan Anemia cellular models. The International CRISPR and Gene Editing Symposium, on-line, 23.9.2020.
- 13) SNV in RPS7 causes Diamond Blackfan anemia. IMTM Reactor, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika, 16.9. – 18.9. 2019.
- 14) Modulation of transcription by CRISPR/dCas9 technology. IMTM Reactor, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika, 16.9. – 18.9. 2019.
- 15) Biological role of novel SNV of RPS7 in Diamond Blackfan anemia-model of ribosomal alterations in cancer. XV. DIAGNOSTIC, PREDICTIVE AND EXPERIMENTAL ONCOLOGY DAYS, Olomouc, Česká republika, 25.11. – 27.11. 2019.
- 16) Lentiviral CRISPR libraries for identification and validation of molecular mechanisms of action. IMTM Reactor, Pastviny, Česká republika, 18.9. – 21.9. 2018.
- 17) Development of human c-Myc reporter cell line. IMTM Reactor Ph.D. konference, Pastviny, Česká republika, 14.6. – 16.6. 2017.

Ocenění:

Cena děkana za významnou publikační činnost v roce 2022 – patent: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Mgr. Hana Jaworek, Ph.D., Mgr. Agáta Kubíčková, Mgr. Martin Ondra (ÚMTM) za patent: Povrchově modifikované částice, číslo patentu: CZ309422

14 Přílohy

Tato disertační práce shrnuje a odkazuje na následující seznam publikací, které jsou přiloženy a v textu označovány jako příloha I-III.

Příloha I:

Kubickova A, De Sanctis JB, Hajduch M. Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 15;24(24). IF = 5.6

Příloha II:

Hodoň J, Frydrych I, Trhlíková Z, Pokorný J, Borková L, Kubíčková A, *et al.* Triterpenoid pyrazines and pyridines - Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, preparation of prodrugs. *Eur J Med Chem.* 2022 Dec 5;243:114777. IF = 6.7

Příloha III:

Kubickova A, Maceckova Z, Vojta P, Ondra M, Volejnikova J, Koralkova P, *et al.* Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress. *Blood Cells Mol Dis.* 2022 Nov;97:102690. IF = 2.4



Review

Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest

Agata Kubickova^{1,2} , Juan Bautista De Sanctis^{1,2} and Marian Hajduch^{1,2,*}

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University and University Hospital Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 77900 Olomouc, Czech Republic; agata.kubickova@upol.cz (A.K.); juanbautista.desanctis@upol.cz (J.B.D.S.)

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Czech Advanced Technology and Research Institute, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 77900 Olomouc, Czech Republic

* Correspondence: marian.hajduch@upol.cz; Tel.: +420-585632082

Abstract: The transcription factor c-Myc, a key regulator of cellular processes, has long been associated with roles in cell proliferation and apoptosis. This review analyses the multiple functions of c-Myc by examining the different c-Myc isoforms in detail. The impact of different c-Myc isoforms, in particular p64 and p67, on fundamental biological processes remains controversial. It is necessary to investigate the different isoforms in the context of proto-oncogenesis. The current knowledge base suggests that neoplastic lesions may possess the means for self-destruction via increased c-Myc activity. This review presents the most relevant information on the c-Myc locus and focuses on a number of isoforms, including p64 and p67. This compilation provides a basis for the development of therapeutic approaches that target the potent growth arresting and pro-apoptotic functions of c-Myc. This information can then be used to develop targeted interventions against specific isoforms with the aim of shifting the oncogenic effects of c-Myc from pro-proliferative to pro-apoptotic. The research summarised in this review can deepen our understanding of how c-Myc activity contributes to different cellular responses, which will be crucial in developing effective therapeutic strategies; for example, isoform-specific approaches may allow for precise modulation of c-Myc function.

Keywords: c-Myc locus structure; p64 isoform; p67 isoform; c-Myc S; MycHex1; mrtl



Citation: Kubickova, A.; De Sanctis, J.B.; Hajduch, M. Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17524. <https://doi.org/10.3390/ijms242417524>

Academic Editor: Yusuke Suenaga

Received: 17 October 2023

Revised: 7 December 2023

Accepted: 13 December 2023

Published: 15 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The c-Myc transcription factor holds a central role in molecular biology and cancer research due to the orchestration of various cellular processes through intricate control of gene expression [1]. Structurally, c-Myc is a nuclear protein that forms heterodimers with the Max (MYC Associated Factor X) protein. This complex binds to specific DNA sequences, known as E-boxes, in gene promoters [2]. In terms of function, c-Myc either activates or represses the transcription of genes that are critical to cell growth, proliferation, and apoptosis. As such, it has a significant influence on the fate of cells. When regulating cell growth, c-Myc upregulates the transcription of genes encoding protein products involved in the cell cycle (such as E2Fs transcription factors, cyclins, and cyclin-dependent kinases) and suppresses the transcription of genes linked with the inhibition of mitogenic processes (for instance cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27) [3–7]. Hence, it is clear that dysregulated c-Myc activity can lead to unbridled cell proliferation [8]. This pro-proliferative effect is central to the involvement of c-Myc in tumourigenesis.

The dysregulation of c-Myc is a common hallmark of cancer [9]. Many cancer cells exhibit elevated levels of c-Myc, contributing to uncontrolled growth and the propensity to form tumours. Alterations in the c-Myc gene, such as mutations or amplifications, are frequently observed in various cancers, including breast, lung, and colorectal [10–12]. The aberrant expression of c-Myc can be triggered by many factors, including mitogenic sig-

nals, growth factors, and cellular stress responses; this highlights how a complex interplay of regulatory mechanisms is involved in the control of c-Myc [2].

In addition to stimulating cell growth, c-Myc is also involved in apoptosis, or the process of programmed cell death [13,14]. This dual role adds a further level of complexity to how c-Myc contributes to tumorigenesis. Under certain conditions, c-Myc can promote cell survival by upregulating anti-apoptotic genes, which can block pro-apoptotic signals in cancer cells [15]. However, c-Myc can also induce apoptosis when required to safeguard against the uncontrolled proliferation of damaged cells. These paradoxical roles underscore how critical c-Myc is to maintaining a healthy balance within each cell.

In addition to involvement in cancer, c-Myc also plays a pivotal role in stem cell regulation [16]. More specifically, c-Myc is instrumental in maintaining the pluripotency of embryonic stem cells, which ensures that these cells can differentiate into various cell types; this includes erythroid precursors, which demonstrate a decreased potential for differentiation in certain inherited diseases, such as Diamond-Blackfan anaemia [17,18]. Additionally, c-Myc is crucial in the reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs), a role which is highly relevant for regenerative medicine and tissue engineering [19].

Establishing that c-Myc plays a pivotal role in tumorigenesis has led researchers to focus on developing therapies that target this transcription factor [20]. The prevailing avenue of research is exploring how to selectively inhibit the c-Myc activity in cancer cells to disrupt uncontrolled proliferation, which holds immense promise for how cancer is treated.

c-Myc regulates a wide array of cellular processes, ranging from cell growth to programmed cell death [21]. Influences on both uncontrolled cell growth and apoptosis underscore why c-Myc is highly relevant to cancer research. The ongoing quest to unravel the complex pathways and conditions that affect c-Myc function may uncover the basis for how to develop targeted therapies for more effective cancer treatment.

The regulation and functioning of c-Myc significantly impacts the phenotype of a cell. However, despite intensive study, the mechanisms through which proteins encoded by the c-Myc locus are involved in diverse cellular processes remain poorly understood [22–24]. The very diverse functions of this transcription factor may be due to the complex and understudied polycistronic locus. A closer understanding of the structure and function of the individual c-Myc isoforms may be a key in the development of safe targeted therapies against different c-Myc dependent tumour types.

The c-Myc proteins share many features with other transcriptional regulators. These proteins are localised to the nucleus, can be phosphorylated, and have relatively short half-lives, all characteristics which suggest that these proteins are regulated at various levels [25,26]. Specific molecular functions have been assigned to the C- and N-terminal regions of c-Myc-encoded proteins. For instance, the C-terminal domain of c-Myc proteins shares structural similarities with members of the basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ) superfamily of transcription factors [23] (Figure 1). The dimerisation of c-Myc with Max, a member of the bHLH-LZ family [27], through the HLH-LZ region of both proteins, facilitates sequence-specific binding to the CACGTG motif or E-box Myc site (EMS) in DNA [28,29]. The c-Myc proteins can stimulate transcription by binding to EMS sequences, whereas an excess of Max antagonises this transcriptional activity in cells [30–32]. Activation of transcription by the c-Myc proteins also requires intact N- and C- domains. The N-terminal region of the c-Myc proteins functions as a transactivation domain, and deletions of highly conserved regions within the N-terminal domain, called Myc boxes, reduce its transactivation function [32,33] (Figure 1). In addition, transactivation can be modulated by proteins that interact with the N-terminal domain of c-Myc proteins, including the TATA-binding protein (TBP) and the pRb-like protein p107 [34,35].

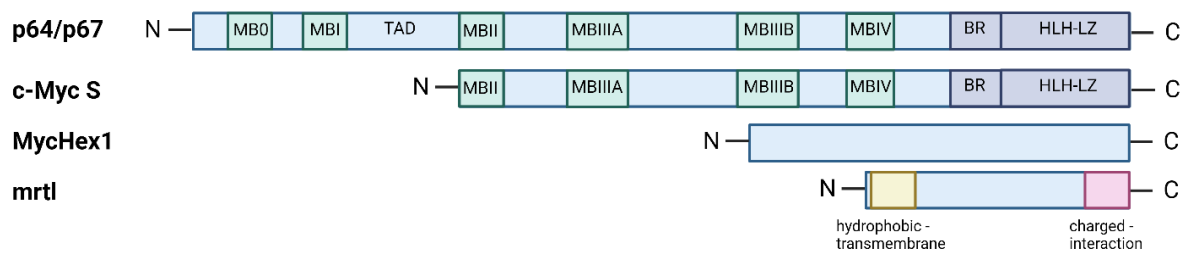


Figure 1. Schematic representation of the protein structures encoded by the c-Myc locus. The N- and C- labels represent the N-terminal and C-terminal regions of the proteins, respectively. The full-length protein structures are indicated by light blue rectangles. Conserved regions of the Myc boxes are labelled MB0 to MBIV and visualised by light green rectangles. The transcriptional activation domain (TAD) is located between MBI and MBII of p64 and p67. The dimerisation domains of p64, p67, and c-Myc S are shown in dark blue and are divided into the basic region (BR) and the helix-loop-helix leucine zipper domain (HLH-LZ). In the case of mrtl, the hydrophobic region is shown in light yellow and the charged region is represented by a light red rectangle. The structure of MycHex1 has not yet been characterised in detail. Created with BioRender.com.

c-Myc primarily functions in the nucleus as a transcription factor for three RNA polymerases. The c-Myc/Max heterodimer, via the activation or repression of pol II target genes, is critical in progression to the cell cycle from quiescence [2,36–40]. c-Myc significantly impacts the overall rate of intracellular protein synthesis by stimulating the activity of pol I (rRNA synthesis) and pol III, which are involved in the production of many components of the translational apparatus (e.g., translation initiation factors, ribosomal proteins) [41–45]. As such, c-Myc^{-/-} cells have been found to show reduced RNA and protein synthesis rates, along with prolonged cell division [46].

The ability to induce growth arrest and apoptosis is an intrinsic property of proteins encoded by the c-Myc locus [13,47,48]. However, naturally occurring truncations, mutations, or rearrangements in the c-Myc sequence rarely, if ever, adversely affect the mitogenic or pro-apoptotic activities of c-Myc proteins. This also applies—to some extent—to a viral analogue of c-Myc, v-Myc, which is a viral oncogene found in certain retroviruses. The genetic sequences of v-Myc and c-Myc share certain similarities, while the gene products demonstrate significant differences in functions. For instance, v-Myc is often more potent in promoting cancer than c-Myc due to differences in regulation and expression [38–40]. However, many human tumours exhibit genetic or epigenetic changes in c-Myc that disrupt the pathway underlying cell death to inhibit the pro-apoptotic activity of c-Myc [49–52]. However, it should be noted that the mechanism through which cell death is activated often remains intact, even in advanced malignancies, but is impeded so that proliferation is ultimately favoured [53–56].

The next section will provide a closer look at the locus structure of the central transcription regulator c-Myc.

2. Structure of the c-Myc Locus

In humans, the production of more than one protein from a single genetic locus or mRNA is an event that occurs in some particular genes. One such case is the p16^{INK4a}/p14^{ARF} locus, which encodes two distinct proteins with overlapping coding sequences but different reading frames [57,58]. Furthermore, it is well known that the human c-Myc locus, particularly the polycistronic c-Myc P0 transcript, can produce several distinct protein products.

The human c-Myc locus, which is located on chromosome 8q24, has a complex structure (Figure 2). For instance, transcription can be initiated by binding to one of four alternative promoters (P0, P1, P2, and P3), the last of which is located between exons 1 and 2 of the gene [8,59–61]. The locus contains the coding sequences for two longer isoforms of the c-Myc protein, p67 (also termed c-Myc1) and p64 (referred to as c-Myc2), one truncated isoform of c-Myc S (p55), and the protein products of two ORFs, designated as mrtl and

MycHex1. The sequences of *mrtl* and MycHex1 do not overlap with the c-Myc sequences, except for a minor overlap of 19 bp between the C-terminal sequence of MycHex1 and the N-terminal sequence of c-Myc p67, which are not in the same reading frame (Figure 2). P1 and P2 are the two most commonly used promoters, contributing to approximately 90% of the c-Myc transcripts in cells [62]. Translation of c-Myc mRNA can be initiated at one of two different initiation codons (CUG or AUG), leading to the synthesis of two protein isoforms (p64 and p67) [63]. p64 Myc is the predominant gene product, and most likely responsible for the oncogenic properties of the c-Myc locus [64]. In comparison to p64, the N-terminus of p67 Myc contains 14 additional amino acids and appears to have strong tumour suppressor properties. Thus, the p64:p67 ratio has a large influence on cell response [65].

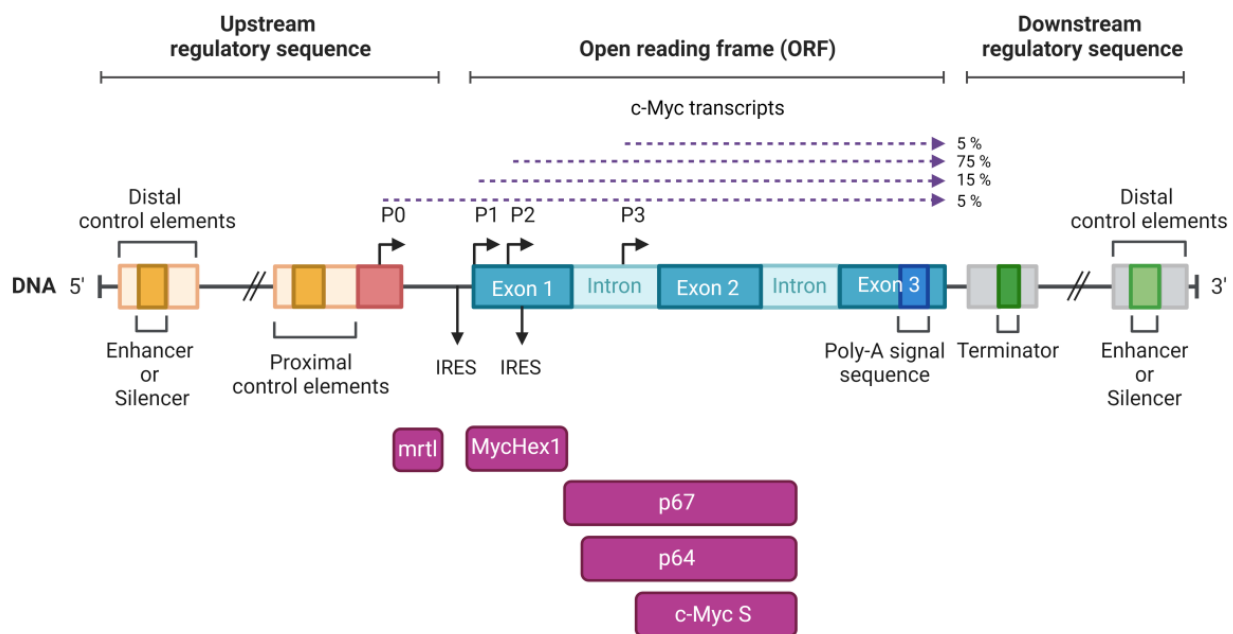


Figure 2. Diagram showing the structure of the c-Myc locus. The transcript starting from the P0 promoter encodes the *mrtl* and MycHex1 mRNAs, which are located upstream of the coding sequences for *p67* and *p64* mRNAs. The positions of the four transcription start sites (P0, P1, P2, P3) are indicated by bent arrows. Exons are indicated by dark blue rectangles and introns are indicated by light blue rectangles. Transcription rates initiated from four promoters are indicated by dashed dark purple arrows. Below the DNA coding sequence are all transcripts of the c-Myc locus indicated in light purple rectangles. Created with BioRender.com.

3. Two Main c-Myc Isoforms: p64 and p67

The two major isoforms of c-Myc, p64 and p67, have been found in all vertebrate species studied to date [63]. In mammalian and avian cells, these two proteins are produced by the alternative initiation of translation at distinct in-frame codons, namely, the AUG codon for p64 and the CUG codon for p67 [63]. The evolutionary conservation of this c-Myc locus expression pattern over 400 million years suggests that multiple isoforms may play an essential role in c-Myc function. Translation of the p67 protein begins at the CUG codon, and thus results in an amino-terminal extension of 14 amino acids relative to the p64 protein [63]. Several lines of evidence suggest that the p67 protein is involved in cell growth and tumourigenesis. For instance, disruption of p67 synthesis has been observed in many Burkitt's lymphomas [25,63]. In addition, the two forms of the c-Myc protein are differentially expressed during cell growth. When cell confluence increases, the p67 isoform predominates. This suggests that the p67 protein plays a role in growth inhibition, whereas the p64 and v-Myc proteins have been shown to stimulate growth.

Many of the c-Myc gene rearrangements observed across various cancer types have been found to involve changes in exon 1. These often include complete deletion of exon 1 in the case of chromosomal translocations and retroviral translocations, along with minor deletions, point mutations, and proviral insertions in intron 1 [66]. The prevailing interpretation for this dynamic is that these changes only affect the regulation of c-Myc expression as the region encoding the protein with the AUG initiation codon in exon 2 is conserved. The first exon of c-Myc contains regions and regulatory elements that are likely important in controlling expression. These include sites for the addition of a methylguanosine cap to c-Myc mRNA at the 5' end of exon 1 and a region that controls the elongation of nascent mRNA transcripts, as well as a possible enhancer element near the 3' end of exon 1 [60,67–71]. Thus, removal of the first exon—which occurs in a series of rearrangements of the c-Myc locus—alters the c-Myc promoter structure and halts the expression of isoform p67, which is implicated in growth inhibition. Therefore, removal of the first exon of c-Myc likely leads to deregulation of the cell cycle and metabolism.

There also appear to be functional differences between the p64 and p67 proteins. For instance, p67 is a potent and specific transactivator of the enhancer element EFII via the C/EBP binding site (CCAAT-enhancer-binding protein, TTATGCAAT sequence). The C/EBP family consists of six related transcription factors which share a basic leucine zipper domain and are simultaneously classified as tumour suppressors, proto-oncogenes, and regulators of differentiation [72]. This transactivation has been observed in numerous cell types and species.

In contrast to the strong transactivation capacity of p67, the p64 c-Myc isoform either fails to transactivate the EFII enhancer element or represses EFII-driven transcription (Figure 3). In addition, there is evidence that v-Myc proteins also significantly repress transcription through interactions with the EFII enhancer element [65]. Both p64 and p67 proteins could transactivate via the canonical EMS sequence. Since both isoforms have the same C-terminal domain, the opposing effects of these proteins on EFII-driven transcription are most likely due to differences in N-terminal domains [27]. A possible explanation is that the amino terminal extension of 14 amino acid residues in p67 causes an overall conformational change in the N-terminal region, which contains the transactivation domain. These structural variations between p64 and p67 may result in unique interactions with transcriptional complexes based on specific DNA binding sites [65,73].

In addition to transcriptional activation, c-Myc has several distinct molecular functions, including transcriptional repression and direct modulation of DNA synthesis [23,74]. The N-terminal region of c-Myc is essential for the transcriptional repression of the cyclin D1 promoter [74]. The finding that p64 and p67 differentially transactivate the binding site for C/EBP yet can activate transcription of the EMS sequence suggests both distinct and overlapping functions for these two proteins. p67-regulated transcription of the C/EBP sequence indicates that the intracellular proportions of p64, p67, and C/EBP family members may determine the overall transcription rates of genes containing this sequence. Research conducted by Freytag and Geddes in 1992 highlighted that C/EBP and p64 proteins have contrasting roles in regulating adipogenesis [75]. Furthermore, there is evidence that an increase in p67 synthesis appears to be driven by methionine availability in the growth medium [76]. Thus, modulation of p67 levels may represent an early cell response to adapting to growth under nutrient deprivation. The different, and sometimes opposing, manners in which the two c-Myc proteins regulate the transcription may also apply to varying roles in the regulation of cellular metabolism.

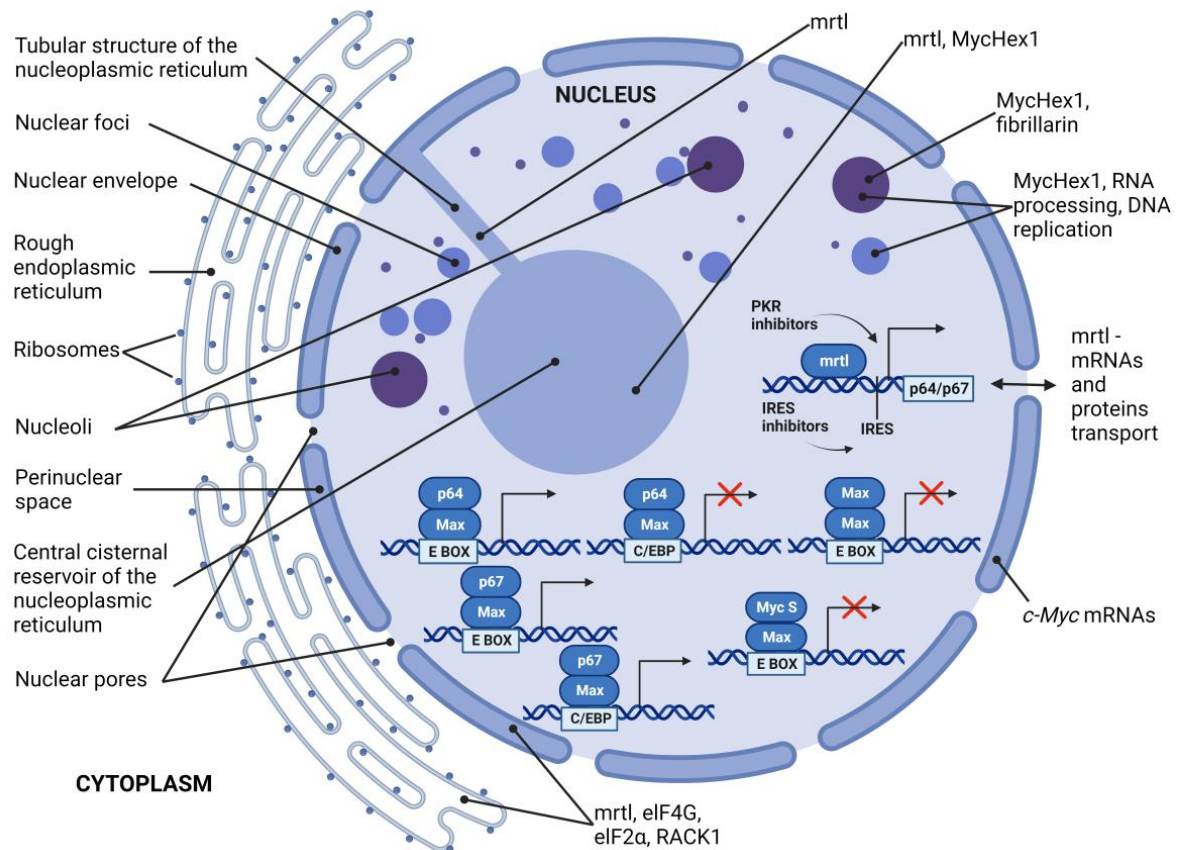


Figure 3. Schematic representation of the interaction and localisation of c-Myc isoforms. p64/Max, p67/Max, Myc S/Max, and Max/Max transcriptional activities on E-box and C/EBP responsive elements are depicted in the lower part of the figure, whereas localisation and function of mrtl and MycHex1 are shown in the upper part of the figure. Created with BioRender.com.

Prior research has elucidated one of the cellular signalling mechanisms that regulates the intracellular balance of p64 and p67 levels. For instance, PKR (or EIF2AK2, eukaryotic translation initiation factor 2- α kinase 2) has been shown to enhance c-Myc transcription via interactions with NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells) and STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). PKR activity also significantly influences c-Myc mRNA stability, translation, and subsequent protein stability [77]. Treating cells with a PKR inhibitor or performing siRNA-mediated knock-down of PKR results in heightened intracellular levels of p67. In contrast, PKR overexpression increases intracellular levels of p64 (Figure 3). This event is highly relevant to tumourigenesis, as the balance between p64 and p67 significantly impacts various cellular responses, such as proliferation, cell cycle arrest, and apoptosis. Interestingly, under normal growth conditions, PKR overexpression enhances cell growth, whereas the siRNA-mediated knock-down of PKR, or treatment with a PKR inhibitor, results in cell cycle arrest [77].

C/EBP overexpression also exerts a growth inhibitory effect [78]. However, since p64 and p67 proteins transactivate expression through EMS sequences, they may share some biological functions. It is likely that the disruption of p67 protein synthesis by genetic mutation or rearrangement, as is the case in Burkitt's lymphoma, causes cells to lose the growth inhibitory response under nutrient depletion, which could contribute to oncogenesis.

4. The Third Isoform c-Myc S

In addition to p64 and p67, human, mouse, and avian cells also express smaller c-Myc proteins. These truncated proteins, termed c-Myc S, are produced by leaky scanning at conserved AUG codons downstream of the initiation sites for p64 in exon 2 of c-Myc

(Figure 2) [79]. c-Myc S lacks most of the N-terminal transactivation domain present in p64 and p67 but retains the C-terminal dimerisation and DNA-binding domains (Figure 1). Like p64 and p67, the c-Myc S proteins are localised to the nucleus, can be phosphorylated, and are relatively unstable. Significant levels of c-Myc S, approaching those of p64 and p67, have been transiently observed during the rapid growth phase of several different cell types [79,80]. The c-Myc S proteins never activate the transcription of certain genes but are able to inhibit p64 and p67, which suggests a dominant-negative inhibitory function [80] (Figure 3). These smaller c-Myc proteins are obviously not expected to function as p64 and p67, while the finding that tumours express high levels of c-Myc S during the rapid cell growth phases suggests that these proteins do not impede the proliferative effects of p64 and p67. As such, although c-Myc S is characterised by the loss of most of the transcriptional activation domain found in both p64 and p67, it is a promoter of cell proliferation [79].

5. MycHex1 and mrtl

Evidence of an internal ribosomal entry site (IRES) designed solely for the translation of MycHex1 mRNA has sparked interest in deciphering the physiological roles of c-Myc P0 mRNA and the protein MycHex1 (Figure 2) [62]. Both mrtl and MycHex1 are found only in primates, in contrast to c-Myc, which is conserved across all vertebrates. mrtl and MycHex1 are relatively basic proteins, with pI values of 8.65 and 11.87, respectively. Full-length mrtl has 114 amino acids (12.5 kDa) and is rich in arginine. The N-terminal region, which is highly hydrophobic, is thought to be the only transmembrane domain (Figure 1) [40]. The hydrophobic region is interrupted by a series of charged amino acids (RSER). Another, slightly smaller isoform of mrtl exists, designated as mrtx (98 amino acids, 10.8 kDa), and lacks most of the transmembrane domain. Two myristoylation sites in the central region of the protein could further facilitate the membrane association of mrtl. The C-terminal sequence contains several examples of alternation between positively- and negatively-charged residues, and shows considerable homology to several RNA-binding proteins [40]. It is likely that this region serves as an interaction domain with other proteins [81]. Moreover, there are four sites at which serine residues can be phosphorylated (consensus substrates for protein kinase C, casein kinase II, protein kinase A, and protein kinase G), with two located in the middle of charged residues within the C-terminal domain [40].

Regulation of c-Myc expression at the translational level is also important to normal cell functioning [76,82,83]. The transcription of mrtl in cis from c-Myc mRNA places mrtl near regulatory sequences and controls the efficiency of c-Myc translation (Figure 2). The primary determinant of c-Myc translational regulation is the IRES sequence, which is located in the 5' UTR between the coding sequences of mrtl and c-Myc (Figure 2) [84,85]. As such, it is possible that mrtl regulates c-Myc translation through modulation of IRES activity. From a genetic perspective, mrtl and c-Myc are very closely linked, so gene amplification or chromosomal translocations involving c-Myc will often affect the mrtl coding sequence [40]. Given this relationship between mrtl and c-Myc, it is plausible that mrtl may contribute to the role that the c-Myc locus plays in oncogenesis.

Within the cell, mrtl is mainly found in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum (ER), and tubular and cisternal structures of the nucleoplasmic reticulum (NR) [40] (Figure 3). Because the nuclear envelope and rough ER are studded with ribosomes, it is possible that mrtl is in close proximity to the translational apparatus. Thus, mrtl could be involved in the regulation of translation. There is already empirical evidence for this, as mrtl was found to be associated with the translation initiation factors eIF4G (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 G) and eIF2 α (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α), as well as the integral 40S ribosomal protein RACK1 (Receptor For Activated C Kinase 1) [40].

In contrast, MycHex1 is present in nuclear foci, and only colocalised with mrtl at a single nuclear site, referred to as the central cisternal reservoir of the nucleoplasmic reticulum [86] (Figure 3). Prior research has shown that MycHex1 and fibrillarin shares their position at several discrete nuclear foci labelled with anti-BrdU antibody [86]. Fib-

rillarin is a ribonucleoprotein and nucleolar marker (snRNP) involved in ribosomal RNA processing [87]. Findings that BrdU is incorporated into DNA suggest that the nuclear loci at which MycHex1 is present may represent sites of DNA replication. As a highly basic protein, MycHex1 can associate with either DNA or RNA to facilitate replication or RNA processing, respectively [86].

Co-immunoprecipitation assays have revealed that endogenous mrtl and MycHex1 interact with RACK1, c-Myc, fibrillarin, coilin, and even with each other [86]. This indicates that both proteins may bind to a wide array of partner molecules within the nucleus and cytoplasm. Given the structural characteristics of mrtl and MycHex1, it is plausible that these proteins serve to anchor essential protein assemblies by targeting protein regions that include amino acid residues with alternating charges. Notably, the abundance of arginine and serine in both proteins is indicative of similarity to numerous RNA-binding proteins [86].

The cell nucleus has a sophisticated structure and houses several unique parts, such as nuclear bodies, nucleoli, Cajal bodies, nuclear speckles, paraspeckles, PML bodies (promyelocytic leukaemia), and Polycomb bodies. Notably, these nuclear entities lack a defining membrane, which enables the seamless interchanging of contents with the adjacent nucleoplasm [88]. MycHex1 might play a pivotal role in the formation and fortification of certain nuclear bodies. The ability of MycHex1 to undergo homo-oligomerisation, when combined with the co-immunoprecipitation findings that this protein has several potential binding partners, aligns well with this hypothesised role [89]. The nucleoplasmic reticulum comprises a series of membranous tubules within the nucleus to form the central cisternal reservoir [90–94]. This structure involves folds of the nuclear envelope and has a similar composition as the cytoplasm. The numerous folds in this nuclear structure significantly increase the surface area and enhance contact between the nucleus and cytoplasm. The distribution of mrtl across the nuclear envelope and nucleoplasmic reticulum alludes to a mechanism in which mrtl mediates the transport of certain molecules between the nucleus and cytoplasm [40] (Figure 3).

It is widely recognised that proteins which will be fully or partially integrated into the cell membrane will first be processed at the endoplasmic reticulum (ER) membrane via interactions between a signal peptide and a signal recognition particle. Analogously, proteins like c-Myc, which are localised to the nucleus, might undergo a similar co-translational transfer so that the synthesised protein is transported across the nuclear membrane into the nucleoplasm. c-Myc mRNA is predominantly found in the perinuclear area (Figure 3). The distinct presence of mrtl at the nuclear membrane and nucleoplasmic reticulum, coupled with structural similarities to ATP-binding cassette (ABC) transport proteins, hints at a potential role in translocating nascent c-Myc into the nucleus [95]. In addition to specific regulation of c-Myc translation, mrtl might also influence the translational efficiency of other mRNAs. Indications of a broader cellular role for mrtl include extensive presence across the endoplasmic and nucleoplasmic reticulum, consistent accumulation in cells, and deep integration within cellular structures. As such, mrtl could facilitate interactions between mRNA, translational machinery, and the intracellular membrane network (Figure 3). As mrtl is positioned at a junction of the cytoplasm and nucleus, it might play a crucial role in synchronising the movement of mRNAs and nascent proteins between the cytoplasm and nucleus [96].

6. Targeting c-Myc in Cancer

c-Myc is implicated in various cancers and other diseases, including but not limited to lymphomas, breast cancer, lung cancer, colorectal cancer, and prostate cancer. The role and significance of c-Myc may vary across different cancer types [9]. High levels of c-Myc expression in certain cancers has been correlated with poor prognosis. It is often associated with more aggressive tumour behaviour, increased likelihood of metastasis, and resistance to treatment. Changes in c-Myc expression levels during the course of treatment may

serve as an indicator of treatment response. Monitoring c-Myc levels can help assess the effectiveness of therapies and guide treatment decisions [9].

The c-Myc transcription factor has emerged as a significant target for therapeutic intervention, particularly in the context of cancer and other diseases as well [97,98]. Given its crucial role in promoting tumorigenesis and its frequent dysregulation in various malignancies, researchers have explored two primary strategies for inhibiting c-Myc: direct inhibition of its activity and indirect approaches that modulate its expression or stability [99].

Direct inhibition involves the development of therapeutics designed to disrupt its transcriptional activity, modulate its interactions with co-factors, or cause G quadruplex stabilization in its promotor. This approach, although challenging due to the lack of well-defined binding pockets on c-Myc, holds promise for precise targeting of the oncoprotein. Further strategies in this category include antisense oligonucleotides (ASOs), which target and degrade c-Myc mRNA and miniproteins designed to block its DNA binding domain [98].

On the other hand, indirect inhibition focuses on manipulating pathways upstream or downstream of c-Myc. Strategies in this category also include modulation of c-Myc degradation and protein stability mostly via post-translational modifications [20,100].

A list of compounds belonging to direct and indirect c-Myc inhibitors is summarized in Table 1.

Table 1. A list of compounds and drug candidates directly and indirectly inhibiting c-Myc.

Indirect c-Myc inhibition	BET family inhibitors	JQ1, Birabresib (OTX015, MK-8628), Molibresib (GSK525762), RO6870810 (RG6146, TEN-0), FT-1101 (CC-95775), ZEN-3694, BMS-986158, AZD5153, BI894999, CPI-0610, GSK2820151, INCB057643, INCB054329 and GS-5829, TEN-010, ABBV-075, PROTACs ARV-771, and ARV-825
	BCR inhibition	Ibrutinib, ARQ531
	eIF4A inhibition	Silvestrol
	PI3K inhibition	Idelalisib, TGR-1202, Fimepinostat (CUDC-907), BR101801
Indirect c-Myc inhibition	CDK inhibition	Dinaclylib, TG02, KB-0742, THZ1 and THZ2, aminopyrimidines, triazane derivatives, carbamoyl sulfoximide, 4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)-N-1,3,5-triazin-2-amine
	PIM1 inhibition	AZD1208, SGI-1776, TP-3654 (SGI-9481), MEN1703, PIM447
	PIN1 inhibition	KPT-6566, Retinoid ATRA, BJP-06-005-3, Sulfopin, PIM447, SEL24 (MEN1703)
	PP2A modulation	DT-061, FTY720, OP449, Perphenazine, LB-100
	SKP2 inhibition	SZL-P1-41, FKA, Dioscin, SKPin C1
	USP7 inhibition	P22077, XL177A, GNE-6640, GNE6776, FT671
	JAK2/STAT3 inhibition	MTAP-26, and MTAP-27, WP1066, WP1130, and WP1129
	NF-κB inhibition	Guggulsterone
	Src kinase inhibition	Saracatinib
	FBXW7 activation	Oridonin, HAO472
	Aurora-A inhibition	Alisertib (MLN8054, MLN8237), CD532
	Aurora-B inhibition	AZD1152
	PLK-1 inhibition	BI6727
	HUWE1 inhibition	BI8622 a BI8626
	HDAC inhibition	Entinostat, Tucidinostat, CUDC-907

Table 1. Cont.

Direct c-Myc inhibition	G quadruplex stabilisation	CX-3543, APTO-253, IZCZ-3, cationic porphyrins (TMPyP4), quarflorin, DM039, ruthenium complexes (Se2Py3, Se2SAP)
	Antisense oligonucleotides	AVI- 4126, MYC-ASO, INX-3280, INX-6295
	Miniproteins and protein domains	OmoMYCs (OMO-103, OMO-1, FPPa-OmoMYC), Bac- ELP-H1, PNDD1, ME47, Mad, alfa-helix peptide H1
	Myc/Max interaction disruption	ME47, EN4, 3jc48-3, pyrazolo [1,5-a]-pyrimidines (MYCro1, MYCro2 a Mycro3), KJ-Pyr-9 (Kröhnke pyridine), MYCMI-6, MYCMI-7, MYCi975, MYCi361, KSI-3716, MYRA-A, MI1-PD, KI-MS2-008, quinolone derivatives (KSI-1449, KSI-2302, and KSI-3716), substituted pyrazole compounds (NUCC-0176242, and NUCC-0176248), IIA6B17, 10058-F4, 10074-G5, JY-3-094, JKY-2-169, SajM589
	Max/Max homodimers sabilization	KI-MS2-008, NSC13728

Note: BET family (Bromodomain and Extra-terminal Domain), BCR (The Breakpoint Cluster Region Protein), eIF4A (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A), PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), CDK (Cyclin-dependent kinase), PIM1 (Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), PIN1 (Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerase, NIMA-Interacting 1), PP2A (Protein phosphatase 2A), SKP2 ((S-Phase Kinase Associated Protein 2), USP7 (Ubiquitin Specific Peptidase 7), JAK2 (Janus kinase 2), STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3), NF-κB (Nuclear Factor Kappa B), Src (SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase), FBXW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7), PLK-1 (Polo Like Kinase 1), HUWE1 (HECT, UBA And WWE Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1), HDAC (Histone Deacetylase), Max (MYC Associated Factor X), Myc (MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor).

Regarding the direct influence of p64 and p67 isoforms ratio by small molecules, an extensive high throughput screening of 135,000 compounds was performed by Vaklavas and colleagues [101]. Among them, an inhibitor of IRES-mediated translation was identified. The structure and activity of this hit was greatly improved leading to the development of cpd_P. This cpd_P is causing complete loss of clonogenic survival, massive cell death, terminal differentiation, and death of putative tumour stem cells [102].

To discover another IRES modulator inhibiting c-Myc translation, named J007, a library of 145,000 compounds had to be tested. The effort certainly paid off as J007 inhibits proliferation of multiple myeloma cell lines and tumour growth in vivo [103]. Furthermore, it induces cell death in glioblastoma resistant to mechanistic targeting of rapamycin (mTOR) inhibition when J007 and the PP242 (mTOR inhibitor) are simultaneously applied [104]. The effect of J007 on the expression of p64 and p67 isoforms remains to be elucidated.

7. Discussion and Summary

The primary objective of this literature review was to comprehensively present the reasons why the c-Myc gene plays such a crucial role in determining cell fate. We have explained how expression of this oncogene can produce five different proteins, each with unique characteristics and functions. These proteins have distinct structures, are localised to different cell compartments, and exert unique roles (Table 2). This genomic arrangement highlights the multifaceted nature of c-Myc expression and functions.

Throughout this article, we have discussed the unique features of the c-Myc gene within the human genome and focused on two well-established yet controversial roles: stimulating cell cycle progression and promoting growth arrest and apoptosis. Meticulous research into these roles can provide insight as to why the expression of five distinct c-Myc protein isoforms is necessary for regulating normal c-Myc function during cell growth and arrest. The complex regulatory landscape surrounding c-Myc-mediated cellular dynamics is emphasised by the different mechanisms governing the synthesis of various c-Myc isoforms, demonstrating varying abilities to activate and regulate transcription.

Table 2. Summary and comparison of the most important findings on all isoforms of c-Myc.

	p64 Myc (c-Myc2)	p67 Myc (c-Myc1)	mrtl	MycHex1	c-Myc S
Structure	well known	contains additional 14 amino acids at its N terminus compared to p64 Myc	N-terminal region single transmembrane domain, C-terminal sequence interaction domain with homology to RNA-binding proteins	highly basic protein, capable of homo-oligomerization	c-Myc S lacks the N-terminal transactivation domain
Expression	predominant gene product of the c-Myc locus	lost in many tumours	unknown	IRES facilitates translation of the MycHex1	higher levels of c-Myc S have been transiently observed during the rapid growth phase of several cell types
	p64 Myc (c-Myc2)	p67 Myc (c-Myc1)	mrtl	MycHex1	c-Myc S
Function	oncogenic properties, p64 c-Myc isoform transactivates via the canonical EMS sequence and fails to transactivate the EFII enhancer element via the C/EBP binding site	growth inhibitory properties, p67 is a potent and specific transactivator of the enhancer element EFII via the C/EBP binding site and also transactivates via the canonical EMS sequence, mediates growth inhibitory response under nutrient depletion or contact inhibition	regulates c-Myc translation and localization to the nucleus, contributes to the role of the c-Myc locus in oncogenesis (IRES), might be part of a complex which regulates the translation, localization, or processing of mRNA	possibly involved in replication, RNA processing, and formation of nuclear bodies	c-Myc S protein lacks transactivation capacity, but it is able to inhibit p64 and p67, which suggests a dominant-negative inhibitory function
Ontology	conserved in chimpanzee, Rhesus monkey, dog, cow, mouse, rat, chicken, zebrafish, and frog		mrtl and MycHex1 are found only in primates		human, mouse, and avian cells
Subcellular localisation	mainly nucleus and cytoplasm	mainly nucleus and cytoplasm	nuclear envelope, ER, tubular and cisternal structures of the NR	colocalizes with fibrillarin	mainly nucleus and cytoplasm
Additional information	stoichiometric balance between p64 and p67 is important for cellular metabolism regulation and proliferation		colocalize in the central cisternal reservoir of the nucleoplasmic reticulum		

Previous research has shown that disruptions in the balance between two specific c-Myc protein isoforms, p64 and p67, are often observed in cancer cell lines with deregulated c-Myc activity. These imbalances in isoform proportions may directly contribute to the loss of control over cell growth, which is a common feature of tumorigenesis. Understanding the molecular intricacies that govern how c-Myc is involved in cell cycle regulation is crucial due to frequent dysregulation in human cancers. The relationships between various c-Myc protein isoforms, particularly the specific impacts on cell cycle control and arrest, open new possibilities for therapeutic interventions. The definitive understanding of the complex interplay between c-Myc, apoptosis, and cell cycle progression could significantly address a wide range of malignancies.

8. Conclusions

In conclusion, ongoing efforts to understand the regulatory mechanisms underlying c-Myc-mediated cell cycle control offer promising prospects for innovative therapeutic strategies against c-Myc-related cancers [98]. However, it is crucial to consider the dual role of c-Myc, i.e., promotion of apoptosis and support of cell survival and differentiation, when designing interventions. Further uncovering the complexities of c-Myc function will allow researchers to gain a deeper understanding of how this transcription factor contributes to cancer biology. We believe that the most effective therapeutic potential lies in restoring the balance between p64 and p67, as demonstrated by studies that included the inhibition of PKR and IRES-mediated translation [77,101,102,105,106]. The optimal utilisation of this regulatory mechanism will require additional research into other proteins that may influence this balance. Compounds that modulate PKR activity, IRES-mediated translation, and other relevant proteins could be crucial to targeted treatments for aggressive malignancies. Expanding the range of c-Myc modulators will be pivotal to the identification of alternative strategies in cases of resistance and enable more personalised treatment options for tumours of different origins.

Author Contributions: A.K. wrote the manuscript, analysed articles, and finalised the figures. J.B.D.S. and M.H. participated in the design of the review and writing and revising the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministry of Youth, School, and Education of the Czech Republic (European Translational Medicine Infrastructure EATRIS-CZ—LM2023053 and the National Institute for Cancer Research—Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102, Funded by the European Union—Next Generation EU) and Cancer Research Czech Republic.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Amati, B.; Frank, S.R.; Donjerkovic, D.; Taubert, S. Function of the C-Myc Oncoprotein in Chromatin Remodeling and Transcription. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1471*, M135–M145. [[CrossRef](#)]
2. Dang, C.V.; O'Donnell, K.A.; Zeller, K.I.; Nguyen, T.; Osthus, R.C.; Li, F. The C-Myc Target Gene Network. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 253–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yang, W.; Shen, J.; Wu, M.; Arsur, M.; FitzGerald, M.; Suldan, Z.; Kim, D.W.; Hofmann, C.S.; Pianetti, S.; Romieu-Mourez, R.; et al. Repression of Transcription of the P27(Kip1) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Gene by c-Myc. *Oncogene* **2001**, *20*, 1688–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Xiao, L.; Wang, Y.; Liang, W.; Liu, L.; Pan, N.; Deng, H.; Li, L.; Zou, C.; Chan, F.L.; Zhou, Y. LRH-1 Drives Hepatocellular Carcinoma Partially through Induction of c-Myc and Cyclin E1, and Suppression of P21. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 2389–2400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zhang, J.; Song, N.; Zang, D.; Yu, J.; Li, J.; Di, W.; Guo, R.; Zhao, W.; Wang, H. C-Myc Promotes Tumor Proliferation and Anti-apoptosis by Repressing P21 in Rhabdomyosarcomas. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 4089–4094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gruszka, R.; Zakrzewski, K.; Liberski, P.P.; Zakrzewska, M. mRNA and miRNA Expression Analyses of the MYC/E2F/miR-17-92 Network in the Most Common Pediatric Brain Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bretones, G.; Delgado, M.D.; León, J. Myc and Cell Cycle Control. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1849*, 506–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Spencer, C.A.; Groudine, M. Control of C-Myc Regulation in Normal and Neoplastic Cells. *Adv. Cancer Res.* **1991**, *56*, 1–48. [[CrossRef](#)]
9. Dhanasekaran, R.; Deutzmann, A.; Mahauad-Fernandez, W.D.; Hansen, A.S.; Gouw, A.M.; Felsner, D.W. The MYC Oncogene—The Grand Orchestrator of Cancer Growth and Immune Evasion. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2022**, *19*, 23–36. [[CrossRef](#)]
10. Gao, F.Y.; Li, X.T.; Xu, K.; Wang, R.T.; Guan, X.X. C-MYC Mediates the Crosstalk between Breast Cancer Cells and Tumor Microenvironment. *Cell Commun. Signal.* **2023**, *21*, 28. [[CrossRef](#)]
11. Chanvorachote, P.; Sriratanasak, N.; Nonpanya, N. C-Myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 609–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Di, Y.; Jing, X.; Hu, K.; Wen, X.; Ye, L.; Zhang, X.; Qin, J.; Ye, J.; Lin, R.; Wang, Z.; et al. The C-MYC-WDR43 Signalling Axis Promotes Chemoresistance and Tumour Growth in Colorectal Cancer by Inhibiting P53 Activity. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *66*, 100909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Evan, G.I.; Wyllie, A.H.; Gilbert, C.S.; Littlewood, T.D.; Land, H.; Brooks, M.; Waters, C.M.; Penn, L.Z.; Hancock, D.C. Induction of Apoptosis in Fibroblasts by C-Myc Protein. *Cell* **1992**, *69*, 119–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. McMahon, S.B. MYC and the Control of Apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a014407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kotulova, J.; Lonova, K.; Kubickova, A.; Vrbkova, J.; Kourilova, P.; Hajdich, M.; Dzubak, P. 2-CI-IB-MECA Regulates the Proliferative and Drug Resistance Pathways, and Facilitates Chemosensitivity in Pancreatic and Liver Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Med.* **2022**, *49*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yoshida, G.J. Emerging Roles of Myc in Stem Cell Biology and Novel Tumor Therapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Macečková, Z.; Kubíčková, A.; Sanctis, J.B.D.; Hajdúch, M. Effect of Glucocorticosteroids in Diamond-Blackfan Anaemia: Maybe Not as Elusive as It Seems. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kubickova, A.; Maceckova, Z.; Vojta, P.; Ondra, M.; Volejnikova, J.; Koralkova, P.; Jungova, A.; Jahoda, O.; Mojzikova, R.; Hadacova, I.; et al. Missense Mutation in RPS7 Causes Diamond-Blackfan Anemia via Alteration of Erythrocyte Metabolism, Protein Translation and Induction of Ribosomal Stress. *Blood Cells Mol. Dis.* **2022**, *97*, 102690. [[CrossRef](#)]
19. Okita, K.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature* **2007**, *448*, 313–317. [[CrossRef](#)]
20. Llombart, V.; Mansour, M.R. Therapeutic Targeting of “Undruggable” MYC. *EBioMedicine* **2022**, *75*, 103756. [[CrossRef](#)]
21. Cole, M.D. The Myc Oncogene: Its Role in Transformation and Differentiation. *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 361–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Henriksson, M.; Lüscher, B. Proteins of the Myc Network: Essential Regulators of Cell Growth and Differentiation. *Adv. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109–182. [[CrossRef](#)]
23. Lüscher, B.; Eisenman, R.N. New Light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 2025–2035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ryan, K.M.; Birnie, G.D. Myc Oncogenes: The Enigmatic Family. *Biochem. J.* **1996**, *314 Pt 3*, 713–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hann, S.R.; Eisenman, R.N. Proteins Encoded by the Human C-Myc Oncogene: Differential Expression in Neoplastic Cells. *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 2486–2497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ramsay, G.; Evan, G.I.; Bishop, J.M. The Protein Encoded by the Human Proto-Oncogene c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7742–7746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Blackwood, E.M.; Eisenman, R.N. Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc. *Science* **1991**, *251*, 1211–1217. [[CrossRef](#)]
28. Blackwell, T.K.; Kretzner, L.; Blackwood, E.M.; Eisenman, R.N.; Weintraub, H. Sequence-Specific DNA Binding by the c-Myc Protein. *Science* **1990**, *250*, 1149–1151. [[CrossRef](#)]
29. Prendergast, G.C.; Ziff, E.B. Methylation-Sensitive Sequence-Specific DNA Binding by the c-Myc Basic Region. *Science* **1991**, *251*, 186–189. [[CrossRef](#)]
30. Amati, B.; Brooks, M.W.; Levy, N.; Littlewood, T.D.; Evan, G.I.; Land, H. Oncogenic Activity of the C-Myc Protein Requires Dimerization with Max. *Cell* **1993**, *72*, 233–245. [[CrossRef](#)]
31. Amin, C.; Wagner, A.J.; Hay, N. Sequence-Specific Transcriptional Activation by Myc and Repression by Max. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 383–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kretzner, L.; Blackwood, E.M.; Eisenman, R.N. Myc and Max Proteins Possess Distinct Transcriptional Activities. *Nature* **1992**, *359*, 426–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kato, G.J.; Barrett, J.; Villa-Garcia, M.; Dang, C.V. An Amino-Terminal c-Myc Domain Required for Neoplastic Transformation Activates Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 5914–5920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gu, W.; Bhatia, K.; Magrath, I.T.; Dang, C.V.; Dalla-Favera, R. Binding and Suppression of the Myc Transcriptional Activation Domain by P107. *Science* **1994**, *264*, 251–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Maheswaran, S.; Lee, H.; Sonenshein, G.E. Intracellular Association of the Protein Product of the C-Myc Oncogene with the TATA-Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1147–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Grandori, C.; Mac, J.; Siëbelt, F.; Ayer, D.E.; Eisenman, R.N. Myc-Max Heterodimers Activate a DEAD Box Gene and Interact with Multiple E Box-Related Sites in Vivo. *EMBO J.* **1996**, *15*, 4344–4357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Boyd, K.E.; Farnham, P.J. Myc versus USF: Discrimination at the Cad Gene Is Determined by Core Promoter Elements. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 2529–2537. [[CrossRef](#)]
38. O’Connell, B.C.; Cheung, A.F.; Simkevich, C.P.; Tam, W.; Ren, X.; Mateyak, M.K.; Sedivy, J.M. A Large Scale Genetic Analysis of C-Myc-Regulated Gene Expression Patterns. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12563–12573. [[CrossRef](#)]
39. Hölzel, M.; Kohlhuber, F.; Schlosser, I.; Hölzel, D.; Lüscher, B.; Eick, D. Myc/Max/Mad Regulate the Frequency but Not the Duration of Productive Cell Cycles. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 1125–1132. [[CrossRef](#)]
40. Choi, H.; Jackson, N.L.; Shaw, D.R.; Emanuel, P.D.; Liu, Y.L.; Tousson, A.; Meng, Z.; Blume, S.W. Mrt1-A Translation/Localization Regulatory Protein Encoded within the Human c-Myc Locus and Distributed throughout the Endoplasmic and Nucleoplasmic Reticular Network. *J. Cell Biochem.* **2008**, *105*, 1092–1108. [[CrossRef](#)]

41. Arabi, A.; Wu, S.; Ridderstråle, K.; Bierhoff, H.; Shiue, C.; Fatyol, K.; Fahlén, S.; Hydbring, P.; Söderberg, O.; Grummt, I.; et al. C-Myc Associates with Ribosomal DNA and Activates RNA Polymerase I Transcription. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 303–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Grandori, C.; Gomez-Roman, N.; Felton-Edkins, Z.A.; Ngouenet, C.; Galloway, D.A.; Eisenman, R.N.; White, R.J. C-Myc Binds to Human Ribosomal DNA and Stimulates Transcription of rRNA Genes by RNA Polymerase I. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gomez-Roman, N.; Grandori, C.; Eisenman, R.N.; White, R.J. Direct Activation of RNA Polymerase III Transcription by C-Myc. *Nature* **2003**, *421*, 290–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Frye, M.; Gardner, C.; Li, E.R.; Arnold, I.; Watt, F.M. Evidence That Myc Activation Depletes the Epidermal Stem Cell Compartment by Modulating Adhesive Interactions with the Local Microenvironment. *Development* **2003**, *130*, 2793–2808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Shiiio, Y.; Donohoe, S.; Yi, E.C.; Goodlett, D.R.; Aebersold, R.; Eisenman, R.N. Quantitative Proteomic Analysis of Myc Oncoprotein Function. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5088–5096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mateyak, M.K.; Obaya, A.J.; Adachi, S.; Sedivy, J.M. Phenotypes of C-Myc-Deficient Rat Fibroblasts Isolated by Targeted Homologous Recombination. *Cell Growth Differ.* **1997**, *8*, 1039–1048. [[PubMed](#)]
47. Sakamuro, D.; Eviner, V.; Elliott, K.J.; Showe, L.; White, E.; Prendergast, G.C. C-Myc Induces Apoptosis in Epithelial Cells by Both P53-Dependent and P53-Independent Mechanisms. *Oncogene* **1995**, *11*, 2411–2418.
48. Blume, S.W.; Miller, D.M.; Guarcello, V.; Shrestha, K.; Meng, Z.; Snyder, R.C.; Grizzle, W.E.; Ruppert, J.M.; Gartland, G.L.; Stockard, C.R.; et al. Inhibition of Tumorigenicity by the 5'-Untranslated RNA of the Human c-Myc P0 Transcript. *Exp. Cell Res.* **2003**, *288*, 131–142. [[CrossRef](#)]
49. Marin, M.C.; Hsu, B.; Stephens, L.C.; Brisbay, S.; McDonnell, T.J. The Functional Basis of C-Myc and Bcl-2 Complementation during Multistep Lymphomagenesis in Vivo. *Exp. Cell Res.* **1995**, *217*, 240–247. [[CrossRef](#)]
50. Zindy, F.; Eischen, C.M.; Randle, D.H.; Kamijo, T.; Cleveland, J.L.; Sherr, C.J.; Roussel, M.F. Myc Signaling via the ARF Tumor Suppressor Regulates P53-Dependent Apoptosis and Immortalization. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2424–2433. [[CrossRef](#)]
51. Klein, G. Dysregulation of Lymphocyte Proliferation by Chromosomal Translocations and Sequential Genetic Changes. *Bioessays* **2000**, *22*, 414–422. [[CrossRef](#)]
52. Ge, K.; Duhadaway, J.; Sakamuro, D.; Wechsler-Reya, R.; Reynolds, C.; Prendergast, G.C. Losses of the Tumor Suppressor BIN1 in Breast Carcinoma Are Frequent and Reflect Deficits in Programmed Cell Death Capacity. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 376–383. [[PubMed](#)]
53. Martin, S.J.; Green, D.R. Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts? *Cell* **1995**, *82*, 349–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fearnhead, H.O.; McCurrach, M.E.; O'Neill, J.; Zhang, K.; Lowe, S.W.; Lazebnik, Y.A. Oncogene-Dependent Apoptosis in Extracts from Drug-Resistant Cells. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 1266–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Armstrong, D.K.; Isaacs, J.T.; Ottaviano, Y.L.; Davidson, N.E. Programmed Cell Death in an Estrogen-Independent Human Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-468. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3418–3424. [[PubMed](#)]
56. Fukasawa, K.; Wiener, F.; Vande Woude, G.F.; Mai, S. Genomic Instability and Apoptosis Are Frequent in P53 Deficient Young Mice. *Oncogene* **1997**, *15*, 1295–1302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Quelle, D.E.; Zindy, F.; Ashmun, R.A.; Sherr, C.J. Alternative Reading Frames of the INK4a Tumor Suppressor Gene Encode Two Unrelated Proteins Capable of Inducing Cell Cycle Arrest. *Cell* **1995**, *83*, 993–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sherr, C.J. Tumor Surveillance via the ARF-P53 Pathway. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2984–2991. [[CrossRef](#)]
59. Watt, R.; Nishikura, K.; Sorrentino, J.; ar-Rushdi, A.; Croce, C.M.; Rovera, G. The Structure and Nucleotide Sequence of the 5' End of the Human c-Myc Oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 6307–6311. [[CrossRef](#)]
60. Bentley, D.L.; Groudine, M. Novel Promoter Upstream of the Human C-Myc Gene and Regulation of c-Myc Expression in B-Cell Lymphomas. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 3481–3489. [[CrossRef](#)]
61. Ray, D.; Robert-Lézénès, J. Coexistence of a C-Myc mRNA Initiated in Intron 1 with the Normal c-Myc mRNA and Similar Regulation of Both Transcripts in Mammalian Cells. *Oncogene Res.* **1989**, *5*, 73–78. [[PubMed](#)]
62. Nanbru, C.; Prats, A.C.; Droogmans, L.; Defrance, P.; Huez, G.; Kruys, V. Translation of the Human C-Myc P0 Tricistronic mRNA Involves Two Independent Internal Ribosome Entry Sites. *Oncogene* **2001**, *20*, 4270–4280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hann, S.R.; King, M.W.; Bentley, D.L.; Anderson, C.W.; Eisenman, R.N. A Non-AUG Translational Initiation in c-Myc Exon 1 Generates an N-Terminally Distinct Protein Whose Synthesis Is Disrupted in Burkitt's Lymphomas. *Cell* **1988**, *52*, 185–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Marcu, K.B.; Bossone, S.A.; Patel, A.J. Myc Function and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 809–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hann, S.R.; Dixit, M.; Sears, R.C.; Sealy, L. The Alternatively Initiated C-Myc Proteins Differentially Regulate Transcription through a Noncanonical DNA-Binding Site. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2441–2452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Cory, S. Activation of Cellular Oncogenes in Hemopoietic Cells by Chromosome Translocation. *Adv. Cancer Res.* **1986**, *47*, 189–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Battley, J.; Moulding, C.; Taub, R.; Murphy, W.; Stewart, T.; Potter, H.; Lenoir, G.; Leder, P. The Human C-Myc Oncogene: Structural Consequences of Translocation into the IgH Locus in Burkitt Lymphoma. *Cell* **1983**, *34*, 779–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Bernard, O.; Cory, S.; Gerondakis, S.; Webb, E.; Adams, J.M. Sequence of the Murine and Human Cellular Myc Oncogenes and Two Modes of Myc Transcription Resulting from Chromosome Translocation in B Lymphoid Tumours. *EMBO J.* **1983**, *2*, 2375–2383. [[CrossRef](#)]
69. Bentley, D.L.; Groudine, M. A Block to Elongation Is Largely Responsible for Decreased Transcription of C-Myc in Differentiated HL60 Cells. *Nature* **1986**, *321*, 702–706. [[CrossRef](#)]
70. Nepveu, A.; Marcu, K.B. Intragenic Pausing and Anti-Sense Transcription within the Murine c-Myc Locus. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2859–2865. [[CrossRef](#)]
71. Yang, J.Q.; Remmers, E.F.; Marcu, K.B. The First Exon of the C-Myc Proto-Oncogene Contains a Novel Positive Control Element. *EMBO J.* **1986**, *5*, 3553–3562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Nerlov, C. The C/EBP Family of Transcription Factors: A Paradigm for Interaction between Gene Expression and Proliferation Control. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 318–324. [[CrossRef](#)]
73. Baluapuri, A.; Wolf, E.; Eilers, M. Target Gene-Independent Functions of MYC Oncoproteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 255–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Philipp, A.; Schneider, A.; Väsrik, I.; Finke, K.; Xiong, Y.; Beach, D.; Alitalo, K.; Eilers, M. Repression of Cyclin D1: A Novel Function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 4032–4043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Freytag, S.O.; Geddes, T.J. Reciprocal Regulation of Adipogenesis by Myc and C/EBP Alpha. *Science* **1992**, *256*, 379–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hann, S.R.; Sloan-Brown, K.; Spotts, G.D. Translational Activation of the Non-AUG-Initiated c-Myc 1 Protein at High Cell Densities Due to Methionine Deprivation. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 1229–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Blalock, W.L.; Piazzini, M.; Bavelloni, A.; Raffini, M.; Faenza, I.; D'Angelo, A.; Cocco, L. Identification of the PKR Nuclear Interactome Reveals Roles in Ribosome Biogenesis, mRNA Processing and Cell Division. *J. Cell Physiol.* **2014**, *229*, 1047–1060. [[CrossRef](#)]
78. Umek, R.M.; Friedman, A.D.; McKnight, S.L. CCAAT-Enhancer Binding Protein: A Component of a Differentiation Switch. *Science* **1991**, *251*, 288–292. [[CrossRef](#)]
79. Xiao, Q.; Claassen, G.; Shi, J.; Adachi, S.; Sedivy, J.; Hann, S.R. Transactivation-Defective c-MycS Retains the Ability to Regulate Proliferation and Apoptosis. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3803–3808. [[CrossRef](#)]
80. Spotts, G.D.; Patel, S.V.; Xiao, Q.; Hann, S.R. Identification of Downstream-Initiated c-Myc Proteins Which Are Dominant-Negative Inhibitors of Transactivation by Full-Length c-Myc Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1459–1468. [[CrossRef](#)]
81. Cazalla, D.; Zhu, J.; Manche, L.; Huber, E.; Krainer, A.R.; Cáceres, J.F. Nuclear Export and Retention Signals in the RS Domain of SR Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6871–6882. [[CrossRef](#)]
82. Galmozzi, E.; Casalini, P.; Iorio, M.V.; Casati, B.; Olgiati, C.; Ménard, S. HER2 Signaling Enhances 5'UTR-Mediated Translation of c-Myc mRNA. *J. Cell Physiol.* **2004**, *200*, 82–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Notari, M.; Neviani, P.; Santhanam, R.; Blaser, B.W.; Chang, J.-S.; Galiotta, A.; Willis, A.E.; Roy, D.C.; Caligiuri, M.A.; Marcucci, G.; et al. A MAPK/HNRPK Pathway Controls BCR/ABL Oncogenic Potential by Regulating MYC mRNA Translation. *Blood* **2006**, *107*, 2507–2516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Stoneley, M.; Paulin, F.E.; Le Quesne, J.P.; Chappell, S.A.; Willis, A.E. C-Myc 5' Untranslated Region Contains an Internal Ribosome Entry Segment. *Oncogene* **1998**, *16*, 423–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Le Quesne, J.P.; Stoneley, M.; Fraser, G.A.; Willis, A.E. Derivation of a Structural Model for the C-Myc IRES. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 111–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ji, M.H.; Kim, S.-K.; Kim, C.-Y.; Phi, J.H.; Jun, H.J.; Blume, S.W.; Choi, H.S. Physiological Expression and Accumulation of the Products of Two Upstream Open Reading Frames Mrt1 and MycHex1 Along With P64 and P67 Myc From the Human C-Myc Locus. *J. Cell. Biochem.* **2016**, *117*, 1407–1418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Thiry, M.; Lafontaine, D.L.J. Birth of a Nucleolus: The Evolution of Nucleolar Compartments. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 194–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Mao, Y.S.; Zhang, B.; Spector, D.L. Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends Genet.* **2011**, *27*, 295–306. [[CrossRef](#)]
89. Gazin, C.; Rigolet, M.; Briand, J.P.; Van Regenmortel, M.H.; Galibert, F. Immunochemical Detection of Proteins Related to the Human C-Myc Exon 1. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2241–2250. [[CrossRef](#)]
90. Fricker, M.; Hollinshead, M.; White, N.; Vaux, D. Interphase Nuclei of Many Mammalian Cell Types Contain Deep, Dynamic, Tubular Membrane-Bound Invaginations of the Nuclear Envelope. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 531–544. [[CrossRef](#)]
91. Broers, J.L.; Machiels, B.M.; van Eys, G.J.; Kuijpers, H.J.; Manders, E.M.; van Driel, R.; Ramaekers, F.C. Dynamics of the Nuclear Lamina as Monitored by GFP-Tagged A-Type Lamins. *J. Cell Sci.* **1999**, *112 Pt 20*, 3463–3475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Johnson, N.; Krebs, M.; Boudreau, R.; Giorgi, G.; LeGros, M.; Larabell, C. Actin-Filled Nuclear Invaginations Indicate Degree of Cell de-Differentiation. *Differentiation* **2003**, *71*, 414–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lagace, T.A.; Ridgway, N.D. The Rate-Limiting Enzyme in Phosphatidylcholine Synthesis Regulates Proliferation of the Nucleoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1120–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Echevarría, W.; Leite, M.F.; Guerra, M.T.; Zipfel, W.R.; Nathanson, M.H. Regulation of Calcium Signals in the Nucleus by a Nucleoplasmic Reticulum. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 440–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mickleburgh, I.; Burtle, B.; Holläs, H.; Campbell, G.; Chrzanowska-Lightowlers, Z.; Vedeler, A.; Hesketh, J. Annexin A2 Binds to the Localization Signal in the 3' Untranslated Region of c-Myc mRNA. *FEBS J.* **2005**, *272*, 413–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Zaidi, S.K.; Young, D.W.; Javed, A.; Pratap, J.; Montecino, M.; van Wijnen, A.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S. Nuclear Microenvironments in Biological Control and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 454–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Marinkovic, T.; Marinkovic, D. Obscure Involvement of MYC in Neurodegenerative Diseases and Neuronal Repair. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 4169–4177. [[CrossRef](#)]
98. Madden, S.K.; de Araujo, A.D.; Gerhardt, M.; Fairlie, D.P.; Mason, J.M. Taking the Myc out of Cancer: Toward Therapeutic Strategies to Directly Inhibit c-Myc. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 3. [[CrossRef](#)]
99. Ahmadi, S.E.; Rahimi, S.; Zarandi, B.; Chegeni, R.; Safa, M. MYC: A Multipurpose Oncogene with Prognostic and Therapeutic Implications in Blood Malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 121. [[CrossRef](#)]
100. Whitfield, J.R.; Soucek, L. The Long Journey to Bring a Myc Inhibitor to the Clinic. *J. Cell Biol.* **2021**, *220*, 202103090. [[CrossRef](#)]
101. Vaklavas, C.; Meng, Z.; Choi, H.; Grizzle, W.E.; Zinn, K.R.; Blume, S.W. Small Molecule Inhibitors of IRES-Mediated Translation. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16*, 1471–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Vaklavas, C.; Grizzle, W.E.; Choi, H.; Meng, Z.; Zinn, K.R.; Shrestha, K.; Blume, S.W. IRES Inhibition Induces Terminal Differentiation and Synchronized Death in Triple-Negative Breast Cancer and Glioblastoma Cells. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 13247–13264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Shi, Y.; Sun, F.; Cheng, Y.; Holmes, B.; Dhakal, B.; Gera, J.F.; Janz, S.; Lichtenstein, A. Critical Role for Cap-Independent c-MYC Translation in Progression of Multiple Myeloma. *Mol. Cancer Ther.* **2022**, *21*, 502–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Holmes, B.; Lee, J.; Landon, K.A.; Benavides-Serrato, A.; Bashir, T.; Jung, M.E.; Lichtenstein, A.; Gera, J. Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Inhibition Synergizes with Reduced Internal Ribosome Entry Site (IRES)-Mediated Translation of Cyclin D1 and c-MYC mRNAs to Treat Glioblastoma. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 14146–14159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Piazzini, M.; Bavelloni, A.; Faenza, I.; Blalock, W. Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3 and the Double-Strand RNA-Dependent Kinase, PKR: When Two Kinases for the Common Good Turn Bad. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Vaklavas, C.; Zinn, K.R.; Samuel, S.L.; Meng, Z.; Grizzle, W.E.; Choi, H.; Blume, S.W. Translational Control of the Undifferentiated Phenotype in ER-positive Breast Tumor Cells: Cytoplasmic Localization of ER α and Impact of IRES Inhibition. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 2482–2498. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Research paper

Triterpenoid pyrazines and pyridines – Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, preparation of prodrugs



Jiří Hodoň^a, Ivo Frydrych^b, Zdeňka Trhlíková^a, Jan Pokorný^a, Lucie Borková^a, Sandra Benická^a, Martin Vlk^c, Barbora Lišková^b, Agáta Kubíčková^{b,d}, Martina Medvedíková^b, Martin Pisár^a, Jan Šarek^b, Viswanath Das^{b,d}, Anna Ligasová^b, Karel Koberna^b, Petr Džubák^b, Marián Hajdúch^b, Milan Urban^{b,*}

^a Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. Listopadu 1192/12, 771 46, Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Hněvotínská 1333/5, 779 00, Olomouc, Czech Republic

^c Czech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Břehová 7, 115 19, Prague 1, Czech Republic

^d Czech Advanced Technologies and Research Institute (CATRIN), Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University Olomouc, Křížkovského 511/8, 77900, Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Triterpene
Heterocycle
Pyrazine
Pyridine
Cytotoxicity
Apoptosis
Cancer
Molecular target
Pharmacology
MDR
Prodrug
Medoxomil
Huisgen cycloaddition
Mitochondria
Electron microscopy
Fluorescence
Spheroid cultures

ABSTRACT

A set of fifteen triterpenoid pyrazines and pyridines was prepared from parent triterpenoid 3-oxoderivatives (betulonic acid, dihydrobetulonic acid, oleanonic acid, moronic acid, ursonic acid, heterobetulonic acid, and allobetulone). Cytotoxicity of all compounds was tested in eight cancer and two non-cancer cell lines. Evaluation of the structure-activity relationships revealed that the triterpenoid core determined whether the final molecule is active or not, while the heterocycle is able to increase the activity and modulate the specificity. Five compounds (**1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8**) were found to be preferentially and highly cytotoxic ($IC_{50} \approx 1 \mu M$) against leukemic cancer cell lines (CCRF-CEM, K562, CEM-DNR, or K562-TAX). Surprisingly, compounds **1c**, **2b**, and **2c** are 10-fold more active in multidrug-resistant leukemia cells (CEM-DNR and K562-TAX) than in their non-resistant analogs (CCRF-CEM and K562). Pharmacological parameters were measured for the most promising candidates and two types of prodrugs were synthesized: 1) Sugar-containing conjugates, most of which had improved cell penetration and retained high cytotoxicity in the CCRF-CEM cell line, unfortunately, they lost the selectivity against resistant cells. 2) Medoxomil derivatives, among which compounds **26–28** gained activities of IC_{50} 0.026–0.043 μM against K562 cells. Compounds **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** were selected for the evaluation of the mechanism of action based on their highest cytotoxicity against CCRF-CEM cell line. Several experiments showed that the majority of them cause apoptosis *via* the mitochondrial pathway. Compounds **1b**, **8**, and **21** inhibit growth and disintegrate spheroid cultures of HCT116 and HeLa cells, which would be important for the treatment of solid tumors. In summary, compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, **24**, and **26–28** are highly and selectively cytotoxic against cancer cell lines and were selected for future *in vivo* tests and further development of anticancer drugs.

1. Introduction

Triterpenes are natural compounds that have various biological activities including antimalarial [1], antileishmanial [2], anti-HIV [3], anti-inflammatory [4], and many others [5]. Among those activities, antitumor activity is probably the most studied and important. Many research groups have been preparing semisynthetic triterpenes with

high and selective cytotoxicity against cancer cells [6]. Triterpenes containing a heterocycle fused to their skeletons are one of the largest and most important classes of such compounds [7–11]. Previously, we prepared several types of heterocyclic triterpenes and among them, aminothiazoles and pyrazines prepared from betulonic acid **1a** (Fig. 1) had IC_{50} in low micromolar ranges [8,11]. Two compounds are being tested *in vivo* and currently, we develop methods to uncover their

* Corresponding author.

E-mail address: milan.urban@upol.cz (M. Urban).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114777>

Received 15 August 2022; Received in revised form 11 September 2022; Accepted 12 September 2022

Available online 23 September 2022

0223-5234/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

mechanism of action by finding their molecular targets [12]. Recently, another research group [9,13] published the synthesis and anti-inflammatory, antileishmanial, and other activities of heterocyclic triterpenes including pyrazine and pyridine prepared from betulonic acid **1a** that both had interesting cytotoxic activity in prostate cancer cells [14].

The main aim of this work was to investigate the cytotoxicity of triterpenoid pyridines and pyrazines and to find possible structure-activity relationships between triterpenoid 3-oxoderivatives and their corresponding pyrazines and pyridines. Seven triterpenoid oxo-compounds **1a–7a** (Fig. 1), representatives of five common terpenoid skeletons were chosen because their derivatives were often found to be highly cytotoxic [5]. Some of the pyrazines and pyridines are known, however, the biological activity of most of them was not described and the mechanism of action is still unknown. In this work, we expected to be able to evaluate separately the influence of each terpenic scaffold and pyridine or pyrazine ring on the cytotoxic activity. This would help us to identify the pharmacophore in each set of oxoacid-pyridine/pyrazine. In addition, pyridine and pyrazine are typical bioisosteres, therefore we expect their activities in similar ranges. Despite that, there is a number of examples in triterpenoid chemistry, where a small change in their structure (such as adding or removing one atom) may completely change bioactivities. Hemiesters of betulonic acid are one of the examples in which a small change at the hemiester moiety causes a large change in the activity against HIV [16]. The second example may be 2, 2-difluoroderivatives of betulonic acid where replacement of hydrogens at C-2 with supposedly bioisosteric fluorine atoms yielded products with significantly higher cytotoxicity and lower selectivity than the parent betulonic acid [17]. Therefore, we also focused on pointing on the influence of the presence/absence of one aromatic nitrogen on the activity.

In the first part of the study, we used all compounds as free carboxylic acids unprotected because it is known that in most triterpenoid acids, compounds containing the free 28-carboxylic group are more cytotoxic than their esters [18,19]. Later, we used 28-carboxyl for the introduction of potential prodrug moiety. All compounds were tested on eight cancer cell lines including multidrug resistant phenotypes, and on two non-cancer fibroblast lines.

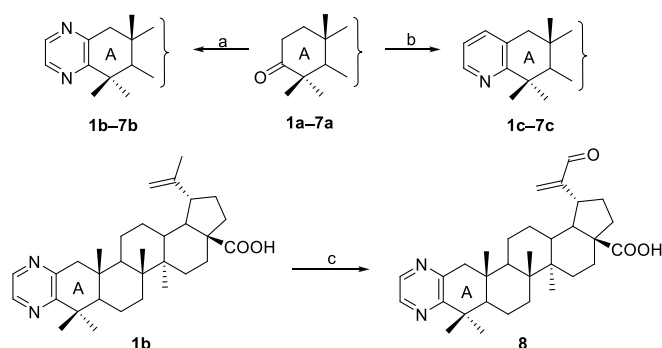
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

2.1.1. Synthesis of basic heterocyclic triterpenoids

The synthesis of pyrazines **1b–7b** (Scheme 1 and Fig. 2) was described in Refs. [8,15] and the synthesis of pyridine **1c** (Fig. 2) is described in Refs. [9,13] with a rather low yield of 12% (Scheme 1).

Most of the published compounds were not tested on any biological activity and therefore we resynthesized them and tested as a part of this study. Compounds **2c–7c** (Fig. 2) are new. Our first goal was to optimize the procedure for the synthesis of pyridines by extending the reaction time and varying the amount of the catalyst. Unfortunately, this only allowed increasing of the yield to 23–35% for derivatives **1c**, **2c**, **3c**, **5c**, and **7c**, while for compounds **4c** and **6c** yield was still below 10%. Another improvement was adding an activated molecular sieve to the reaction mixture, which allowed for 48% of **6c** but still only 15% of **4c**. Therefore, we changed the CuCl catalyst for more reactive NaAuCl₄·2H₂O and obtained 41% of **4c**. Within those optimization experiments, all target derivatives were prepared in sufficient amounts for full characterization and all extensive biological tests; therefore, we discontinued further seek for higher yields. We also oxidized pyrazine **1b** using SeO₂ which gave 30-oxoderivative **8** (Scheme 1) and included this compound in our study. It is known that 30-oxobetulonic acid **11**



Scheme 1. Preparation of triterpenoid pyrazines and pyridines. Reagents and conditions: a) ethylenediamine, sulfur, morpholine, reflux; b) propargylamine, CuCl, ethanol, reflux or propargylamine, NaAuCl₄·2H₂O, ethanol, reflux; c) SeO₂, 2-methoxyethanol, reflux.

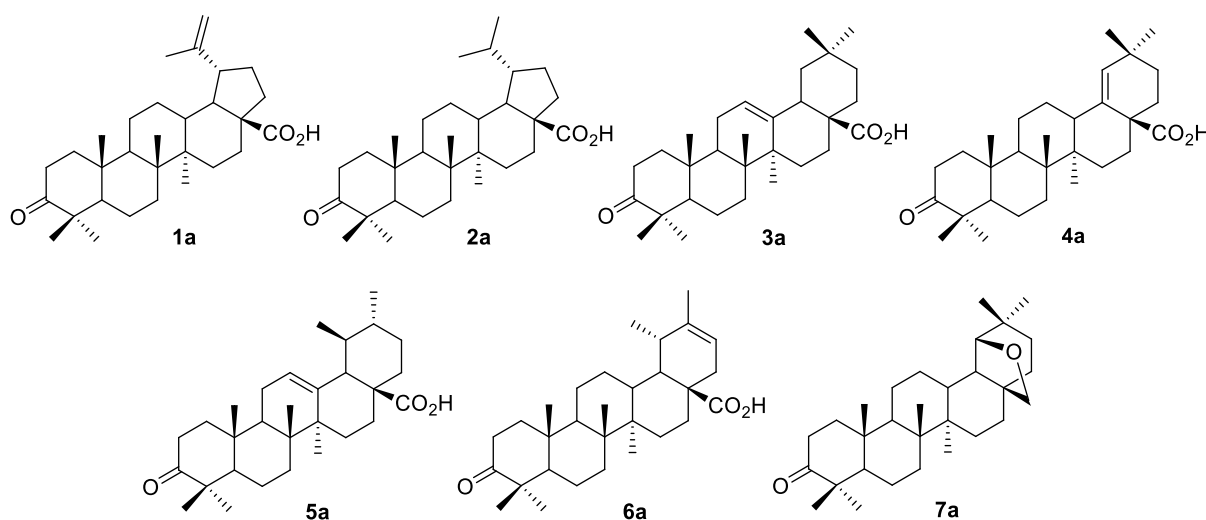


Fig. 1. Starting 3-oxotriterpenes – betulonic acid **1a**, dihydrobetulonic acid **2a**, oleanonic acid **3a**, moronic acid **4a**, ursonic acid **5a**, heterobetulonic acid **6a**, and allobetulon **7a**.

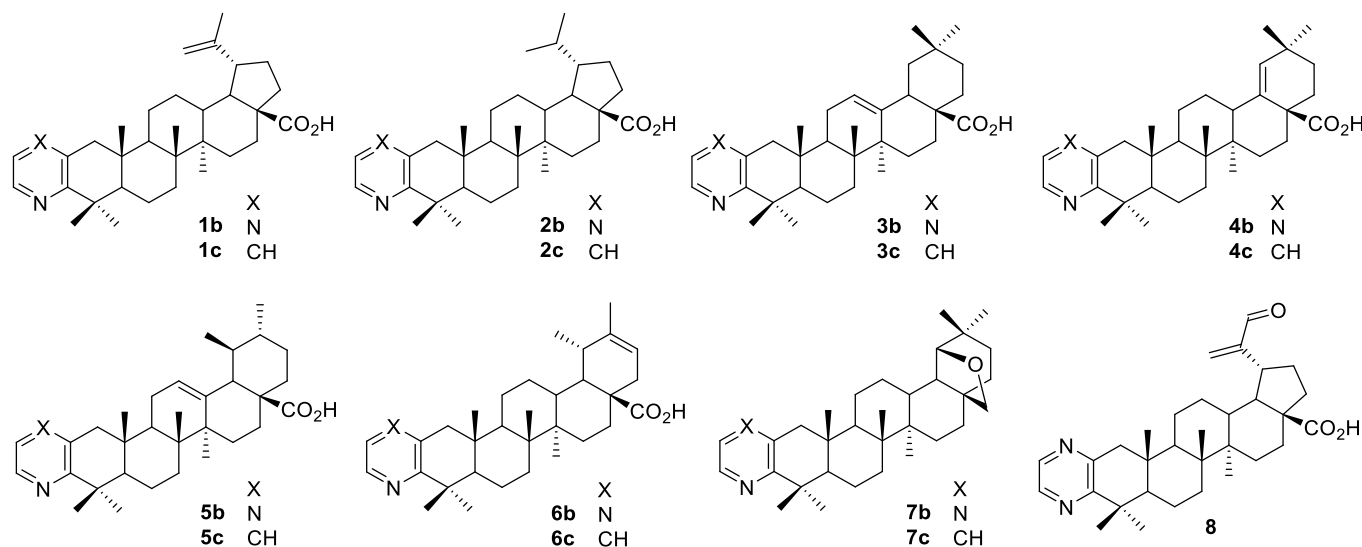


Fig. 2. Triterpenoid pyrazines **1b–7b**, pyridines **1c–7c**, and pyrazine **8**.

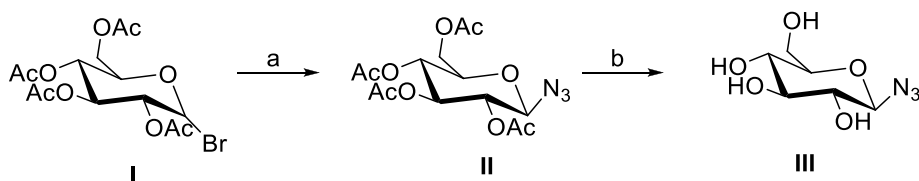
(Scheme 3) is more soluble in water than betulinic acid **9**, and in addition, compound **11** has high cytotoxic activity [20]. For these reasons, we included both 30-oxoderivatives **8** and **11** in this study.

2.1.2. Synthesis of prodrugs

Two sets of prodrugs were prepared within this study – glucose conjugates **15–22** (Schemes 2 and 3) and medoxomil derivatives **23–28** (Scheme 4). Synthesis of both sets was motivated by the preliminary results from the biological screening and by the literature, sugar-containing triterpenes prepared earlier in our research group had high activity and bioavailability in *in vivo* murine experiments [21] and medoxomil is known to increase the bioavailability of ursolic acid *in vivo* [22]. Glucose derivatives were prepared from betulinic acid **9**, 30-oxoderivatives **8** and **11**, and pyrazine **1b** in order to compare the influence of the glucose part on pharmacological parameters and on the cytotoxic activity.

Glucose conjugates **15–22** were prepared *via* a Cu-mediated azide-alkyne cycloaddition of corresponding terpenic propargyl esters (**10**, **12**, **13**, and **14**), and 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide **II** or β -D-glucopyranosyl azide **III** (Schemes 2 and 3) using a similar procedure as in Ref. [25]. The first attempts, using CuI at room temperature, were unsatisfactory because of low yields (10–15%). Raising the temperature to 40 °C with the same catalyst allowed to increase the yields by 35%–54%. These lower yields were mostly caused by repeated semi-preparative HPLC in order to ensure the highest possible purity for biological tests.

Medoxomil derivatives **23–28** were prepared by the alkylation of the free carboxylic acids **9**, **1a**, **1b**, **1c**, **2b**, and **2c** with 4-chloromethyl-5-methyl-1,3-dioxolone in the presence of KI and K_2CO_3 in acetone [22]. The reactions with medoxomil were terminated after 24 h at room temperature with yields of 74–96%.



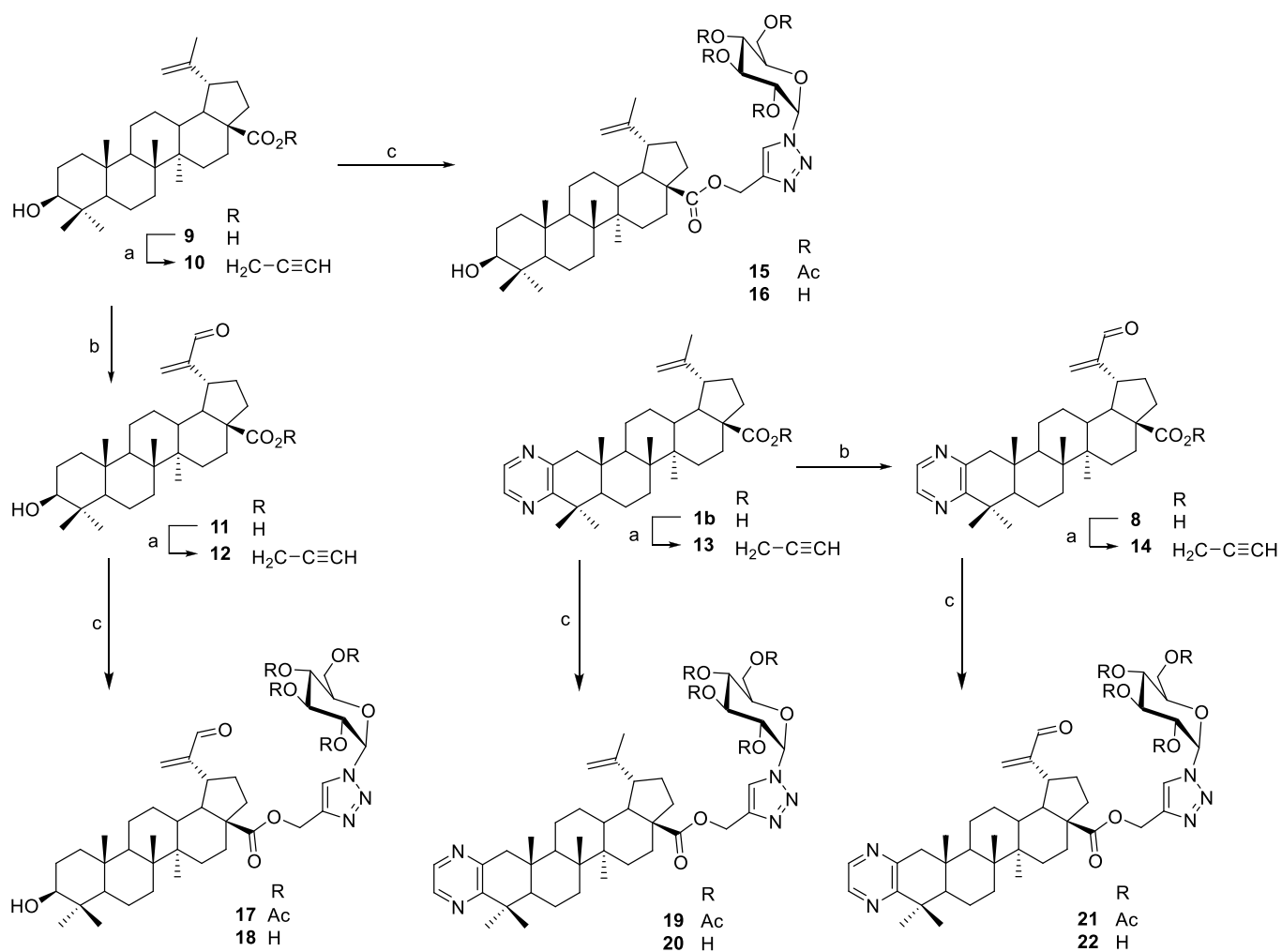
Scheme 2. Synthesis of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide **II** and β -D-glucopyranosyl azide **III** according to the lit [23,24]. Reagents and conditions: a) NaN_3 , EtOH, r.t.; b) EtONa, EtOH, r.t.

2.2. Biology

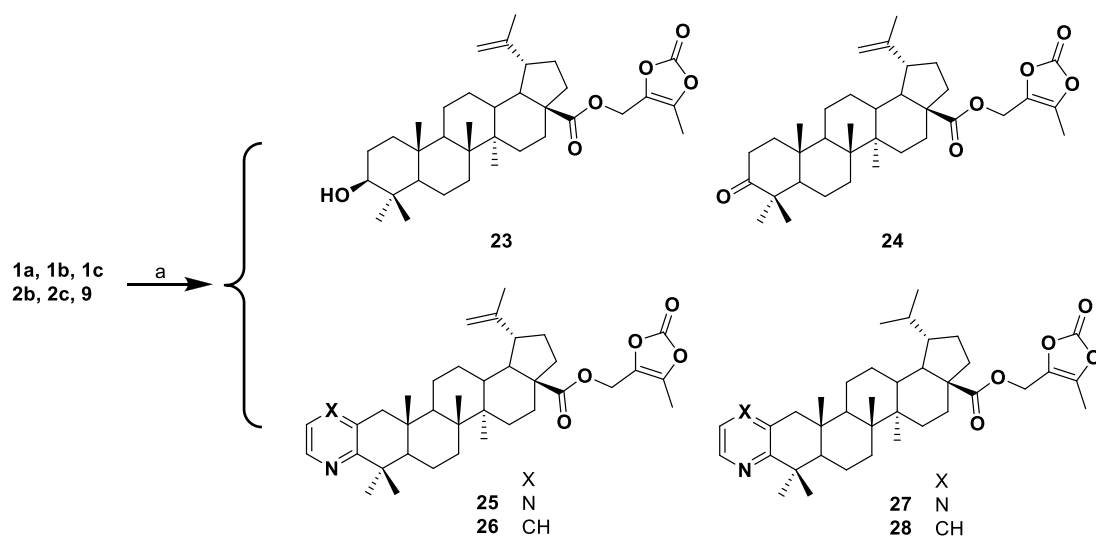
2.2.1. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of all prepared compounds was tested on eight cancer cell lines and two non-cancer fibroblasts (Table 1). From various triterpenic skeletons, both pyrazine and pyridine derivatives of lupane (**1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8**) and taraxastane (**6b** and **6c**) were found to be the most active (IC_{50} = 0.52–8.0 μ M) and most promising for further development. Oleanane, ursane, and 18 α -oleanane heterocycles (**3b**, **3c**, **4b**, **4c**, **5b**, **5c**, **7b**, and **7c**) had the IC_{50} above 10 μ M and they were not further evaluated as the potential anticancer drug candidates. Pyrazine **1b** had the IC_{50} 0.53 μ M in CCRF-CEM cell line and importantly, it had a very high TI = therapeutic index (higher than 94) since its IC_{50} in healthy fibroblast cells was above 50 μ M. Pyrazine **8** containing an aldehyde in position C-30 was highly cytotoxic, however, its selectivity (TI = 3.6) was insufficient and analogous pyridine derivative was not synthesized. Despite that, molecule **8** was included in further development since the introduction of a prodrug moiety could change this lack of selectivity.

An important discovery among pyridine and pyrazine derivatives **1b**, **1c**, **2b**, and **2c** is their activity against drug-resistant leukemic cell lines CEM-DNR and K562-TAX. Compound **1b** has almost the same high activity in CCRF-CEM cells and CEM-DNR cells (IC_{50} = 0.53 and 0.63 μ M) and lower activity in K562 and K562-TAX cells (IC_{50} = 11.5 and 11.6 μ M). Surprisingly, pyrazine **2b** has about 20-fold higher activity against resistant CEM-DNR cells (IC_{50} = 0.52 μ M) than against non-resistant CCRF-CEM cells (IC_{50} = 10 μ M) and the activity against the resistant K562-TAX (IC_{50} = 0.52 μ M) is 35-fold higher than in non-resistant K-562 cells (IC_{50} = 18 μ M). Pyridines **1c** and **2c** have low activity in CCRF-CEM cells (IC_{50} is more than 20 μ M) and high activity in CEM-DNR cells (IC_{50} is 2.4 and 2.0 μ M). Similarly, the activity of **1c** and **2c** in resistant leukemic cells K562-TAX (IC_{50} is 1.9 and 1.4 μ M) is about 10-fold higher



Scheme 3. Preparation of triterpenoid conjugates with glucose. Reagents and conditions: a) propargyl bromide, K₂CO₃, DMF, r.t.; b) SeO₂, 2-methoxyethanol, reflux (ref. [26]); c) II or III, CuI, DMF, 40 °C.



Scheme 4. Synthesis of medoximil prodrugs 23–28. Reagents and conditions: a) 4-(chloromethyl)-5-methyl-1,3-dioxol-2-one, KI, K₂CO₃, acetone, r.t.

Table 1

Cytotoxic activities of tested compounds on eight tumor (including multidrug resistant) and two normal fibroblast cell lines.

Comp.	IC ₅₀ (μM/L) ^a										
	CCRF-CEM	CEM-DNR	K562	K562-TAX	HCT116	HCT116p53 ^{-/-}	A549	U2OS	BJ	MRC-5	TI ^b
1a	8.4	11	14	15	38	49	40	38	39	30	4.1
1b	0.53	0.63	12	12	34	47	32	32	>50	>50	>94
1c	23	2.4	13	1.9	35	>50	27	>50	>50	>50	>2.2
2a	6.3	48	12	11	34	36	22	27	>50	>50	>8.0
2b	10	0.52	18	0.52	22	23	21	29	>50	>50	>4.9
2c	22	2.0	11	1.4	31	>50	46	>50	>50	>50	>2.3
3a	9.5	17	>50	21	45	>50	50	49	>50	>50	>5.2
3b	18	14	>50	34	50	>50	50	>50	>50	>50	>2.8
3c	39	>50	13	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>1.3
4a	17	17	>50	21	45	>50	47	>50	>50	>50	>2.9
4b	15	29	>50	25	40	>50	>50	>50	>50	>50	>3.4
4c	8.0	14	>50	15	47	>50	>50	>50	>50	>50	>6.2
5a	16	19	>50	27	47	>50	50	>50	>50	>50	>3.1
5b	19	17	>50	44	50	>50	>50	>50	>50	>50	>2.7
5c	38	40	32	47	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>1.3
6a	6.5	11	8.5	28	32	35	24	24	35	33	5.2
6b	7.2	10	18	10	48	50	44	46	>50	>50	>7.0
6c	6.3	11	12	13	34	34	20	35	>50	>50	>8.0
7a	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
7b	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
7c	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
8	0.67	2.1	2.3	0.86	2.0	2.1	3.9	2.7	3.0	1.8	3.6

^a The concentration of drug needed to inhibit cell growth by 50%. The standard deviation in cytotoxicity assays is typically up to 15% of the average value.^b Therapeutic index is calculated for IC₅₀ of CCRF-CEM line vs average of both fibroblasts.

than in non-resistant cells K562 (IC₅₀ is 13.4 and 10.5 μM). We found it really interesting, that such a small isosteric exchange (replacement of aromatic nitrogen with C–H and saturation of a double bond) in a triterpenoid molecule can induce such a large impact on the activity and this should be subject of more future studies. As a part of the development of the most active compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8**, we measured their ADME parameters and tried to adjust the lipophilicity of the molecule **1b** by synthesizing prodrugs **15–22** (via propargyl ester precursors **10**, **12**, and **14**) in order to improve its bioavailability. Compound **1b** was selected as a representative for all active compounds, it was expected that the influence of prodrug moiety on all active compounds is similar. In addition, we prepared medoxomil conjugates **23–28** from the starting acids **1a** and **9** and from the most interesting compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**. The *in vitro* cytotoxic activity of compounds **10–28** is summarized in Table 2. First of all, 30-oxoderivatives **12**, **17**, and **21** are active (IC₅₀ in all cancer cell lines 0.6–2.7 μM) but they

remained unselective (TI 2.8–5.0). In contrast, 30-oxoderivatives **14**, **18**, and **22** remained active in CCRF-CEM cell line (IC₅₀ 0.43–4.6 μM) and gained selectivity, since they are less cytotoxic in both fibroblast lines but also in several cancer cell lines (TI > 10). Conjugates **15**, **16**, **19**, **20** (betulinic acid **9** and pyrazine **1b** connected with glucose) had activity in higher micromolar concentration ranges. The most significant improvement of the activity was achieved among medoxomil derivatives **23–28**. It was found that compounds **23**, **24**, and **25** are active in CCRF-CEM cell line with sufficient selectivity. Compounds **24**, and **26–28** are significantly active against the second leukemia cell line K562 with IC₅₀ between 0.037 and 0.87 μM and their selectivity is also high. Concerning cytotoxicity across the entire panel of cancer cell lines used, compounds **26–28** are to date the most active triterpenes prepared in our lab. Since the medoxomil part is supposed to be metabolized *in vivo* to obtain an active parent compound [22], we did not measure their ADME parameters. Compounds **23–28** will be included in the future *in*

Table 2

Cytotoxic activities of prodrugs on eight tumor (including multidrug-resistant) and two normal fibroblast cell lines.

Comp.	IC ₅₀ (μM/L) ^a										
	CCRF-CEM	CEM-DNR	K562	K562-TAX	HCT116	HCT116p53 ^{-/-}	A549	U2OS	BJ	MRC-5	TI ^b
10	24	40	43	36	33	31	43	31	32	26	1.2
12	0.88	1.4	1.8	1.3	1.7	1.5	1.3	1.6	7.1	1.7	5
13	45	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>1.1
14	0.43	1.7	1.6	1.4	7.0	6.3	1.7	1.4	7.2	6.6	16
15	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
16	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
17	0.60	1.6	1.4	1.6	1.6	1.7	1.8	1.7	1.8	1.7	2.9
18	4.6	>50	21	>50	38	41	>50	50	>50	>50	11
19	>50	49	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	–
20	8.1	19	19	21	30	28	38	20	42	>50	5.7
21	0.75	1.5	1.2	2.7	1.5	1.7	1.8	1.6	2.3	1.8	2.8
22	2.0	>50	5.2	46	7.2	7.8	28	8.2	26	28	14
23	4.5	14	8.3	12	17	15	13	19	44	41	9.4
24	2.3	9.1	0.87	11	21	19	9.5	22	>50	47	>21
25	3.6	0.49	>50	13	40	49	10	45	>50	>50	14
26	35	48	0.037	49	>50	>50	50	>50	>50	>50	>1.4
27	17	50	0.026	12	>50	44	41	40	>50	>50	2.9
28	46	50	0.043	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>1.1

^a The concentration of drug needed to inhibit cell growth by 50%. The standard deviation in cytotoxicity assays is typically up to 15% of the average value.^b Therapeutic index is calculated for IC₅₀ of CCRF-CEM line vs average of both fibroblasts.

in vivo tests to determine their behavior in living organisms and to show if it is worth to use this prodrug moiety. Finally, based on above-mentioned findings, we decided to select the most cytotoxic compounds on sensitive CCRF-CEM cells among pyridine and pyrazine derivatives (**1b** and **8**) and their prodrugs (**21–24**) and subject them for advanced biological experiments to evaluate their mechanism of action.

2.2.2. Pharmacological parameters

In order to pass the most active compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8** further into our drug discovery program, we measured their *in vitro* ADME parameters that are summarized in the Table 3. Tested compounds demonstrated quite a high chemical stability in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) after 120 min at 37 °C. Also, all compounds were found to be stable in plasma (all compounds showed more than 85% presence in plasma after 120 min). The intrinsic clearance data obtained in microsomal stability assay showed low or medium category. This means that all studied compounds were not subject to rapid metabolism by liver microsome enzymes. All five derivatives **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8** had the low ability ($-\log P_{app} > 6$ cm/s) to diffuse passively through an artificial cellular membrane in the Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), suggesting an alternative intracellular transport mechanism. The MDCK-MDR1 permeability assays are established models of blood-brain barriers [27]. Studied compounds showed a low ability to cross the blood-brain barrier. All derivatives were not actively exported from the cells in a barrier model as indicated by efflux ratios < 2 . To conclude, the first set of the molecules **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8** had excellent chemical, plasma, and microsomal stability, however, it was necessary to consider which structural changes could achieve better cell permeability.

Compounds **1b** and **8** were selected as model examples for conjugation with glucose analogs in order to optimize their properties. Similar conjugates were prepared from betulinic acid **9** and aldehyde **11** to obtain more information about the structure-property relationships in this set of compounds. The main goal was to select the best modifying moiety to be able to use it in the future to improve the properties of the final candidate. As a result, a set of derivatives **15–22** was prepared and the ADME parameters are shown in the Table 4. The conjugates **15–22**

showed good stability parameters, we observed more than 80% presence in plasma after 120 min and low or medium category of intrinsic clearance using microsomal stability assay. It is important because the instability in plasma and liver microsomes can result in rapid clearance, short half-life, and poor *in vivo* performance. Conjugates **19** and **20** show a small improvement in cellular permeability (without category change) in comparison with compound **1b** in our PAMPA model. We assessed rates of transport across MDCK-MDR1 (models of blood-brain barriers) monolayers in both directions (apical to basolateral (A-B) and basolateral to apical (B-A)) across the cell monolayer which enables us to determine the efflux ratio and shows if the compound undergoes active efflux. Studied conjugates **15–22** reported a low possibility to be absorbed to cross MDCK-MDR1 monolayers and were actively exported from the cells as indicated by efflux ratios > 2 .

2.2.3. Cell death evaluation based on Annexin V/PI double labeling

To study the cell death mode of selected highly cytotoxic compounds in more detail, we used Annexin V/PI labeling, allowing distinguishing cells in early or late phases of apoptosis and also necrotic cell death. We treated CCRF-CEM cells by **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** at $1 \times IC_{50}$ or $5 \times IC_{50}$ concentrations for 24 h followed by Annexin V/PI staining. Regarding evaluation, apoptotic cells were considered to be those stained with Annexin V alone (early apoptotic) or double stained with Annexin V and PI (late apoptotic; Fig. 3). Necrotic cells were positive only for PI staining. Among compounds tested, **21** proved strongest apoptotic activity, even at $1 \times IC_{50}$ concentration, leading to more than 20-fold increase of apoptotic cells population compared to the untreated control. This result indicates very good anticancer activity of **21** through apoptosis induction. We further found massive apoptotic induction following treatment with **8** and **22** at $5 \times IC_{50}$ concentration. The effect of other compounds was no or only marginal.

2.2.4. Effect of **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** on the expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins

To elucidate the mechanism by which the studied compounds induce apoptosis, the immunodetection of several proteins belonging to programmed cell death pathways was performed (Fig. 4). Accumulation of

Table 3
Pharmacological parameters of compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8**.

Compound	Chemical stability				Plasma stability				
	% Compound remaining				% Compound remaining				
	15 min	30	60	120	15 min	30	60	120	
1b	101.41	97.01	89.57	91.10	101.67	99.64	105.90	91.61	
1c	85.92	87.29	75.32	81.37	97.30	100.06	95.03	88.92	
2b	100.77	101.96	93.63	98.45	103.64	102.86	100.28	87.28	
2c	92.56	92.48	90.66	97.62	98.29	95.06	87.33	88.07	
8	98.04	95.48	93.01	93.45	99.9	99.0	93.1	86.32	
Compound	Microsomal stability			Microsomal stability			Category of Intrinsic clearance		
	% Compound remaining			% Compound remaining					
	15 min	30	60	15 min	30	60			
1b	96.87	83.28	43.27				Medium		
1c	98.80	101.89	92.28				Low		
2b	102.08	88.24	79.48				Low		
2c	90.25	71.93	52.64				Medium		
8	98.32	92.37	77.27				Medium		
Compound	Plasma protein binding		PAMPA	Category ^b	MDCK-MDR1 Permeability Assay				
	% Fraction bound				log Pe	Papp (x10e-6)	Category	Efflux ratio	active efflux
1b	98.8		-7.64	Low	0.33	negative	1.73	No	99.63
1c	90.0		-7.44	Low	0.21	negative	0.6	No	103.79
2b	89.2		-7.04	Low	0.30	negative	0.96	No	46.46
2c	90.0		-7.78	Low	0.29	negative	0.34	No	49.52
8	99.69		-6.07	Low	1.54	negative	0.94	No	105.6

^{a,b} References [28,29], error deviations are ranges of values lower than 10% (all experiments were done in triplicates except cell-based permeability assay were done in duplicates).

Table 4
Pharmacological parameters of compounds 15–22.

Compound	Chemical stability				Plasma stability				
	% Compound remaining				% Compound remaining				
	15 min	30	60	120	15 min	30	60	120	
15	98.54	92.67	82.35	77.88	94.26	92.19	87.79	83.37	
16	92.04	84.77	82.55	82.34	99.56	99.27	97.76	96.09	
17	97.06	92.49	89.21	83.77	93.87	88.70	86.95	82.3	
18	98.39	93.00	93.23	85.98	99.02	96.13	88.71	86.31	
19	98.91	99.54	92.14	92.9	98.72	91.16	88.03	87.06	
20	91.19	89.20	87.13	86.84	98.62	94.8	93.5	87.37	
21	99.93	91.12	87.81	85.16	103.99	97.20	88.74	88.52	
22	94.63	93.41	91.67	90.67	97.09	97.77	91.80	90.03	
Compound	Microsomal stability			Microsomal stability			Category of Intrinsic clearance		
	% Compound remaining			% Compound remaining					
	15 min	30	60	15 min	30	60			
15	99.03	98.82	96.97				Low		
16	67.23	59.39	42.28				Medium		
17	95.56	82.70	66.63				Medium		
18	89.94	83.67	81.83				Low		
19	99.28	98.30	97.85				Low		
20	95.62	83.65	77.80				Low		
21	96.77	95.71	58.86				Medium		
22	96.02	91.47	73.34				Medium		
Compound	Plasma protein binding		PAMPA	Category	MDCK-MDR1 Permeability Assay				
	% Fraction bound				log Pe	Papp (x10e-6)	Category	Efflux ratio	active efflux
15	99.56		-7.44	Low	0.28	negative	5.61	Yes	77.00
16	98.68		-7.30	Low	0.16	negative	4.30	Yes	98.18
17	99.85		-7.58	Low	0.32	negative	3.77	Yes	103.04
18	99.76		-7.26	Low	0.17	negative	8.88	Yes	105.48
19	89.25		-6.96	Low	1.67	negative	7.10	Yes	87.72
20	99.73		-6.98	Low	0.12	negative	3.7	Yes	82.19
21	99.83		-7.82	Low	0.12	negative	4.49	Yes	77.62
22	99.29		-5.57	Medium	1.05	negative	9.60	Yes	99.15

^{a,b} Reference [28,29], error deviations are ranges of values lower than 10% (all experiments were done in triplicates except cell-based permeability assays were done in duplicates).

Bax and Bid, key components for cellular apoptosis induced through mitochondrial stress, was found out after 24 h treatment with studied triterpene derivatives. Upon apoptotic stimulation, Bax forms oligomers or interacts with Bid and translocates from the cytosol to the mitochondrial outer membrane [30]. Through interactions with pore proteins on the mitochondrial membrane, Bax and Bax/Bid complexes increase the membrane permeability, which ultimately leads to the release of cytochrome *c* from mitochondria and subsequent apoptosome complex formation with Apaf-1 and pro-caspase-9 and resulting in caspase-9 activation [31]. Immunodetection of Bax revealed a presence of its cleavage products which more potently induces apoptosis as indicated by higher cytochrome *c* release, caspase-3/7 activation, and DNA fragmentation, potentially due to their increased homo-oligomerization in mitochondrial membranes [32]. Thus, Bax and Bid pro-apoptotic proteins relay an apoptotic signal from the cell surface to the mitochondria triggering caspase activation [33]. Thus, we further concentrated on critical executioners of apoptosis including caspase-3 and caspase-7, as they are either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins, such as the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP, a 116 kDa nuclear poly (ADP-ribose) polymerase, appears to be involved in DNA repair in response to environmental stress [34]. This protein can be cleaved by many ICE-like caspases *in vitro* [35] and is one of the main cleavage targets of caspase-3 *in vivo* [36]. In human PARP, the cleavage occurs between Asp214 and Gly215, which separates the PARP amino-terminal DNA binding domain (24 kDa) from the carboxy-terminal catalytic domain (89 kDa) [36]. PARP helps cells to maintain their viability; cleavage of PARP facilitates cellular disassembly and serves as a marker of cells undergoing apoptosis. The obvious cleavage of PARP was detected in CCRF-CEM cells treated with compounds at these

concentrations: $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ **8**, $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ **21**, $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ **22**, $5 \times IC_{50}$ **24**, $5 \times IC_{50}$ **23**. Furthermore, we focused on the levels of proteins belonging to the “BH3-only” family. Members of the “BH3-only” family (e.g. Noxa, Bad, Bim, Puma, Bid, Bik, and Hrk) are highly regulated proteins that induce apoptosis through BH3-dependent interaction with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins [37]. First of all, we chose Noxa, a small protein that plays a key role in mediating apoptotic signaling. It contains a single Bcl-2 homology (BH3) domain [38] and localizes to mitochondria where it binds the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and A1/Bfl-1 [39]. It also competes with Mcl-1 for binding to mitochondrial Bak protein. The increased expression of Noxa nicely correlates with cleaved PARP and indicates ongoing apoptosis as a result of triterpene's effect on CCRF CEM cells. Further, we concentrated on Bim which similarly to Noxa contains a BH3 domain and induces apoptosis by binding to and antagonizing anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, namely Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, and BHRF-1 [40]. Finally, c-Myc, a marker of increased cellular proliferation which is frequently induced in many cancer types was immunodetected [41]. Its expression was markedly decreased as a response to treatments with triterpene derivatives: $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ **8**, $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ **21**, $5 \times IC_{50}$ **22**, $5 \times IC_{50}$ **23**. This finding goes hand in hand with data from cell cycle analysis where an accumulation of cells in sub-G₁ and G₀/G₁ phases were detected at the expense of S, G₂, and M phases.

2.2.5. The cells' treatment by compounds **1b** and **8** results in the fast damage of mitochondria

As our data indicated that the mitochondrial stress could play important role in the toxicity of the tested compounds, we treated CCRF-CEM and HeLa cells with 10 μ M compound **1b** or **8** for 4 h. Mitochondria

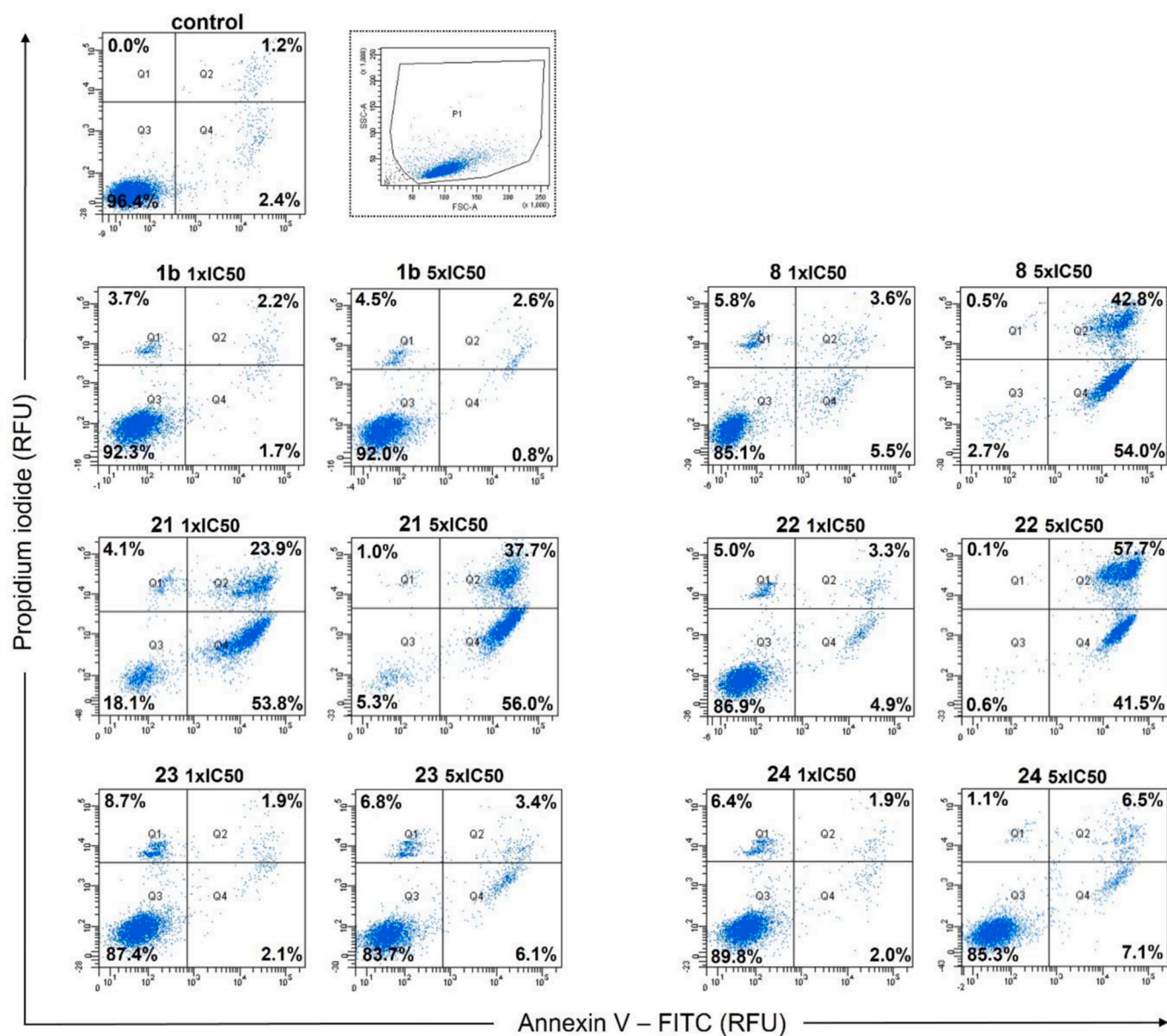


Fig. 3. Representative dot plot diagrams of dual Annexin V/Propidium iodide staining of CCRF-CEM cells treated with **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** at $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ concentrations for 24 h. Prior to analysis, dead cells and debris were gated out by forward scatter versus side scatter gating (upper picture marked with dotted line). Then, cells from P1 gate were projected to red/green channels dot-plot diagram. The fluorescence signal was measured at green (FITC Annexin V) and red (PI) channels using FACSaria II flow cytometer. At least 10 000 cells were acquired in each sample and analysis of individual quadrants was performed. The percentage calculation of viable (Q3 area), early apoptotic (Q4), late apoptotic (Q2) and necrotic (Q1) cells has been evaluated based on appropriate coordinates setting.

were visualized in the formaldehyde-fixed cells using antibody recognizing MT-CO2 [42], a cytochrome *c* oxidase subunit 2 [43].

We included HeLa cells in this part of the study as mitochondria of HeLa cells are organized into well-discerned chains (Fig. 5, upper panel). The sensitivity of HeLa cells to both compounds is relatively low as IC_{50} for the compound **1b** and **8** was 11.9 and 5.63 μM , respectively. In this respect, we firstly tested impact of various concentrations of both compounds on the mitochondria of HeLa cells. In the case of the compound **1b**, 1, 5, 10, 20, or 50 μM concentration was analyzed, in the case of more toxic compound **8**, 0.5, 2.5, 5, 10 or 20 μM concentration was tested. As HeLa cells are adherent, they can be cultivated on glass coverslips. Therefore, the eventual impact of the tested compounds on mitochondria can be easily identified by the fluorescence microscopy. CCRF-CEM cells grow in suspension, and their processing requires the cytocentrifugation steps. In addition, mitochondria of rounded CCRF-CEM cells occupy relatively small area at high mitochondria density

(Fig. 5, lower panel) further complicating their analysis.

Clear differences between mitochondria's organization were observed in HeLa cells (Fig. 5, upper panel) if 10 μM or higher concentrations of both compounds were used. On the other hand, no such effect was observed in the case of CCRF-CEM cells (Fig. 5, lower panel) although we used relatively high concentration of both compounds (\sim more than $10 \times$ of the IC_{50} concentration).

To distinguish whether the difference between HeLa and CCRF-CEM cells can be attributed to the distinct effect of the tested compounds on various cell types, or it is a result of insufficient resolution of mitochondria in CCRF-CEM cells, we further performed electron microscopy (EM) analysis of the CCRF-CEM cells treated or non-treated with 10 μM compound **1b** (Fig. 6). It is obvious from the Fig. 6 that the treatment of cells with the compound **1b** resulted into profound changes of mitochondria organization as mitochondrial cristae were dramatically changed (Fig. 6).

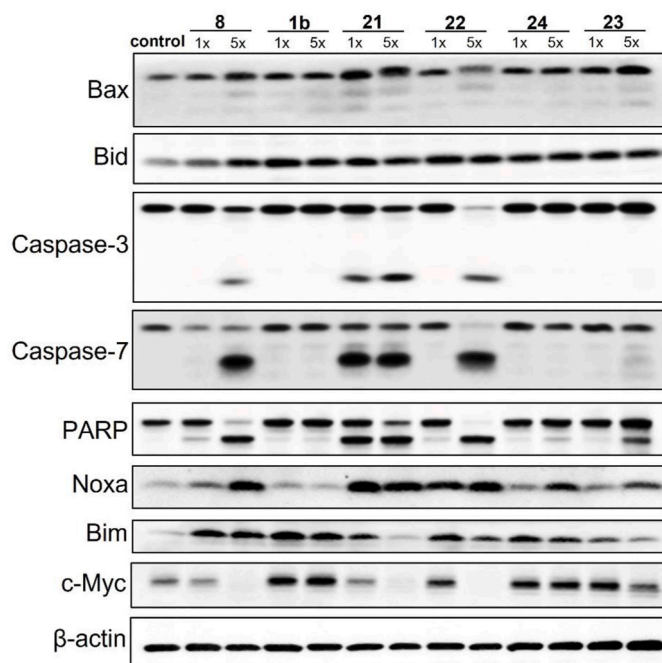


Fig. 4. Western blot analysis of CCRF-CEM cells treated by **8**, **1b**, **21**, **22**, **24**, and **23** at $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ concentrations for 24 h. For the caspases-3/7 detection, antibodies specifically recognizing both, precursor and active form were used. Using *anti*-PARP antibody, full-length protein, as well as fragment produced by caspase cleavage, was detected. To check equal amount of proteins loaded per well, anti β -actin antibody was used. The untreated cells were taken as a control. Relative concentration of each pyridine/pyrazine in CCRF-CEM and CEM-DNR cells.

For the direct visualization of the sites in the cell that contain compound **1b** or **8**, we used their propargylic esters **13** and **14** that are ready for the click reaction with azides. In these experiments, cells were incubated with $10 \mu M$ compounds **13** or **14** (propargylic derivatives of the compounds **1b** and **8**, respectively) for 4 h, fixed and the tested compounds were visualized by click reaction catalyzed by the monovalent copper ions. Simultaneously, MT-CO2 was visualized by antibody detection. We observed significant overlap of MT-CO2 marker and compound **14** signal in the case of HeLa cells (Fig. 7). If compound **13** was used, no signal was observed after click reaction. In this case, we also did not observe damaged mitochondria as in the case of **1b** compound. It indicates that the replacement of COOH group by the propargyl group could inactivate the compound **13** or could prohibit the transport of the compound **13** into cells. It was in agreement with our results obtained with CCRF-CEM cells. In this case, we also did not observe any signal after click reaction with compound **13**. When compound **14** was analyzed, we observed partial co-localization of compound **14** signal and MT-CO2 signal. However, contrary to HeLa cells, it was not so clearly visible due to the organization of mitochondria in CCRF-CEM cells.

In summary, all these data indicate that mitochondria are an important target of the compounds **1b** and **8** action.

2.2.6. Effect of selected compounds in spheroid cultures

The effects of compounds **1b**, **8**, **17**, and **21** were next tested in spheroid cultures of HCT116 and HeLa cells to determine their activity in pathophysiologically relevant *in vitro* tumor models [44]. All derivatives significantly inhibited growth and resulted in the complete disintegration of spheroids of both cell types at the highest tested $10 \mu M$ concentration (Fig. 8 A). Both **1b** and **21** resulted in dose-dependent growth inhibition and a partial opening of spheroids at $1 \mu M$ in HeLa cell spheroids (Fig. 8 B). Although we did not examine the mechanisms

of drug effect in spheroids, triterpenes are known to target HIF-1 α , effectively reproduced in spheroids, and EGFR, which stimulates spheroid formation [45–47]. The ability of **1b** and **21** to cause the opening of spheroids can potentially help the penetration of other less-penetrating cytotoxic drugs in tumors during combination therapy.

3. Conclusions

In this work, we investigated a set of triterpenic pyridines and pyrazines **1b–8** with cytotoxic activity. Among them, compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8** had the IC_{50} in high nanomolar or low micromolar range of concentration and were further developed. The contribution of the parent triterpene and pyrazine or pyridine part to the cytotoxicity of resulting heterocyclic terpenes seems to be synergic. The derivatives of lupane and taraxastane prepared in this work are selectively cytotoxic, while derivatives of 18α -oleanane are inactive which is in agreement with our earlier work [8,11]. Derivatives of ursane and oleanane were moderately active, so it is difficult to make any strong conclusion about the SAR among them. Terpenic pyrazines are not truly bioisosteric with pyridines because most active compounds have activity in different cancer cell lines, pyrazines **1b**, **2b**, and **6b** are cytotoxic on CCRF-CEM cell line while pyridines **1c**, **2c**, and **6c** are cytotoxic on daunorubicin resistant CEM-DNR and taxol resistant K562-TAX line.

After the initial screening, pharmacological parameters of the most active compounds were measured. Molecules **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, and **8** had excellent chemical, plasma, and microsomal stability; however, it was necessary to consider which kind of modification could achieve better cell permeability and/or selectivity in case of compound **8**. Compounds **1b** and **8** were selected as model examples for conjugation with glucose analogs in order to increase the polarity and thus, to optimize their bioavailability. The resulting conjugates **15–21** had similar ADME properties to the parent compounds, only compound **22** had better permeability in PAMPA model. 30-Oxoderivatives **12**, **17**, and **21** (prepared from **8**) were found to be active (IC_{50} in all cancer cell lines 0.60 – $2.7 \mu M$) but they remained unselective (TI 2.8 – 5.0). In contrast, 30-oxoderivatives **14**, **18**, and **22** remained active in CCRF-CEM cell line (IC_{50} 0.43 – $4.6 \mu M$) and gained selectivity, since they are less active in both fibroblast lines but also in several cancer cell lines (TI > 10). Conjugates **15**, **16**, **19**, **20** lost the activity.

Second, a set of medoxomil prodrugs **23–28** was synthesized to improve the bioavailability of the parent compounds. Medoxomil prodrug was described to be metabolized *in vivo* to obtain an active parent acid [22]. Conjugates **23–28** were prepared from the starting acids **1a** and **9** and from the most interesting compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**. It was found that resulting compounds **23**, **24**, and **25** are active in CCRF-CEM cell line with sufficient selectivity. In addition, compounds **24**, and **26–28** are significantly active against the myelogenous leukemia cell line K562 with IC_{50} between 0.037 and $0.87 \mu M$ and their selectivity is very high. Concerning cytotoxicity across the entire panel of cancer cell lines used and compounds tested, compounds **26–28** are to date the most active triterpenes prepared in our lab.

Third, the mechanism of action of selected compounds was tested. Annexin V/propidium iodide staining experiment revealed, that compounds **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** cause selective apoptosis in CCRF-CEM cells with the most significant effect in compounds **8**, **21**, and **22**. It is well documented, that mitochondria represent the main cellular target for triterpenes. Therefore, detailed analysis of the Bcl-2 family members, representing key regulators of mitochondrial pathway of apoptosis, has been performed. First, we concentrated on multidomain pro-apoptotic proteins Bax and Bid, influencing mitochondrial membrane permeability. All the compounds caused significant up-regulation of Bax as well as Bid proteins. Further, we studied effect of compounds on expression of selected proteins belonging to “BH3-only” subgroup with antagonizing function to anti-apoptotic proteins from Bcl-2 family. We found, that **8**, **21** and **22** dramatically increase expression of Noxa protein and moreover, all compounds significantly increased Bim

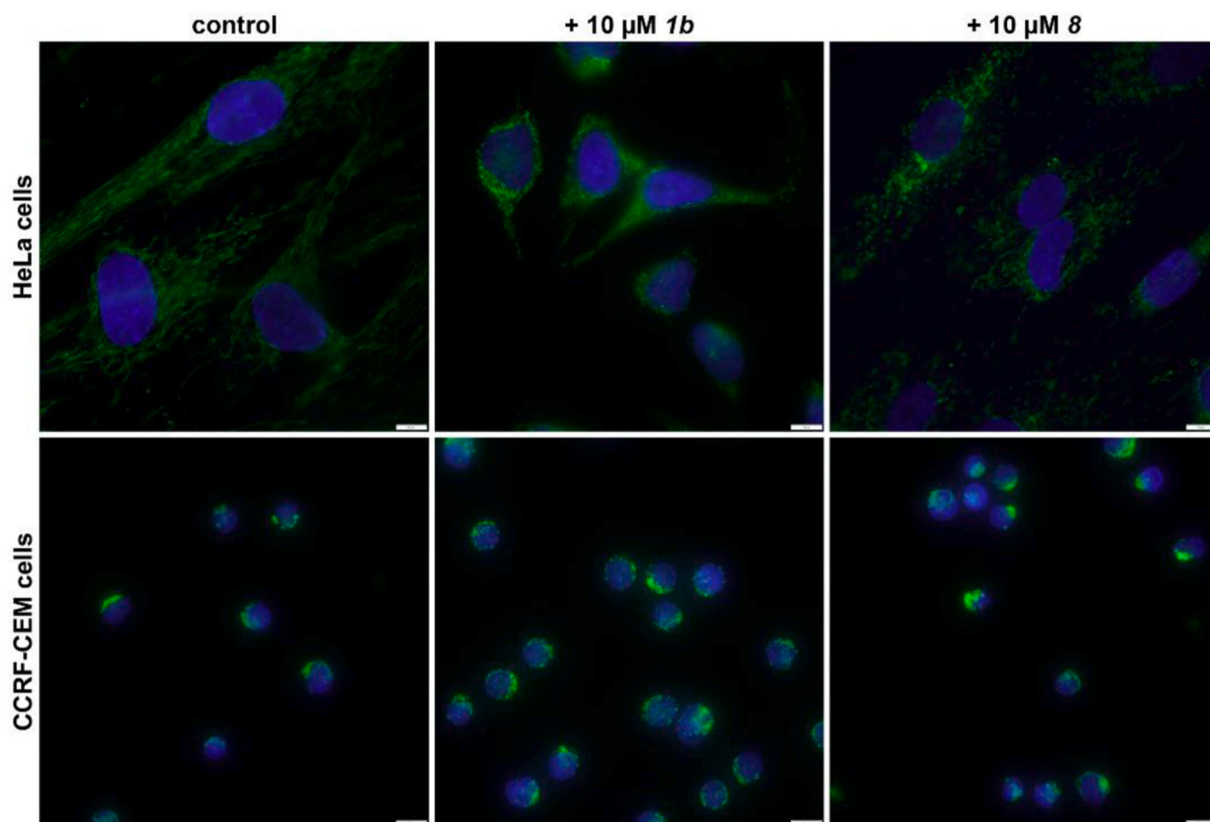


Fig. 5. Light microscopy (LM) analysis of the impact of compounds **1b** and **8** on mitochondria in HeLa cells (upper panel) and CCRF-CEM cells (lower panel). Cells were incubated without (control) or with 10 μM compound **1b** or **8** and processed for fluorescence microscopy. Mitochondria were stained by MT-CO2 marker (green), cell nuclei by DAPI (blue). Scale bar = 10 μm .

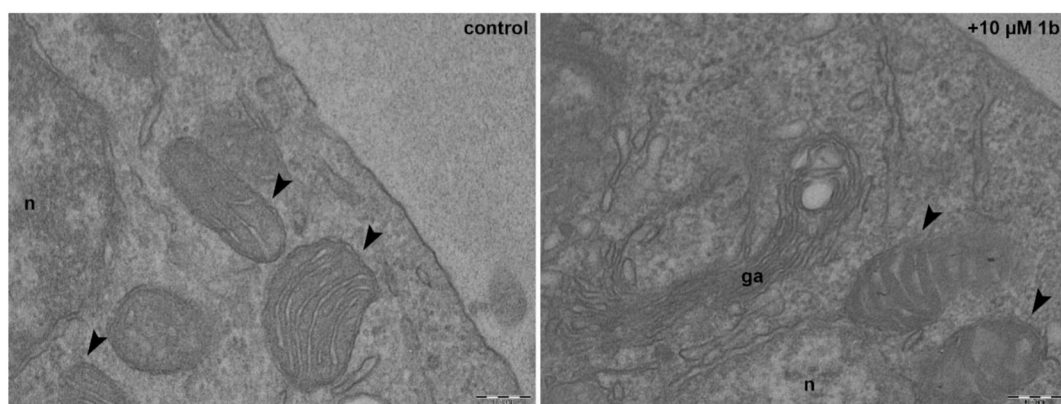


Fig. 6. EM analysis of the impact of compound **1b** on mitochondria in CCRF-CEM cells. CCRF-CEM cells were incubated without (left panel) or with (right panel) 10 μM compound **1b** and processed for electron microscopy. 70-nm sections were cut from the epon-embedded samples and post-contrasted by 3% uranyl acetate. n = nucleus; ga = Golgi apparatus; arrowheads indicated mitochondria. Scale bar = 0.2 μm .

expression. Finally, we explored effect of compounds on the main execution caspases-3/7 and PARP, as a representative of their downstream substrates. We found obvious caspase-3/7 activation induced by **8**, **21** and **22**, as documented by reduced level of precursor forms and presence of their active forms and well corresponding PARP cleavage. All these results nicely correlate with Annexin V measurement.

In order to obtain further insight into the interaction of our compounds with mitochondria, structures **1b** and **8** were treated to CCRF-CEM and HeLa cells to visualize their effects within the living cell using light fluorescent microscopy. Both compounds were found to interfere with the mitochondria of HeLa cells with stronger effect in compound **8**. Since this effect was not possible to be observed in CCRF-

CEM cells using the light fluorescent microscopy due to their tight clusters, an additional experiment was performed using the electron microscopy. These experiments confirmed, that compound **1b** causes changes in mitochondria organization in CCRF-CEM cells as well. Propargyl esters **13** and **14** were prepared from compounds **1b** and **8** and used for the direct visualization of the cellular targets of both compounds. Clear co-localization of compound **14** with mitochondria marker MT-CO2 in both CCRF-CEM and HeLa cells was observed. On the other hand, no signal was observed with compound **13**. This may be explained by the fact that free 28-COOH group of triterpenic acids is usually important for their activity and since here it was used for the introduction of the propargyl group, it diminished the activity/cell

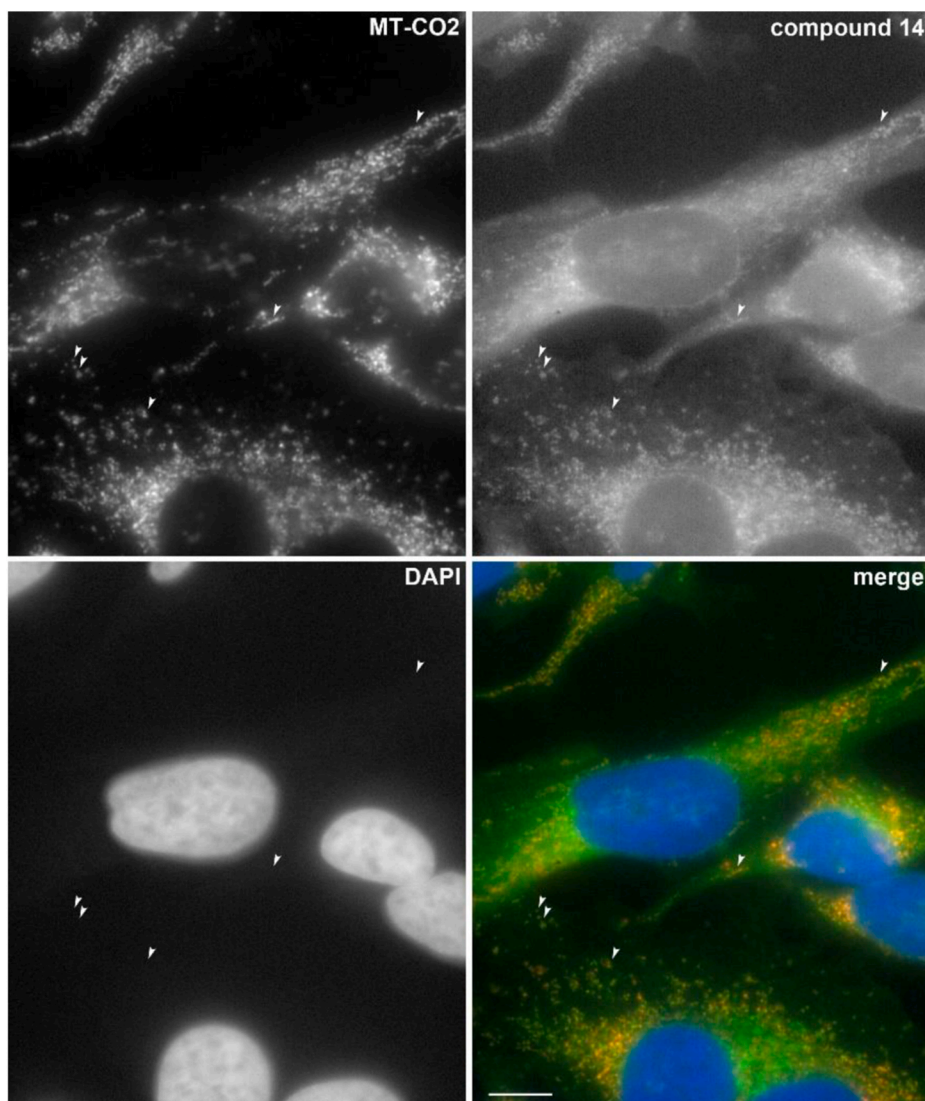


Fig. 7. Detection of compound **14** by click reaction. HeLa cells were incubated with 10 μM compound **14** for 4 h. Compound **14** was detected by copper-catalyzed click reaction with 5-FAM azide (green in merged figure). Simultaneously, mitochondrial marker MT-CO2 (red in merged figure) and nuclear DNA (blue in merged figure) were visualized. Scale bar = 10 μm .

permeability for the compound **13** while some activity remained in the more cytotoxic analogous derivative **14**.

As a further step towards anticancer drug development, the effects of compounds **1b**, **8**, **17**, and **21** in spheroid cultures of HCT116 and HeLa cells were tested to determine their activity in pathophysiologically relevant *in vitro* tumor models. All derivatives significantly inhibited growth and resulted in the complete disintegration of spheroids of both cell types at the highest tested 10 μM concentration. Compounds **1b** and **21** resulted in dose-dependent growth inhibition and a partial opening of spheroids at 1 μM in HeLa cell spheroids which can potentially help the penetration of other less-penetrating cytotoxic drugs in tumors during combination therapy.

To sum up, a small library of triterpenoid pyridines and pyrazines was prepared and based on their ADME parameters, more derivatives were obtained to improve their cell permeability and selectivity. Among all synthesized compounds, the medoxomil prodrugs **23–28** had activity in low nanomolar concentration range and these compounds will be included in the future *in vivo* tests to determine their behavior in living organisms and to show if it is worth to use this prodrug moiety. Compounds **1c**, **2b**, and **2c** are significantly more active in daunorubicin resistant CEM-DNR cells and in taxol resistant K562-Tax cells which

deserves thorough studies in the future. All studies of the mechanism of action show that the active compounds cause selective apoptosis via intrinsic pathway.

Future directions. Compounds **1b**, **1c**, **2b**, **2c**, **24**, and **26–28** were selected as the most promising structures for further drug development because of their low IC_{50} and high selectivity. Especially the medoxomil prodrugs **24–28** will require *in vivo* tests to prove their usefulness. Compounds **1c**, **2b**, and **2c** will be studied because of their selectivity against resistant cancer cell lines.

4. Experimental procedures

4.1. Chemistry

Melting points were determined using either the Büchi B-545 apparatus or the STUART SMP30 apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on an Autopol III (Rudolph Research, Flanders, USA) polarimeter in MeOH at 25 $^{\circ}\text{C}$ and are in $[10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}]$. Infrared spectra were recorded on a Nicolet Avatar 370 FTIR and processed in the OMNIC 9.8.372. DRIFT stands for Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform. ^1H and ^{13}C experiments were performed on

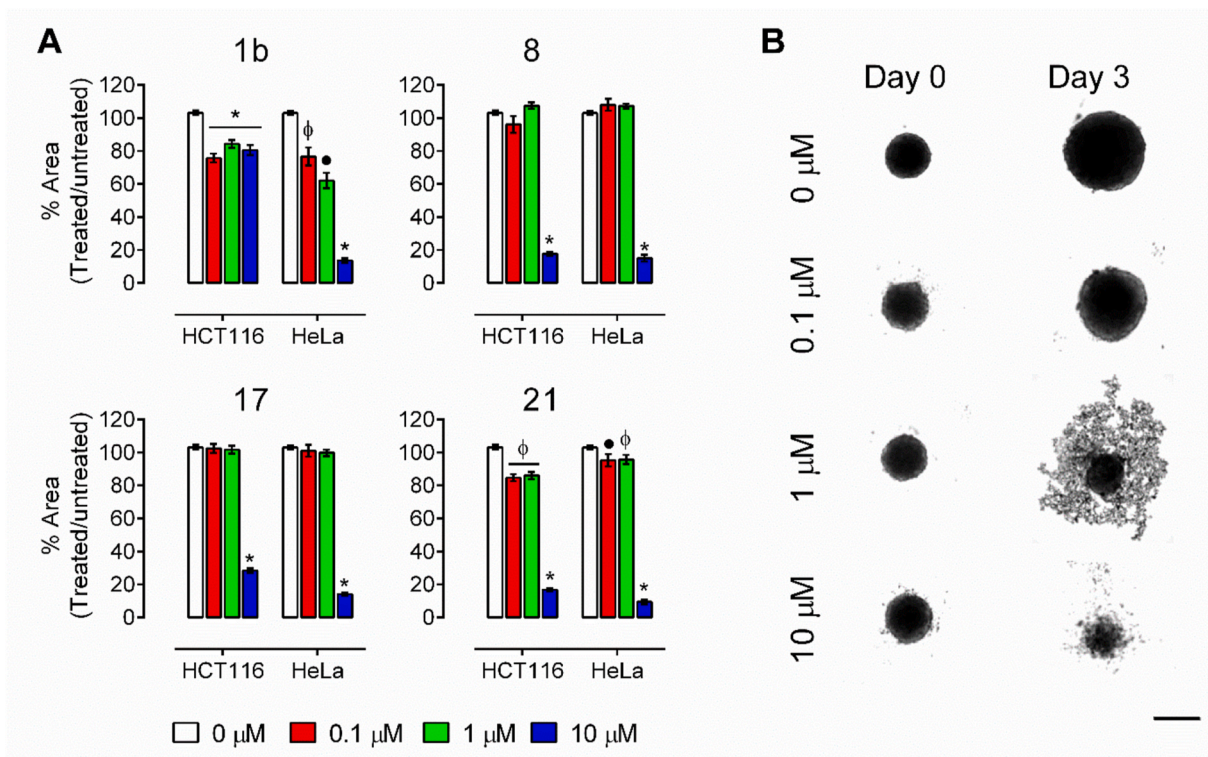


Fig. 8. Derivative effect in 3D spheroid cultures. (A) Graphs showing the change in the size (area) of spheroids of HCT116 and HeLa cells following treatment with the **1b**, **8**, **17** and **21** at indicated concentrations. $n = 3$ independent experiments, $*p < 0.001$, $\bullet p < 0.01$, $\phi p < 0.05$ vs $0 \mu\text{M}$ (Control), one-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test. (B) Representative images showing HeLa spheroids before the start of drug treatment (Day 0) and 3 days after treatment with **21**. Note the opening of spheroids at $1 \mu\text{M}$ and complete disintegration of spheroids at $10 \mu\text{M}$. Scale bar: $100 \mu\text{m}$, $n = 3$ independent experiments.

Jeol ECX-500SS (500 MHz for ^1H), and Varian^{UNITY} Inova 400 (400 MHz for ^1H) instruments, using CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD or $\text{THF}-d_8$ as solvents (25°C). Chemical shifts (δ) were referenced to the residual signal of the solvent (CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD or $\text{THF}-d_8$) and are reported in parts per million (ppm). Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). NMR spectra were processed in the ACD/NMR Processor Academic Edition 12.01, MestReNova 6.0.2–5475 or JEOL Delta v5.0.5.1. EI-MS spectra were recorded on an INCOS 50 (Finnigan MAT) spectrometer at 70 eV and an ion source temperature of 150°C . The samples were introduced from a direct exposure probe at a heating rate of 10 mA/s . Relative abundances stated are related to the most abundant ion in the region of $m/z > 180$. HRMS analysis was performed using an LC-MS Orbitrap Elite high-resolution mass spectrometer with electrospray ionization (Dionex Ultimate 3000, Thermo Exactive plus, MA, USA). Spectra were taken at the positive and negative mode in the range of $400\text{--}700 m/z$. The samples were dissolved in MeOH and injected to the mass spectrometer over autosampler after HPLC separation: precolumn Phenomenex Gemini (C18, $50 \times 2 \text{ mm}$, $2.6 \mu\text{m}$), mobile phase isocratic MeOH/water/HCOOH 95:5:0.1. The course of the reactions was monitored by TLC on Kieselgel 60 F_{254} plates (Merck) detected first by UV light (254 nm) and then by spraying with 10% aqueous H_2SO_4 and heating to 150°C - 200°C . Purification was performed using column chromatography on Silica gel 60 (Merck 7734).

Betulonic acid (**1a**), dihydrobetulonic acid (**2a**), oleanonic acid (**3a**), moronic acid (**4a**), ursonic acid (**5a**), heterobetulonic acid (**6a**), and allobetulon (**7a**) were purchased from company Betulinines (www.betulinines.com), which manufactures them from betulin, betulonic acid and oleanolic acid in bulk scale. All other chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich, Lachner or Across Chemicals.

4.2. General procedure for preparing pyridines (procedure A)

The procedure was adopted from the lit [9,13]. and slightly

modified. To a stirred solution of 3-oxotriterpenes **1a–7a** in dry EtOH was added propargylamine (5 equiv.), CuCl (0.6 equiv.) and activated molecular sieves (3 \AA). Reaction mixture was stirred in reaction vial for $48\text{--}120 \text{ h}$ at 80°C and monitored by TLC (toluene/diethyl ether 5 : 1, UV detection). Then the reaction mixture was filtered, the solvent was evaporated and the crude brown product was purified by column chromatography (toluene/diethyl ether 10 : 1). The final products **1c–7c** were obtained as white solid.

4.2.1. Lup-2-eno [2,3-b]pyridine-28-oic acid **2c**

Compound **2c** was prepared according to the general procedure A, the reaction time was 120 h and the product was crystallized from $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ to give 188 mg (35%) of pyridine **2c**: m. p. $142\text{--}143^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.75–0.81 (m, 6H), 0.88 (d, 3H, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 1.00 (d, 6H, $J = 6.4 \text{ Hz}$), 1.28 (s, 3H), 1.32 (s, 3H, $7 \times \text{CH}_3$), 1.83 (td, 1H, $J_1 = 6.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 2.5 \text{ Hz}$), 1.93 (dd, 1H, $J_1 = 12.2 \text{ Hz}$, $J_2 = 7.5 \text{ Hz}$), 2.31–2.34 (m, 1H, H-1a), 2.35–2.36 (m, 2H), 2.75 (d, 1H, $J = 15.8 \text{ Hz}$, H-1b), 7.03 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 4.8 \text{ Hz}$), 7.27–7.30 (m, 1H), 8.47 (dd, 1H, $J_1 = 4.7 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.2 \text{ Hz}$, $3 \times \text{H-pyridine}$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 14.70, 14.87, 15.85, 16.01, 20.39, 21.70, 22.98, 23.18, 27.15, 29.97, 31.51, 31.73, 32.36, 33.74, 36.32, 37.56, 38.41, 39.54, 40.75, 42.77, 44.31, 45.98, 48.71, 48.95, 53.70, 56.97, 120.05, 121.16, 130.25, 138.46, 146.77, 163.52, 180.64; IR (DRIFT) ν_{max} : 3530 , 2866 , 1693 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{NO}_2$ [M+H]⁺ 492.3836, found 492.3835.

4.2.2. Oleana-2,12-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid **3c**

Compound **3c** was prepared according to the general procedure A, the reaction time was 48 h and the product was crystallized from $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ to give 148 mg (27%) of pyridine **3c**: m. p. $168\text{--}169^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.85 (s, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.32 (s, 3H, $7 \times \text{CH}_3$), 1.79 (dd, 1H, $J_1 = 13.6 \text{ Hz}$, $J_2 = 4.1 \text{ Hz}$), 1.94–1.99 (m, 1H, H-11a), 1.99–2.07 (m, 2H), 2.39 (d, 1H, $J = 15.7$

H_z, H-1a), 2.67 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-1b), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, H-11b), 5.35 (t, 1H, $J = 3.4$ Hz, H-12), 7.01 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz), 7.26–7.29 (m, 1H), 8.47 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 1.1$ Hz, 3 × H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 14.10, 15.03, 16.93, 20.25, 22.63, 23.09, 23.41, 24.20, 25.70, 27.75, 30.71, 31.57, 32.23, 32.50, 33.11, 33.94, 36.02, 39.19, 41.25, 41.92, 45.45, 45.77, 45.96, 46.58, 53.53, 120.85, 122.30, 126.75, 137.86, 143.84, 146.90, 163.51, 182.60; IR (DRIFT) ν_{max} : 3502, 1694 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ [M+H]⁺ 490.3680, found 490.3680.

4.2.3. *Oleana-2,18(19)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid 4c*

The general procedure A only yielded 5% of the product, therefore, a modification using different catalyst and slightly different conditions was used. Propargylamine (57.5 μL , 0.88 mmol) and $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.012 mmol) were added to a stirred solution of moronic acid **4a** (100 mg, 0.22 mmol) in EtOH (5 mL). Reaction mixture was stirred in a reaction vial for 48 h at 90 °C and the conversion of the starting acid was monitored by TLC (toluene/diethyl ether 5 : 1). The reaction mixture was filtered, the solvent was evaporated and the crude brown product was purified by column chromatography (toluene/diethyl ether 10 : 1 to 5 : 1). The final product **4c** was obtained as white solid, 46 mg (41%): m. p. 232–234 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.82 (s, 6H), 0.99 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.35 (s, 3H, 7 × CH_3), 2.03 (dm, 1H, $J = 13.7$ Hz), 2.21 (dt, 1H, $J_1 = 13.0$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz), 2.32 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 2.38 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 2.82 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 5.18 (s, 1H, H-19), 7.05 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz), 7.33 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.52 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, 3 × H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 15.00, 15.99, 16.29, 20.21, 21.70, 24.02, 26.21, 29.26, 29.52, 30.56, 31.56, 32.22, 33.57, 33.67, 33.69, 33.84, 36.39, 39.56, 40.67, 41.59, 42.75, 46.21, 48.17, 49.56, 53.84, 121.13, 130.31, 133.15, 137.14, 138.65, 146.79, 163.58, 181.25; IR (DRIFT) ν_{max} : 2340–3680, 2933, 2863, 1696, 1583, 1449 cm^{-1} ; HRMS (APCI) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ [M+H]⁺ 490.3680, found 490.3680.

4.2.4. *Ursa-2,12-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid 5c*

Compound **5c** was prepared according to the general procedure A, the reaction time was 96 h and the product was crystallized from $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ to give 155 mg (28%) of pyridine **5c**: m. p. 185–187 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.86 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.89 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz), 0.95 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz), 1.13 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.31 (s, 3H, 7 × CH_3), 1.79 (dt, 1H, $J_1 = 12.9$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz), 1.92 (td, 1H, $J_1 = 13.6$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz), 2.05–2.08 (m, 1H, H-11a), 2.05 (m, 2H), 2.27 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, H-11b), 2.42 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz, H-1a), 2.70 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-1b), 5.32 (t, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-12), 7.00 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz), 7.26 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz), 8.47 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$ Hz, $J_2 = 1.3$ Hz, 3 × H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 14.25, 15.41, 17.16, 17.28, 20.37, 21.35, 22.79, 23.56, 24.41, 28.26, 30.92, 31.77, 31.83, 32.73, 36.11, 36.98, 39.00, 39.41, 39.56, 42.41, 45.78, 45.90, 48.19, 52.99, 53.73, 121.02, 125.70, 129.95, 137.97, 138.30, 147.06, 163.67, 182.61; IR (DRIFT) ν_{max} : 3508, 1737, 1693 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ [M+H]⁺ 490.3680, found 490.3679.

4.2.5. *Taraxasta-2,20(21)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid 6c*

The general procedure A only yielded 5% of the product, therefore, a modification using slightly different conditions was used. Propargylamine (57.5 μL , 0.88 mmol), CuCl (5 mg, 0.05 mmol) and activated molecular sieve beads (0.5 g, 3 Å) were added to a stirred solution of heterobetulinic acid **6a** in EtOH (5 mL). The reaction mixture was stirred in a reaction vial for 48 h at 80 °C while the conversion of the starting material was monitored by TLC (toluene/Et₂O 5 : 1, UV detection). Then the reaction mixture was filtered, the solvent was evaporated and the crude brown product was purified by column chromatography (toluene/Et₂O 10 : 1). The final product **6c** was obtained as white solid, 52 mg (48%): m. p. 121–123 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.79 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.02 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz), 1.29 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.65 (s, 3H, 7 × CH_3), 1.81 (ddd, 2H,

$J_1 = 15.0$ Hz, $J_2 = 19.9$ Hz, $J_3 = 2.3$ Hz), 2.04 (dd, 1H, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz), 2.15 (dd, 1H, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 6.7$ Hz), 2.30 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz), 2.38 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 2.46 (td, 1H, $J_1 = 18.8$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz), 2.78 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 5.30 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, H-21), 7.04 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 8.42–8.44 (m, 1H, 3 × H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 14.93, 15.92, 16.02, 20.31, 21.91, 22.30, 23.56, 24.00, 27.51, 29.24, 31.50, 33.05, 33.53, 36.31, 37.44, 37.98, 39.27, 39.53, 40.86, 42.07, 46.07, 48.88, 49.05, 53.73, 117.02, 121.17, 130.33, 138.53, 143.37, 146.63, 163.50, 180.30; IR (DRIFT) ν_{max} : 2450–3670, 2936, 2868, 1697, 1583, 1445 cm^{-1} ; HRMS (APCI) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ [M+H]⁺ 490.3680, found 490.3680.

4.2.6. *19 β ,28-epoxy-18 α -olean-2-eno [2,3-b]pyridine 7c*

Compound **7c** was prepared according to the general procedure, the reaction time was 120 h and the product was crystallized from $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ to give 122 mg (23%) of pyridine **7c**: m. p. 218–219 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.81 (s, 6H), 0.94 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.32 (s, 3H, 7 × CH_3), 2.37 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H-1a), 2.77 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H-1b), 3.46 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-28a), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.80 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, H-28b), 6.98 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz), 7.25 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 8.46–8.44 (m, 1H, 3 × H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 16.66, 15.58, 16.13, 20.30, 21.71, 24.20, 24.73, 26.40, 26.58, 26.65, 28.95, 28.98, 31.76, 32.87, 33.24, 34.46, 36.44, 36.89, 39.60, 40.63, 40.91, 41.66, 46.23, 46.95, 49.53, 53.81, 71.45, 88.07, 120.78, 129.70, 137.60, 147.41, 164.05; IR (DRIFT) ν_{max} : 2942, 2859 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{NO}$ [M+H]⁺ 476.3886, found 476.3887.

4.3. General procedure for preparing 30-oxo derivatives (procedure B)

A modified literature procedure was used [26]. To a stirred solution of triterpenic acid **1b** or **9** in 2-methoxyethanol was added SeO_2 (2 equiv.) and the solution was refluxed. Reaction was monitored by TLC (toluene/diethyl ether 4 : 1) which indicated its completion after 4–6 h. Then the reaction mixture was filtered and diluted with water. The product was extracted with EtOAc (4 × 10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica with Tol/Et₂O (from 10:1 to 2:1) as an eluent to give compounds **8** and **11**.

4.3.1. *30-Oxolupa-2,20(29)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oic acid 8*

SeO_2 (498 mg, 4.5 mmol, 2.2 equiv.) was added to a solution of pyrazine **1b** (1 g, 2.0 mmol) in 2-methoxyethanol (30 mL) and the reaction mixture was stirred under reflux for 6 h. Crude product was precipitated by pouring into cold water, filtered off, dried and chromatographed on silica with Tol/Et₂O (from 5 : 1 to 2 : 1). Collected fractions were evaporated which yielded white solid of **8**. Yield: 565 mg (55%), white solid, m.p. 265–267 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.79 (s, 3H); 1.00 (s, 3H); 1.01 (s, 3H); 1.26 (s, 3H); 1.29 (s, 3H, 5 × CH_3); 1.74 (dd, 1H, $J_1 = 22.4$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz); 1.97–2.04 (m, 1H); 2.23–2.37 (m, 2H); 2.43 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz, H-19 β); 3.02 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz); 3.37 (td, 1H, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3 α); 5.95 (s, 1H, H-29a); 6.31 (s, 1H, H-29b); 8.28 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 8.42 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, 2 × H-pyrazine), 9.55 (s, 1H, H-30); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 14.73, 14.81, 15.79, 16.24, 20.20, 21.54, 24.13, 27.32, 29.82, 31.63, 32.04, 32.15, 33.48, 36.93, 37.05, 38.53, 39.66, 40.67, 42.61, 48.67, 48.74, 50.45, 53.18, 56.65, 134.27, 141.47, 142.53, 150.81, 156.25, 159.91, 181.33, 195.17; IR (DRIFT) ν_{max} : 2938, 2868, 1683, 1431 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_3$ [M+H]⁺ 505.3425, found 505.3425.

4.3.2. *30-Oxolup-20(29)-en-28-oic acid 11*

Compound **11** was prepared from betulinic acid **9** (1 g, 2.2 mmol) according to the general procedure. Yield: 505 mg (49%), white solid. Analytical and spectral data were in agreement with the literature [26].

4.4. General procedure for preparing propargyl esters (procedure C)

To a stirred solution of starting material in DMF was added potassium carbonate (K_2CO_3 , 3 equiv.) and propargyl bromide (2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction was monitored by TLC (Tol/Et₂O = 5 : 1, v/v), which indicated its completion after 4 h. The reaction mixture was filtered and diluted with water. The product was extracted with EtOAc (4 × 10 mL). The combined organic extracts were dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica with Tol/Et₂O (from 20 : 1 to 2 : 1) as an eluent to give each propargyl ester.

4.4.1. Propargyl 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oate 10

Compound **10** was prepared according to the general procedure C with betulinic acid **9** (3 g, 6.6 mmol). Yield: 2.3 g (71%), white solid, m.p. 184–186 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.67–0.69 (m, 1H), 0.75 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 1.68 (s, 3H, 6 × CH₃), 1.84–1.96 (m, 2H), 2.16–2.24 (m, 1H), 2.25–2.31 (m, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.43 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 2.97–3.05 (m, 1H), 3.18 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 4.60 (dd, 1H, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz, H-29-*pro E*), 4.70 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, H-29-*pro Z*), 4.74 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 7.12–7.19 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.86, 15.49, 16.17, 16.28, 18.45, 19.54, 25.70, 27.57, 28.13, 29.79, 30.68, 32.11, 34.50, 36.94, 37.36, 38.44, 38.89, 39.01, 40.97, 42.56, 47.01, 49.68, 50.74, 51.46, 55.53, 56.75, 74.46, 79.13, 109.79, 128.36, 129.17, 150.58, 175.32; IR (DRIFT) ν_{max} : 3273, 2938, 2869, 1720, 1642 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₃H₅₀O₃ [M+H]⁺ 495.3883, found 495.3833.

4.4.2. Propargyl 3β-hydroxy-30-oxolup-20(29)-en-28-oate 12

Compound **12** was prepared according to the general procedure C with 30-oxo betulinic acid **11** (1 g, 1.97 mmol). Yield: 509 mg (47%), white solid; m.p. 188–192 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.74 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.95 (s, 3H, 5 × CH₃), 1.87–1.99 (m, 2H), 1.96–2.08 (m, 2H), 2.19 (td, 1H, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz), 2.28–2.33 (m, 1H), 2.43 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz), 3.16 (dd, 1H, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-19β), 3.33 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3α), 4.67 (dd, 1H, $J_1 = 21.1$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz), 5.89 (s, 1H, H-29a), 6.27 (s, 1H, H-29b), 9.51 (s, 1H, H-30); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.74, 15.49, 16.12, 16.23, 18.41, 20.99, 27.33, 27.52, 28.11, 29.70, 29.83, 31.87, 32.00, 34.44, 36.76, 37.30, 38.27, 38.86, 38.99, 40.88, 42.47, 50.51, 50.62, 51.53, 55.46, 56.82, 74.53, 77.16, 78.23, 79.08, 156.27, 175.14, 195.06; ν_{max} : 3558, 3294, 2946, 1730, 1671 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₃H₄₈O₄ [M+H]⁺ 509.3628, found 509.3630.

4.4.3. Propargyl lup-2,20(29)-dieno [2,3-*b*]pyridine-28-oate 13

Compound **13** was prepared according to the general procedure C with pyrazine **1b** (500 mg, 1 mmol). Yield: 450 mg (83%), white solid; m.p. 177–181 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.80 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.71 (s, 3H, 6 × CH₃), 1.75–1.79 (m, 1H), 1.88–1.97 (m, 2H), 2.26–2.32 (m, 2H), 2.42–2.47 (m, 2H), 3.00–3.06 (m, 2H), 4.62–4.66 (m, 2H, H-29-*pro E* and H-33a), 4.72 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, H-33b), 4.76 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-29-*pro Z*), 8.26 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.39 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 2 × H-pyrazine); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.85, 15.79, 16.26, 19.62, 20.25, 21.59, 24.16, 25.71, 29.80, 30.71, 31.65, 32.05, 33.53, 36.92, 36.97, 38.51, 39.64, 40.84, 42.63, 46.97, 48.89, 48.98, 49.59, 51.49, 53.24, 56.79, 74.47, 78.29, 109.91, 141.65, 142.41, 150.43, 151.01, 159.80, 175.31; IR (DRIFT) ν_{max} : 3279, 2937, 2874, 1716, 1744 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₅H₄₈N₂O₂ [M+H]⁺ 529.3789, found 529.3787.

4.4.4. Propargyl 30-oxolupa-2,20(29)-dieno [2,3-*b*]pyridine-28-oate 14

Compound **14** was prepared according to the general procedure C with 30-oxo pyrazine **8** (300 mg, 0.6 mmol). Yield: 151 mg (47%), white solid, m.p. 200–204 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: ¹H NMR δ: 0.78 (s,

3H), 0.98 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.28 (s, 3H, 5 × CH₃), 1.71 (dd, 1H, $J_1 = 21.9$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz), 1.93 (dd, 1H, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz), 2.00–2.08 (m, 2H), 2.23–2.36 (m, 1H), 2.40–2.44 (m, 2H), 3.00 (d, 1H, $J_1 = 16.5$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-19β), 3.35 (td, 1H, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3α), 4.69 (dq, 1H, $J_1 = 37.9$ Hz, $J_2 = 15.5$ Hz, $J_3 = 2.3$ Hz), 5.93 (s, 1H, H-29a), 6.30 (s, 1H, H-29b), 8.25 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.39 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, 2 × H-pyrazine), 9.54 (s, 1H, H-30); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.73, 15.74, 16.22, 20.21, 21.53, 24.15, 25.90, 27.29, 29.71, 31.63, 31.81, 31.88, 33.46, 36.74, 36.91, 38.35, 39.63, 40.75, 42.55, 48.75, 48.80, 50.33, 51.56, 53.15, 56.85, 74.55, 78.23, 134.52, 141.58, 142.46, 150.88, 156.05, 159.82, 175.14, 195.13; IR (DRIFT) ν_{max} : 3273, 2931, 1735, 1681 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₅H₄₆N₂O₃ [M+H]⁺ 543.3581, found 543.3582.

4.5. General procedure for preparing triterpenic glucose conjugates (procedure D)

To a stirred solution of triterpenic alkynes in DMF was added azide **II** or **III** (1.5 equiv.) and CuI (4 mol %, 0.016 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 24 h. The reaction mixture was filtered and DMF was evaporated in vacuo. The crude products were dissolved in CH₃CN (3 mL) and purified by reverse phase HPLC (in gradient from 80% MeCN in H₂O to 100% CH₃CN) to afford final compounds **18–25**.

4.5.1. Conjugate 15

Compound **15** was prepared according to the general procedure D with alkyne **10** (0.3 g, 0.6 mmol) and azide **II**. Yield: 164 mg (31%), white solid, m.p. 120–122 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.73 (s, 3H); 0.79 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.94 (s, 3H, 5 × CH₃), 1.66 (s, 3H, 30-CH₃), 1.85 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.08 (s, 3H, 4 × Ac), 2.60 (s, 1H), 2.98 (td, 1H, $J_1 = 11.0$, $J_2 = 4.5$ Hz, H-19β), 3.16 (dd, 1H, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3α), 3.99 (ddd, 1H, $J_1 = 9.9$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, $J_3 = 2.0$ Hz), 4.12 (dd, 1H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz), 4.31 (dd, 1H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz), 4.58 (s, 1H, H-29-*pro E*), 4.72 (s, 1H, H-29-*pro Z*), 5.17–5.26 (m, 3H), 5.35–5.47 (m, 2H), 5.83–5.91 (m, 1H), 7.83 (s, 1H, triazole); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.81, 15.47, 15.94, 16.25, 18.40, 19.43, 20.25, 20.64, 20.80, 20.99, 25.64, 27.51, 28.09, 29.74, 30.63, 32.06, 34.41, 36.98, 37.29, 38.37, 38.84, 38.97, 40.81, 41.10, 42.51, 47.02, 49.57, 50.66, 55.46, 56.67, 57.01, 61.59, 67.76, 70.44, 72.70, 75.37, 79.06, 85.94, 109.83, 122.16, 144.13, 150.54, 168.87, 169.44, 170.02, 170.57, 175.95; IR (DRIFT) ν_{max} : 3476, 1754, 1642 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₇H₆₉N₃O₁₂ [M+H]⁺ 868.4954, found 868.4950.

4.5.2. Conjugate 16

Compound **16** was prepared according to the general procedure D with alkyne **10** (0.25 g, 0.5 mmol) and azide **III**. Yield: 163 mg (46%), white solid, m.p. 120–124 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 0.80 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.73 (s, 3H, 5 × CH₃), 2.29 (td, 2H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz), 3.02–3.10 (m, 1H), 3.17 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz), 3.51–3.68 (m, 1H), 3.78 (dd, 1H, $J_1 = 12.2$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz), 3.89–3.97 (m, 2H), 4.64 (s, 1H, H-29-*pro E*), 4.76 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H-29-*pro Z*), 5.26 (dd, 2H, $J_1 = 32.0$, $J_2 = 12.8$ Hz, glu-CH₂OH), 5.66 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz), 8.26 (s, 1H, triazole); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ: 15.11, 16.12, 16.62, 16.79, 19.45, 19.54, 22.06, 26.87, 28.04, 28.61, 30.79, 31.58, 32.96, 35.51, 37.77, 38.32, 39.61, 39.95, 40.09, 41.94, 43.52, 50.68, 51.99, 56.87, 57.68, 57.86, 62.41, 70.90, 73.53, 74.02, 78.53, 79.67, 81.18, 89.62, 110.31, 125.27, 144.17, 151.75, 177.08; IR (DRIFT) ν_{max} : 3353, 1725, 1665 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₉H₆₁N₃O₈ [M+H]⁺ 700.4531, found 700.4528.

4.5.3. Conjugate 17

Compound **17** was prepared according to the general procedure D with alkyne **12** (0.21 g, 0.4 mmol) and azide **II**. Yield: 124 mg (33%), white solid, m.p. 159–163 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.74 (s, 3H),

0.78 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.95 (s, 3H, 5 × CH₃), 1.86 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.08 (s, 3H, 4 × Ac), 3.30–3.39 (m, 1H), 3.97–4.02 (m, 1H), 4.09–4.17 (m, 2H), 4.31 (dd, 1H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz), 5.23 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz), 5.41–5.49 (m, 2H), 5.85–5.89 (m, 1H), 5.90 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 7.95 (s, 1H, triazole), 9.51 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, CHO); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.34, 14.75, 15.48, 15.93, 16.21, 18.41, 20.27, 20.65, 20.67, 20.82, 20.99, 21.18, 27.43, 27.51, 28.11, 29.67, 29.83, 31.97, 34.41, 36.82, 37.29, 38.43, 38.86, 38.99, 40.77, 42.46, 50.48, 55.46, 56.80, 57.43, 60.53, 61.72, 67.84, 70.50, 72.78, 75.41, 79.08, 86.00, 122.19, 144.18, 156.39, 168.88, 169.47, 170.07, 170.60, 175.77, 195.08; IR (DRIFT) ν_{\max} : 3557–3406, 1755, 1686, 1620 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₇H₆₇N₃O₁₃ [M+H]⁺ 882.4747, found 882.4743.

4.5.4. Conjugate 18

Compound **18** was prepared according to the general procedure **D** with alkyne **12** (0.26 g, 0.51 mmol) and azide **III**. Yield: 190 mg (54%), white solid, m.p. 161–165 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 0.75 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.95 (s, 3H, 5 × CH₃), 3.11 (dd, 1H, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 1H), 3.32–3.39 (m, 1H), 3.47–3.62 (m, 3H), 3.73 (dd, 1H, $J_1 = 12.2$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz), 3.84–3.93 (m, 2H), 5.23 (dd, 2H, $J_1 = 33.0$ Hz, $J_2 = 12.8$ Hz, glu-CH₂OH), 5.62 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz), 6.03 (s, 1H, H-29 *pro-E*), 6.39 (s, 1H, H-29 *pro-Z*), 8.24 (s, 1H, triazole), 9.50 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ: 14.98, 16.11, 16.58, 16.74, 19.43, 22.07, 28.02, 28.60, 30.74, 32.74, 33.40, 35.50, 37.58, 38.29, 39.51, 39.94, 40.05, 40.44, 41.87, 43.42, 49.63, 51.80, 52.37, 56.83, 57.83, 57.96, 62.42, 70.90, 74.03, 78.52, 79.64, 81.18, 89.62, 125.26, 135.15, 144.17, 158.22, 176.92, 196.79; IR (DRIFT) ν_{\max} : 3353, 1724, 1684 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₃₉H₅₉N₃O₉ [M+H]⁺ 714.4324, found 714.4327.

4.5.5. Conjugate 19

Compound **19** was prepared according to the general procedure **D** with alkyne **13** (0.33 g, 0.6 mmol) and azide **II**. Yield: 170 mg (30%), white solid, m.p. 130–131 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.77–0.82 (m, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.26–1.27 (m, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.69 (s, 3H, 6 × CH₃), 1.85–1.87 (m, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.06–2.08 (m, 4 × Ac), 2.22–2.31 (m, 2H), 2.43 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 2.95–3.07 (2H, H-19β a H-1a), 4.16 (ddd, 1H, $J_1 = 37.7$ Hz, $J_2 = 12.6$ Hz, $J_3 = 2.1$ Hz), 4.24–4.35 (m, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.75 (dd, 1H, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz), 5.14–5.33 (m, 3H), 5.36–5.47 (m, 2H), 5.77–5.90 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.26 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 8.39 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, 2 × H-pyrazine); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.80, 15.58, 15.82, 16.24, 19.52, 20.23, 20.26, 20.64, 20.81, 21.55, 24.16, 25.66, 29.77, 30.67, 31.63, 32.01, 33.46, 36.92, 36.97, 38.45, 39.61, 40.69, 42.61, 46.99, 48.85, 48.92, 49.50, 53.18, 56.73, 57.05, 61.59, 67.77, 70.44, 72.71, 75.39, 85.97, 109.97, 122.11, 141.64, 142.42, 144.15, 150.40, 150.95, 159.77, 168.87, 169.44, 170.02, 170.55, 175.93; IR (DRIFT) ν_{\max} : 1755, 1642 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₉H₆₇N₅O₁₁ [M+H]⁺ 902.4910, found 902.4908.

4.5.6. Conjugate 20

Compound **20** was prepared according to the general procedure **D** with alkyne **13** (0.5 g, 0.95 mmol) and azide **III**. Yield: 261 mg (38%), white solid, m.p. 132–136 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.78 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.67 (s, 3H, 6 × CH₃), 2.23 (d, 2H, $J = 9.6$ Hz), 2.43 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H-1a), 2.88–3.12 (m, 2H), 3.60 (s, 1H), 3.75–3.98 (m, 4H, 4 × H-glucose), 4.13 (s, 1H), 4.60 (s, 1H, H-29 *pro-E*), 4.72 (s, 1H, H-29 *pro-Z*), 5.14 (dd, 3H, $J_1 = 66.2$ Hz, $J_2 = 12.16$ Hz), 5.56 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.90 (s, 1H, triazole), 8.25 (s, 1H), 8.39 (s, 1H, 2 × H-pyrazine); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.82, 15.65, 16.31, 19.48, 20.24, 21.58, 24.22, 25.63, 29.82, 30.65, 31.63, 32.03, 33.48, 36.92, 36.97, 38.44, 39.63, 40.69, 42.61, 47.03, 48.69, 48.90, 49.47, 53.16, 56.73, 57.02, 61.06, 68.88, 72.58, 79.02, 87.95, 110.17, 124.59, 137.95, 141.46, 142.52, 143.27, 150.23, 150.77, 159.86, 176.01; IR (DRIFT) ν_{\max} : 3367, 1725, 1641 cm⁻¹;

HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₁H₅₉N₅O₇ [M+H]⁺ 734.4487, found 734.4488.

4.5.7. Conjugate 21

Compound **21** was prepared according to the general procedure **D** with alkyne **14** (0.2 g, 0.37 mmol) and azide **ii**. Yield: 123 mg (35%), white solid, m.p. 158–162 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.76–0.80 (m, 3H), 0.88–0.97 (m, 6H), 1.26 (s, 3H), 1.28 (s, 3H, 5 × CH₃), 1.86 (s, 3H), 1.98–2.10 (m, 12H, 4 × Ac), 2.41 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 2.99 (d, 1H, $J_1 = 16.5$ Hz), 3.31–3.39 (m, 1H), 3.97–4.03 (m, 1H), 4.17 (ddd, 1H, $J_1 = 30.2$ Hz, $J_2 = 12.6$ Hz, $J_3 = 2.1$ Hz), 4.30 (td, 1H, $J_1 = 12.6$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 5.18 (q, 1H, $J = 12.9$ Hz), 5.22–5.32 (m, 1H, H-29 *pro-E*), 5.36–5.53 (m, 1H, H-29 *pro-Z*), 5.84 (dd, 1H, $J_1 = 28.9$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz), 5.91–5.99 (m, 2H), 6.30 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.25 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.39 (s, 1H, 2 × H-pyrazine), 9.54 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, CHO); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 14.72, 15.55, 16.19, 20.20, 20.26, 20.65, 20.80, 21.52, 24.15, 27.38, 29.68, 29.82, 31.63, 31.89, 33.44, 36.78, 36.89, 38.28, 38.49, 39.62, 40.64, 42.55, 48.72, 48.79, 50.53, 53.16, 56.83, 57.44, 61.69, 67.83, 69.60, 70.49, 72.76, 75.40, 85.99, 122.15, 141.57, 142.47, 144.16, 148.07, 150.81, 156.17, 159.81, 168.87, 169.45, 170.05, 170.56, 175.74, 195.13; IR (DRIFT) ν_{\max} : 3538–3402, 1754, 1689, 1621 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₉H₆₆N₅O₁₂ [M+H]⁺ 916.4702, found 916.4701.

4.5.8. Conjugate 22

Compound **22** was prepared according to the general procedure **D** with alkyne **14** (0.3 g, 0.42 mmol) and azide **III**. Yield: 92 mg (29%), white solid, m.p. 152–158 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 0.81 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.29 (s, 3H, 5 × CH₃), 2.25–2.32 (m, 2H), 2.48 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 2.97 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz), 3.38 (td, 1H, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-19β), 3.48–3.61 (m, 2H), 3.72 (dd, 1H, $J_1 = 12.2$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz), 3.85–3.94 (m, 2H), 5.25 (dd, 2H, $J_1 = 37.7$ Hz, $J_2 = 12.8$ Hz), 5.62 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz), 6.06 (s, 1H, H-29 *pro-E*), 6.42 (s, 1H, H-29 *pro-Z*), 8.23–8.27 (m, 2H, pyrazine and triazole), 8.44 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H pyrazine), 9.52 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ: 14.94, 16.14, 16.64, 21.16, 22.65, 24.43, 28.58, 30.75, 31.76, 32.68, 34.44, 37.56, 37.81, 39.61, 40.60, 41.71, 43.53, 49.00, 49.79, 52.10, 54.16, 57.83, 57.99, 62.42, 70.90, 74.03, 78.53, 81.19, 89.62, 115.03, 125.30, 128.82, 135.35, 142.32, 143.83, 144.17, 151.97, 158.17, 161.35, 176.93, 196.83; IR (DRIFT) ν_{\max} : 3348, 1723, 1686, 1620 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): m/z calcd for C₄₁H₅₇N₅O₈ [M+H]⁺ 748.4285, found 748.4280.

4.6. General procedure for preparing medoxomil derivatives (procedure E)

To a stirred solution of 4-(Chloromethyl)-5-methyl-1,3-dioxol-2-one (2.3 equiv.) in acetone (18 mL) triterpenic acid, KI (1.2 equiv.) and K₂CO₃ (3.3 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction was monitored by TLC (Tol/EtOAc = 5 : 1, v/v), which indicated its completion after 24 h. Acetone was removed from reaction under reduced pressure and dissolved in EtOAc. The extract was washed sequentially with water and brine, product extracted with EtOAc (4 × 10 mL) and combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica with Tol/Et₂O (from 20 : 1 to 2 : 1) as an eluent to give compounds **23–25**.

4.6.1. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl 3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oate **23**

Compound **23** was prepared according to the general procedure **E** with betulonic acid **9** (228 mg, 0.5 mmol). Yield: 210 mg (74%), white solid, m.p. 213–216 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.94–0.97 (m, 6H, 5 × CH₃), 1.16 (dt, 1H, $J_1 = 13.7$, $J_2 = 3.3$ Hz), 1.68 (s, 3H), 2.11 (td, 1H, $J_1 = 12.7$, $J_2 = 3.6$ Hz), 2.20 (s, 3H), 2.24 (dt, 1H, $J_1 = 13.0$, $J_2 = 3.3$ Hz), 2.92–2.99 (m, 1H, H-19β),

3.17 (dd, 1H, $J_1 = 11.4$, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3 α), 4.59–4.62 (m, 1H), 4.74 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 4.76 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 4.93 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.59, 14.86, 15.48, 15.80, 16.27, 18.43, 19.52, 21.04, 25.65, 27.56, 28.13, 29.73, 30.68, 32.11, 34.45, 36.91, 37.35, 38.54, 38.87, 39.01, 40.78, 42.55, 47.07, 49.63, 50.67, 53.18, 55.51, 56.92, 79.13, 109.94, 134.15, 140.07, 150.33, 152.30, 175.66; IR (DRIFT) ν_{max} : 3557, 1816, 1735, 1641 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^-$): m/z calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_6$ [M+H] $^-$ 567.3680, found 567.3689.

4.6.2. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl 3-oxolup-20(29)-en-28-oate **24**

Compound **24** was prepared according to the general procedure E with betulonic acid **1a** (227 mg, 0.5 mmol). Yield: 225 mg (81%), white solid, m.p. 147–150 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.87 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.06 (s, 3H, 5 \times CH_3), 1.18 (dt, 1H, $J_1 = 13.7$, $J_2 = 3.4$ Hz), 1.31 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz), 1.62 (t, 1H, $J = 11.4$ Hz), 1.68 (s, 3H), 2.12–2.18 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.25 (dt, 1H, $J_1 = 13.1$, $J_2 = 3.3$ Hz), 2.34–2.42 (m, 1H), 2.44–2.53 (m, 1H), 2.93–3.00 (m, 1H, H-19 β), 4.60–4.63 (m, 1H), 4.72–4.74 (m, 1H), 4.76 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz), 4.94 (d, 1H, $J_1 = 13.8$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.60, 14.78, 15.57, 16.10, 19.51, 19.77, 21.16, 21.55, 25.64, 26.76, 29.69, 30.63, 32.03, 33.73, 34.27, 36.87, 37.05, 38.60, 39.75, 40.71, 42.59, 47.03, 47.48, 49.53, 50.00, 53.20, 55.11, 56.88, 77.16, 110.01, 134.13, 140.09, 150.24, 152.29, 175.63, 218.24; IR (DRIFT) ν_{max} : 1823, 1727, 1707, 1641 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_6$ [M+H] $^+$ 567.3680, found 567.3683.

4.6.3. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl lup-2,20(29)-dieno [2,3-b]pyrazine-28-oate **25**

Compound **25** was prepared according to the general procedure E with pyrazine **1b** (245 mg, 0.5 mmol). Yield: 289 mg (96%), white solid, m.p. 100–104 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.80 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.29 (s, 3H, 5 \times CH_3), 1.70 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.26 (dt, 1H, $J_1 = 12.9$, $J_2 = 3.2$ Hz), 2.44 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 2.92–3.05 (m, 2H), 4.62–4.66 (m, 1H), 4.73–4.78 (m, 2H), 4.97 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 8.26 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.40 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 2 \times H-pyrazine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.62, 14.84, 15.37, 16.26, 19.59, 20.22, 21.57, 24.17, 25.63, 29.72, 30.67, 31.37, 31.64, 32.01, 33.45, 36.87, 36.94, 38.56, 39.63, 40.62, 42.60, 47.00, 48.83, 48.88, 49.50, 53.19, 56.94, 110.06, 134.14, 140.12, 141.64, 142.45, 150.18, 150.94, 152.32, 159.81, 175.64; IR (DRIFT) ν_{max} : 1823, 1731, 1641, 768 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_5$ [M+H] $^+$ 603.3792, found 603.3794.

4.6.4. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl lup-2,20(29)-dieno [2,3-b]pyridine-28-oate **26**

Compound **26** was prepared according to the general procedure E with pyridine **1c** (500 mg, 1.0 mmol). Yield: 500 mg (83%), white solid, m.p. 181–183 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.78 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.30 (s, 3H, 5 \times CH_3), 1.70 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.26 (dt, 1H, $J_1 = 12.8$, $J_2 = 3.2$ Hz), 2.32 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 2.72 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 2.99 (td, 1H, $J_1 = 10.8$, $J_2 = 4.7$ Hz), 4.59–4.68 (m, 1H), 4.72–4.85 (m, 2H), 4.95 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 6.97 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 4.7$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 8.45 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 1.0$ Hz, 3 \times H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.60, 14.85, 15.47, 15.82, 19.54, 20.34, 21.65, 24.23, 25.78, 29.74, 30.66, 31.77, 32.07, 33.66, 36.36, 36.90, 38.69, 39.60, 40.68, 42.62, 46.09, 47.06, 49.03, 49.57, 53.21, 53.67, 56.95, 109.99, 120.75, 129.65, 134.15, 137.57, 140.08, 147.39, 150.34, 152.30, 164.04, 175.68; IR (DRIFT) ν_{max} : 1824, 1726, 1401, 770 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{NO}_5$ [M+H] $^+$ 602.3840, found 602.3853.

4.6.5. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl lup-2-eno [2,3-b]pyrazine-28-oate **27**

Compound **27** was prepared according to the general procedure E with pyrazine **2b** (500 mg, 1.0 mmol). Yield: 490 mg (81%), white solid,

m.p. 199–201 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.77 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.81 (s, 3H), 0.88 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.90 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, 5 \times CH_3), 1.28 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.46 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 3.04 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 4.75 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 4.94 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 8.27 (dd, 1H, $J_1 = 3.9$, $J_2 = 2.3$ Hz), 8.39–8.42 (m, 1H, 2 \times H-pyrazine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.60, 14.77, 14.82, 15.41, 16.24, 20.24, 21.64, 22.91, 23.15, 24.18, 27.04, 29.75, 29.87, 31.66, 31.95, 33.58, 36.93, 37.28, 38.49, 39.66, 40.67, 42.79, 44.33, 48.71, 48.87, 49.07, 53.11, 53.21, 57.41, 134.24, 140.06, 141.65, 142.49, 150.91, 152.33, 159.87, 175.87; IR (DRIFT) ν_{max} : 1818, 1730, 1443, 770 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_5$ [M+H] $^+$ 605.3949, found 605.3972.

4.6.6. (5-Methyl-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl lup-2-eno [2,3-b]pyridine-28-oate **28**

Compound **28** was prepared according to the general procedure E with pyridine **2c** (500 mg, 1.0 mmol). Yield: 472 mg (77%), white solid, m.p. 222–224 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.77 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.79 (s, 3H), 0.88 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.91 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, 5 \times CH_3), 1.27 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 4.77 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 6.97 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 4.6$ Hz), 7.24 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.45 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 0.9$ Hz, 3 \times H-pyridine); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 9.60, 14.78, 14.83, 15.49, 15.79, 20.35, 21.68, 22.91, 23.13, 24.25, 27.14, 29.75, 29.93, 31.78, 31.98, 33.74, 36.35, 37.28, 38.55, 39.60, 40.69, 42.79, 44.34, 46.05, 48.78, 49.08, 53.10, 53.65, 57.41, 120.75, 129.63, 134.23, 137.55, 140.04, 147.42, 152.33, 164.07, 175.90; IR (DRIFT) ν_{max} : 1819, 1730, 1574, 1442, 771 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{NO}_5$ [M+H] $^+$ 604.3997, found 604.4009.

4.7. Biological evaluation

4.7.1. Cell culture and MTS cytotoxicity assay

Cytotoxicity screening was done according to the routine protocol developed earlier at our department [48,49]. All cells (if not indicated otherwise) were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC). The CCRF-CEM line is derived from T lymphoblastic leukemia, evincing high chemosensitivity, K562 represent cells from an chronic myeloid leukemia patient sample with bcr-abl translocation, U2OS cell line is derived from osteosarcoma, HCT116 is colorectal tumor cell line and its p53 gene knock-down counterpart (HCT116p53 $^-/-$, Horizon Discovery Ltd, UK) is a model of human cancers with p53 mutation frequently associated with poor prognosis, A549 line is lung adenocarcinoma, HeLa cell line is cervix adenocarcinoma. The daunorubicin resistant subline of CCRF-CEM cells (CEM-DNR bulk) and paclitaxel resistant subline K562-TAX were selected in our laboratory by the long term cultivation of maternal cell lines in presence of increasing concentrations of daunorubicine or paclitaxel, respectively. The CEM-DNR bulk cells overexpress MRP-1 and P-glycoprotein, while K562-TAX cells overexpress P-glycoprotein only. Both proteins belong to the family of ABC transporters and are involved in the primary and/or acquired multidrug resistance phenomenon [50]. MRC-5 and BJ cell lines were used as a non-tumor control and represent human fibroblasts. The cells were maintained in nunc/corning 75 cm^2 plastic tissue culture flasks and cultured in appropriate cell culture medium according to the ATCC or Horizon recommendations (DMEM/RPMI 1640 with 5 g/L glucose, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 10% fetal calf serum, and NaHCO_3). The cytotoxicity MTS assays were performed according to the standard procedure used at our institute and as described earlier [48,51,52].

4.7.2. Pharmacological parameters, chemical stability assay, stability in human plasma, microsomal stability assay, parallel artificial membrane permeability assay

These experiments were performed in the same way as in our earlier work [53] and according to the lit [34]. The detailed description is in the supporting information file.

4.7.3. Protein plasma binding

The assay is based on rapid equilibrium dialysis (RED) [54]. The plate inserts (Thermo Scientific™, Rockford, USA) for RED consist of two chambers (red and white) separated by a semi-permeable membrane. The 300 µL solution of each test compound (10 µM concentration) in 10% human plasma was transferred into the red chamber and white chamber was filled with 500 µL PBS buffer, pH 7.4. After the 4-h incubation, the equal volumes of the solutions from either compartment were transferred into the plate. 10% plasma or PBS buffer, pH 7.4 was added in order all the samples had the same matrix. The reactions were stopped by the addition of CH₃CN: methanol (2:1). Following centrifugation, the supernatants were lyophilized. The samples were dissolved in the mobile phase containing internal standard and are analyzed by the RF-MS.

4.7.4. Cell cultures

Cell cultures are fully described in the supporting information file.

4.7.5. Transport studies

MDR1-MCDK differentiated monolayers in Transwell® (96-well) plates [27] were used only if they were intact, as confirmed by Lucifer Yellow Rejection Assay. Prior to the experiment, the cells were washed twice with Hank's balanced buffer solution (HBBS) (Gibco, Waltham, USA) and pre-equilibrated for 1 h with HBSS buffered at pH 7.4. After removing the medium, the cells were treated with test compounds (at 10 µM in HBSS pH 7.4) for 1 h. After the incubation, the samples were lyophilized, dissolved in the mobile phase containing internal standard and analyzed on the RF-MS.

All experiments were done in duplicate. The apparent permeability coefficient was calculated as $P_{app} = (dQ/dt)/(C_0 \times A)$, where dQ/dt is the rate of permeation of the drug across the cell monolayer, C_0 is the donor compartment concentration at time $t = 0$ and A is the area of the cell monolayer. Efflux ratio R was defined as ratio P_{BA}/P_{AB} where P_{BA} and P_{AB} represent the apparent permeability of test compound from the basal to apical and apical to basal side of cell monolayer, respectively. The compounds with the efflux ratio of 2 or higher were considered as potential P-gp substrates.

4.7.6. Cell death evaluation using Annexin V

Cell death in CCRF-CEM cells was evaluated using Annexin V/propidium iodide combine staining. Cells were treated by **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** at $1 \times IC_{50}$ or $5 \times IC_{50}$ concentrations for 24 h. Then, cells harvested by centrifugation ($600 \times g$, 5 min, room temperature) were washed by ice-cold PBS and centrifuged again. The pellet was resuspended in annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH – pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) and density was adjusted to a final concentration of 5×10^5 cells per mL. The aliquot of 100 µL was stained by adding 5 µL of FITC conjugated Annexin V and 5 µL of propidium iodide solution (0.1 mg/mL). The samples were gently vortexed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Finally, cells were centrifuged, resuspended in 100 µL of annexin binding buffer and analyzed by FACS Aria II (Becton Dickinson) flow cytometer. At least 10 000 cells per sample were acquired.

4.7.7. Western blot

CCRF-CEM cells were treated with derivatives **1b**, **8**, **21**, **22**, **23**, and **24** at $1 \times IC_{50}$ and $5 \times IC_{50}$ concentrations for 24 h. Cell pellets were washed with ice cold PBS and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA and cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). In total, 10 µg of cellular proteins were denatured in Laemmli buffer (10% β-mercaptoethanol, 0.06% bromophenol blue, 47% glycerol, 12% SDS, 0.5 M Tris pH 6.8), separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-

Rad). The membranes were then incubated with primary antibodies against Bax (Cell Signaling Technology), Bid (Abcam), Bim (Cell Signaling Technology), caspase-3 (Cell Signaling Technology), caspase-7 (Cell Signaling Technology), c-Myc (Abcam), Noxa (Abcam), PARP (Cell Signaling Technology), and β-actin (Sigma Aldrich) overnight at 4 °C, followed by incubation with an appropriate peroxidase-linked secondary antibody (Sigma Aldrich). Chemiluminescence signals were visualized using the ChemiDoc MP Documentation system (Bio-Rad).

4.7.8. Fluorescence microscopy

CCRF-CEM cultured as suspension or HeLa cells cultured on coverslips (12 mm in diameter) in a Petri dish were incubated with or without 10 µM **1b** or **8** for 4 h. After incubation, cells were fixed with 2% formaldehyde (10 min, room temperature), washed, permeabilised with 0.2% Triton X-100 and washed again. Then, samples were incubated with the primary anti-MT-CO2 antibody (1:100, 30 min, room temperature, Abcam) diluted in $1 \times$ PBS followed by secondary antibody incubation (AlexaFluor 488 or DyLight 649 anti-mouse antibody, 1 : 100, 30 min, room temperature, Jackson ImmunoResearch) and DAPI (10 µM, ThermoFisher Scientific) diluted in 25 mM Tris-HCl, pH = 7.5 and 150 mM NaCl.

In the case of CCRF-CEM cells, cells were processed before antibody labelling as follows: 2 mL of cell suspension was transferred from the Petri dishes into 15-mL centrifuge tubes, 12 mL of $1 \times$ PBS was added, and cells were centrifuged 10 min at $150 \times g$. Supernatant was removed except for 1 mL, cells were resuspended, 14 mL of buffer was added, and cells were centrifuged 10 min at $150 \times g$. This step was repeated one more time. Supernatant was removed except for 1 mL, samples were put on ice and processed using the CytoTrap and wet centrifugation according to the lit [55]. Briefly, 0.5 mL of $1 \times$ PBS and 0.25 mL of cell suspension was added per one CytoTrap, and cells were centrifuged 10 min at $150 \times g$. Next, following solutions were gradually added to the samples, each addition was followed by centrifugation step: 1 mL of 2% formaldehyde (10 min at $150 \times g$), 1 mL of 150 mM NaCl (5 min at $150 \times g$), 1 mL of 20 mM CuSO₄ and 150 mM NaCl (10 min at $150 \times g$), 1 mL of 150 mM NaCl (5 min at $150 \times g$), 1 mL of 150 mM NaCl (5 min at $150 \times g$), 1 mL of 0.2% Triton X-100 (10 min at $150 \times g$), and 1 mL of $1 \times$ PBS (10 min at $150 \times g$). After centrifugation, samples were removed from the CytoTraps and the antibody staining was performed on the drops of solutions as described above.

When the click reaction detection was performed, cells were processed similarly as in the case of MT-CO2 detection with these modifications: cells were incubated in the secondary antibody solution (DyLight 649 anti-mouse) without DAPI addition. After short washing with the $1 \times$ PBS buffer, samples were post-fixed with 2% formaldehyde (10 min, room temperature), washed, and incubated in the click-reaction solution containing 5-FAM azide (30 min, room temperature [56]). Then, samples were washed with 25 mM Tris-HCl, pH = 7.5 and 150 mM NaCl and stained with DAPI (10 µM, 30 min, room temperature).

The samples were viewed using an Olympus IX83 microscope (UPLSAPO O objective 100×, NA 1.4). Images were taken by a Zyla camera (Andor) with a resolution of 2048 × 2048 or 1024 × 1024 pixels using CellSense Dimension acquisition software (Olympus).

4.7.9. Electron microscopy

CCRF-CEM cells were cultivated in corning 75 cm² plastic tissue culture flasks. The next day, 10 µM solution of **1b** was added to one culture flask, the second one serves as a control. After 4-h incubation, cells were washed with the $1 \times$ PBS buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in 100 mM cacodylate buffer supplemented with 2 mM CaCl₂ (2 h, room temperature). After incubation, samples were washed with 100 mM cacodylate buffer supplemented with 2 mM CaCl₂, followed by incubation with 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide in deionized water (1 h, room temperature), washing in deionized water, and staining with 1% uranyl acetate

(1 h, room temperature). Subsequently, samples were washed again, scratched off by cell scraper, and centrifugated (14 000×g, 5 min, room temperature). Supernatant was removed, 200 µL of 10% gelatine warmed to 37–40 °C was added, cells were resuspended and centrifugated (14 000×g, 5 min, room temperature). The excess of gelatine was removed, samples were placed on ice for 10 min, and then, post-fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% formaldehyde in 0.2 M PIPES (overnight, 4 °C). The next day, samples were washed with deionized water and cut into small pieces (to < 1 mm³). Samples were dehydrated in ethanol series (30%, 50%, 70%, and 90% – each 30 min; 100%–2 × 30 min) and propylene oxide (2 × 30 min), infiltrated in the mixture of propylene oxide and Epon (1 : 1, 60 min and 1 : 3, overnight, 4 °C). Finally, samples were incubated in Epon resin for 2 h, embedded in freshly prepared Epon resin and polymerised at 60 °C for 48 h. Ultrathin, 70-nm, epon sections were cut on Leica UltraCut microtome (Leica Microsystems) with a diamond knife (Diatome Ltd.). The sections were post-stained with 3% uranyl acetate and viewed using electron microscope Morgagni (at 80 kV; FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) equipped with MegaView III camera.

4.7.9.1. Spheroid culture and drug screening. Spheroids of colorectal HCT116 and cervical HeLa cancer cell lines were established as described previously [57]. Six-day-old spheroids were treated with compounds at 0.1–10 µM concentrations for 3 days and imaged using a fully automated CellVoyager High-Content Imaging System (Model CV7000; Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan) described before [57]. Acquired images were analyzed using an in-house algorithm developed in MatLab R2013b (MathWorks, Inc., Natick, MA) [57]. The effect of the compound on spheroid size was calculated as a percentage of untreated controls post 3-day treatment, and data were analyzed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism, San Diego, CA). Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$. All drug treatments were done in triplicates, and the experiments were repeated at 3 independent times [58].

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgment

Chemistry part was paid by the Czech Science Agency (grant number 21-00902S). The basic biological screening was financially supported by the European Regional Development Fund – Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868). Stipendium for LB, ZT, JH and RA were paid by the internal grants of Palacky University (IGA_PrF_2022_022). Analysis, purification and solubility studies of the new compounds were paid by the Ministry of Health of the Czech Republic (NV19-03-00107). The studies of the mechanism of action were paid from The project National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102) - Funded by the European Union - Next Generation EU. We would like to thank to RNDr. Roman Kouril, PhD. for using the Leica UltraCut microtome and electron microscope, and doc. RNDr. Dušan Cmarko, PhD. for using electron microscopes.

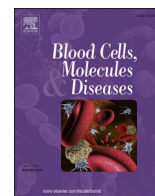
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114777>.

References

- [1] L.F. Rocha e Silva, C. Ramalheite, K.L. Nogueira, S. Mulhovo, M.-J.U. Ferreira, A. M. Pohlit, In vivo evaluation of isolated triterpenes and semi-synthetic derivatives as antimalarial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 102 (2015) 398–402, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.022>.
- [2] M.C. Sousa, R. Varandas, R.C. Santos, M. Santos-Rosa, V. Alves, J.A.R. Salvador, Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089939>.
- [3] C. Aiken, C.H. Chen, Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals, *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 31–36, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.11.001>.
- [4] B. Bednarczyk-Cwynar, N. Wachowiak, M. Szulc, E. Kamińska, A. Bogacz, J. Bartkowiak-Wieczorek, L. Zaprutko, P.L. Mikolajczak, Strong and long-lasting antinociceptive and anti-inflammatory conjugate of naturally occurring oleoanolic acid and aspirin, *Front. Pharmacol.* 7 (2016), <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00202>.
- [5] P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006) 394–411, <https://doi.org/10.1039/B515312N>.
- [6] L. Heller, A. Obernauer, R. Csuk, Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 3002–3012, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.015>.
- [7] M. Kvasnica, M. Urban, N.J. Dickinson, J. Sarek, Pentacyclic triterpenoids with nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: synthesis and medicinal significance, *Nat. Prod. Rep.* 32 (2015) 1303–1330, <https://doi.org/10.1039/C5NP00015G>.
- [8] M. Urban, J. Sarek, M. Kvasnica, I. Tislerova, M. Hajduch, Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 526–532, <https://doi.org/10.1021/np060436d>.
- [9] R. Haavikko, A. Nasereddin, N. Sacerdoti-Sierra, D. Kopolyanskiy, S. Alakurtti, M. Tikka, C.L. Jaffe, J. Yli-Kauhaluoma, Heterocycle-fused lupane triterpenoids inhibit *Leishmania donovani* amastigotes, *Med. Chem. Commun.* 5 (2014) 445–451, <https://doi.org/10.1039/C3MD00282A>.
- [10] J. Pokorny, L. Borkova, M. Urban, Click reactions in chemistry of triterpenes - advances towards development of potential therapeutics, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018) 636–658, <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009122612>.
- [11] M. Urban, M. Vlk, P. Dzubak, M. Hajduch, J. Sarek, Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 3666–3674, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.066>.
- [12] M. Soural, J. Hodon, N.J. Dickinson, V. Sidova, S. Gurska, P. Dzubak, M. Hajduch, J. Sarek, M. Urban, Preparation of conjugates of cytotoxic lupane triterpenes with biotin, *Bioconjugate Chem.* 26 (2015) 2563–2570, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00567>.
- [13] M. Laavola, R. Haavikko, M. Hämäläinen, T. Leppänen, R. Nieminen, S. Alakurtti, V.M. Moreira, J. Yli-Kauhaluoma, E. Moilanen, Betulin derivatives effectively suppress inflammation in vitro and in vivo, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 274–280, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00709>.
- [14] R. Haavikko, Synthesis of Betulin Derivatives with New Bioactivities, 2015. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157276/synthesi.pdf?sequence=1>.
- [15] I.C. Sun, H.K. Wang, Y. Kashiwada, J.K. Shen, L.M. Cosentino, C.H. Chen, L. M. Yang, K.H. Lee, Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4648–4657, <https://doi.org/10.1021/jm980391g>.
- [16] L. Borkova, L. Jasikova, J. Rehulka, K. Frisonsova, M. Urban, I. Frydrych, I. Popa, M. Hajduch, N.J. Dickinson, M. Vlk, P. Dzubak, J. Sarek, Synthesis of cytotoxic 2,2-difluoro derivatives of dihydrobetulinic acid and allobetulin and study of their impact on cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 96 (2015) 482–490, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.068>.
- [17] M. Urban, J. Sarek, I. Tislerova, P. Dzubak, M. Hajduch, Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 5527–5535, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.011>.
- [18] M. Urban, M. Kvasnica, N.J. Dickinson, J. Sarek, Biologically active triterpenoids useable as prodrugs, in: A.R. Bates (Ed.), *Terpenoids and Squalene: Biosynthesis, Functions and Health Implications*, Nova Science Publishers, New York, 2015. https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=52916&osCsid=bcdf867f385e9f4704bf0d72cae76d60. accessed September 13, 2016.
- [19] M. Vlk, P. Micolova, M. Urban, M. Kvasnica, D. Saman, J. Sarek, 15N-labelled pyrazines of triterpenic acids, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 308 (2015) 733–739, <https://doi.org/10.1007/s10967-015-4479-5>.
- [20] J. Pokorny, D. Olejníková, I. Frydrych, B. Lišková, S. Gurska, S. Benická, J. Šarek, J. Kotulová, M. Hajdúch, P. Džubák, M. Urban, Substituted dienes prepared from betulinic acid – synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, and pharmacological parameters, *Eur. J. Med. Chem.* (2021), 113706, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113706>.
- [21] P. Perlikova, M. Kvasnica, M. Urban, M. Hajduch, J. Sarek, 2-Deoxyglycoside conjugates of lupane triterpenoids with high cytotoxic activity—synthesis, activity, and pharmacokinetic profile, *Bioconjugate Chem.* 30 (2019) 2844–2858, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00565>.
- [22] Y. Yoon, J.W. Lim, J. Kim, Y. Kim, K.H. Chun, Discovery of ursolic acid prodrug (NX-201): pharmacokinetics and in vivo antitumor effects in PANC-1 pancreatic cancer, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 26 (2016) 5524–5527, <https://doi.org/10.1016/j.bml.2016.10.008>.

- [23] A.P. Esteves, L.M. Rodrigues, M.E. Silva, S. Gupta, A.M.F. Oliveira-Campos, O. Machalicky, A.J. Mendonça, Synthesis and characterization of novel fluorescent N-glycoconjugates, *Tetrahedron* 61 (2005) 8625–8632, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.07.006>.
- [24] D. Bhunia, P.M.C. Pallavi, S.R. Bonam, S.A. Reddy, Y. Verma, M.S.K. Halmuthur, Design, synthesis, and evaluation of novel 1,2,3-triazole-tethered glycolipids as vaccine adjuvants, *Arch. Pharmazie* 348 (2015) 689–703, <https://doi.org/10.1002/ardp.201500143>.
- [25] V. Sidova, P. Zoufaly, J. Pokorný, P. Dzubak, M. Hajdúch, I. Popa, M. Urban, Cytotoxic conjugates of betulinic acid and substituted triazoles prepared by Huisgen Cycloaddition from 30-azidoderivatives, *PLoS One* 12 (2017), e0171621, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171621>.
- [26] M. Urban, J. Klinot, I. Tislerova, D. Biedermann, M. Hajdúch, I. Cisarova, J. Sarek, Reactions of activated lupane oxo-compounds with diazomethane: an approach to new derivatives of cytotoxic triterpenes, *Synthesis* 2006 (2006) 3979–3986, <https://doi.org/10.1055/s-2006-950327>.
- [27] J.D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J.W. Tolan, H.E. Selick, J. R. Grove, MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening, *J. Pharmaceut. Sci.* 88 (1999) 28–33, <https://doi.org/10.1021/js9803205>.
- [28] A.F. Nassar, Structural modifications of drug candidates: how useful are they in improving metabolic stability of new drugs? Part I: enhancing metabolic stability, in: *Drug Metabolism Handbook*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, pp. 253–268, <https://doi.org/10.1002/9780470439265.ch10>.
- [29] F. Wohnsland, B. Faller, High-Throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log *P* with artificial membranes, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 923–930, <https://doi.org/10.1021/jm001020e>.
- [30] M.C. Wei, W.-X. Zong, E.H.-Y. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, S.J. Korsmeyer, B.A.X. Proapoptotic, BAK, A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science* 292 (2001) 727–730, <https://doi.org/10.1126/science.1059108>.
- [31] H. Zou, Y. Li, X. Liu, X. Wang, An APAF-1-Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11549–11556, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>.
- [32] X. Cao, X. Deng, W.S. May, Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax, *Blood* 102 (2003) 2605–2614, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0211>.
- [33] S.J. Korsmeyer, M.C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K.J. Oh, P.H. Schlesinger, Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell Death Differ.* 7 (2000) 1166–1173, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400783>.
- [34] M.S. Satoh, T. Lindahl, Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair, *Nature* 356 (1992) 356–358, <https://doi.org/10.1038/356356a0>.
- [35] Y.A. Lazebnik, S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, G.G. Poirier, W.C. Earnshaw, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371 (1994) 346–347, <https://doi.org/10.1038/371346a0>.
- [36] M. Tewari, L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G. Poirier, G.S. Salvesen, V.M. Dixit, Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase, *Cell* 81 (1995) 801–809, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90541-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90541-3).
- [37] P. Bouillet, A. Strasser, BH3-only proteins — evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 1567–1574, <https://doi.org/10.1242/jcs.115.8.1567>.
- [38] C. Ploner, R. Kofler, A. Villunger, Noxa: at the tip of the balance between life and death, *Oncogene* 27 (2008), <https://doi.org/10.1038/onc.2009.46>, S84–S92.
- [39] E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, † Nobuyuki Tanaka, Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* 288 (2000) 1053–1058, <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>.
- [40] Liam O'Connor, Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis, *EMBO J.* 17 (1998) 384–395, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.384>.
- [41] M. Henriksson, B. Lüscher, Proteins of the myc network: essential regulators of cell growth and differentiation, in: G.F. Vande Woude, G. Klein (Eds.), *Advances in Cancer Research*, Academic Press, 1996, pp. 109–182, [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60353-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60353-X).
- [42] A. Ligasová, M. Vyržalová, R. Buriánová, L. Brůčková, R. Vecerová, A. Janošťáková, K. Koberna, A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy, *Cells* 8 (2019) 1510, <https://doi.org/10.3390/cells8121510>.
- [43] G. Monteuiis, A. Mišćicka, M. Świrski, L. Zenad, O. Niemitalo, L. Wrobel, J. Alam, A. Chacinska, A.J. Kastaniotis, J. Kufel, Non-canonical translation initiation in yeast generates a cryptic pool of mitochondrial proteins, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) 5777–5791, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz301>.
- [44] V. Das, F. Bruzzese, P. Konečný, F. Iannelli, A. Budillon, M. Hajdúch, Pathophysiologically relevant in vitro tumor models for drug screening, *Drug Discov. Today* 20 (2015) 848–855, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.004>.
- [45] W. Jiang, X. Li, S. Dong, W. Zhou, Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress, *Biomed. Pharmacother.* 142 (2021), 111990, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111990>.
- [46] H.I. Ciftci, M.O. Radwan, B. Sever, A.K. Hamdy, S. Emirdağ, N.G. Ulusoy, E. Sozer, M. Can, N. Yayli, N. Araki, H. Tateishi, M. Otsuka, M. Fujita, M.D. Altintop, EGFR-targeted pentacyclic triterpene analogues for glioma therapy, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), 10945, <https://doi.org/10.3390/ijms222010945>.
- [47] O. Troitskaya, D. Novak, A. Nushtaeva, M. Savinkova, M. Varlamov, M. Ermakov, V. Richter, O. Koval, EGFR transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), 12937, <https://doi.org/10.3390/ijms222312937>.
- [48] L. Borkova, R. Adamek, P. Kalina, P. Drašar, P. Dzubak, S. Gurska, J. Rehulka, M. Hajdúch, M. Urban, J. Sarek, Synthesis and cytotoxic activity of triterpenoid thiazoles derived from allobetulin, methyl betulonate, methyl oleanonate, and oleanonic acid, *ChemMedChem* 12 (2017) 390–398, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600626>.
- [49] L. Borkova, S. Gurska, P. Dzubak, R. Burianova, M. Hajdúch, J. Sarek, I. Popa, M. Urban, Lupane and 18 α -oleanane derivatives substituted in the position 2, their cytotoxicity and influence on cancer cells, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 120–131, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.029>.
- [50] V. Noskova, P. Dzubak, G. Kuzmina, A. Ludkova, D. Stehlik, R. Trojanec, A. Janostakova, G. Korinkova, V. Mihal, M. Hajdúch, In vitro chemoresistance profile and expression/function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA MB 231 parental cells, *Neoplasma* 49 (2002) 418–425.
- [51] A. Bourderieux, P. Naus, P. Perlíková, R. Pohl, I. Pichová, I. Votruba, P. Dzubák, P. Konečný, M. Hajdúch, K.M. Stray, T. Wang, A.S. Ray, J.Y. Feng, G. Birkus, T. Cihlar, M. Hocek, Synthesis and significant cytostatic activity of 7-Hetaryl-7-deazaadenosines, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 5498–5507, <https://doi.org/10.1021/jm2005173>.
- [52] B. Eignerova, M. Tichy, J. Krasulova, M. Kvasnica, L. Rarova, R. Christova, M. Urban, B. Bednarczyk-Cwynar, M. Hajdúch, J. Sarek, Synthesis and antiproliferative properties of new hydrophilic esters of triterpenic acids, *Eur. J. Med. Chem.* 140 (2017) 403–420, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.041>.
- [53] L. Borková, I. Frydrych, N. Jakubcová, R. Adámek, B. Lišková, S. Gurská, M. Medvedíková, M. Hajdúch, M. Urban, Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulinic acid, dihydrobetulinic acid, and ursonic acid, *Eur. J. Med. Chem.* 185 (2020), 111806, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111806>.
- [54] X. Wu, J. Wang, L. Tan, J. Bui, E. Gjerstad, K. McMillan, W. Zhang, In vitro ADME profiling using high-throughput rapidfire mass spectrometry: cytochrome p450 inhibition and metabolic stability assays, *J. Biomol. Screen* 17 (2012) 761–772, <https://doi.org/10.1177/1087057112441013>.
- [55] J.K. Singh, A. Solanki, R.C. Maniyar, D. Banerjee, V.S. Shirsath, Rapid equilibrium dialysis (RED): an in-vitro high-throughput screening technique for plasma protein binding using human and rat plasma, *J. Bioequivalence Bioavail.* (2012), <https://doi.org/10.4172/jbb.S14-005>.
- [56] A. Ligasová, K. Koberna, New concept and apparatus for cyto centrifugation and cell processing for microscopy analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 7098, <https://doi.org/10.3390/ijms22137098>.
- [57] A. Ligasová, K. Koberna, DNA replication: from radioisotopes to click chemistry, *Molecules* 23 (2018) 3007, <https://doi.org/10.3390/molecules23113007>.
- [58] V. Das, T. Fürst, S. Gurská, P. Dzubák, M. Hajdúch, Reproducibility of uniform spheroid formation in 384-well plates: the effect of medium evaporation, *J. Biomol. Screen* 21 (2016) 923–930, <https://doi.org/10.1177/1087057116651867>.



Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress

Agata Kubickova^{a,8,1}, Zuzana Maceckova^{a,1}, Petr Vojta^a, Martin Ondra^{a,8}, Jana Volejnikova^{a,b}, Pavla Koralkova^c, Alexandra Jungova^d, Ondřej Jahoda^c, Renata Mojzíkova^c, Ivana Hadacova^e, Jaroslav Cermak^f, Monika Horvathova^c, Dagmar Pospisilova^{b,*}, Marian Hajduch^{a,**}

^a Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 77900 Olomouc, Czech Republic

^b Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 77900 Olomouc, Czech Republic

^c Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 3, 77515 Olomouc, Czech Republic

^d Department of Haematology, Charles University and University Hospital Pilsen, Alej Svobody 80, 30460 Pilsen-Lochotin, Czech Republic

^e Department of Haematology, Charles University and University Hospital Motol Prague, V Uvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

^f Institute of Haematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 2094/1, 12820 Prague, Czech Republic

⁸ Czech Advanced Technology and Research Institute, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 77900 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Editor: Lionel Blanc

Keywords:

Diamond-Blackfan anemia (DBA)

Ribosomal stress

Wnt pathway

BCCIP

RPS7

c-Myc

CRISPR/Cas9

ABSTRACT

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is predominantly underlined by mutations in genes encoding ribosomal proteins (RP); however, its etiology remains unexplained in approximately 25 % of patients.

We previously reported a novel heterozygous RPS7 mutation hg38 chr2:g.3,580,153G > T p.V134F in one female patient and two asymptomatic family members, in whom mild anemia and increased erythrocyte adenosine deaminase (eADA) activity were detected. We observed that altered erythrocyte metabolism and oxidative stress which may negatively affect the lifespan of erythrocytes distinguishes the patient from her asymptomatic family members. Pathogenicity of the RPS7 p.V134F mutation was extensively validated including molecular defects in protein translational activity and ribosomal stress activation in the cellular model of this variant.

1. Introduction

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital red cell aplasia with causative mutations in genes encoding ribosomal proteins (RPs), which involve small ribosomal subunit genes (*RPS19*, *RPS26*, *RPS7*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *RPS15A*) or large ribosomal subunit genes (*RPL5*, *RPL11* and *RPL35A*) [1–3]. These mutations affect translational efficiency [4], ribosome biogenesis [5] and oncogene signaling [6]. It was also shown that ribosomal insufficiency increases oxidative stress in erythrocytes of DBA patients [7]. Despite intensive research, the

etiology of DBA remains unexplained in approximately 25 % of patients.

DBA mostly manifests during the first year after birth, but its phenotype is highly variable from silent carriers over mild (typically macrocytic) anemia to severe transfusion dependency accompanied by short stature with skeletal abnormalities [8], mental retardation [9,10] and increased risk of tumor development [11]. DBA phenotype is mainly attributed to RP haploinsufficiency, but several dominant-negative phenotypes when mutated mRNA is stable were described as well [4,12]. Another rather interesting feature of DBA is incomplete penetrance and variable expressivity. It is common that family members

* Correspondence to: D. Pospisilova, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 77900 Olomouc, Czech Republic.

** Correspondence to: M. Hajduch, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 1333/5, 77900 Olomouc, Czech Republic.

E-mail addresses: dagmar.pospisilova@fnol.cz (D. Pospisilova), marian.hajduch@upol.cz (M. Hajduch).

¹ both authors contributed equally

sharing the same mutation manifest variable severity of phenotype [13]. These observations point towards disease-modifying genes at play. However, up today no such gene has been described.

Using a massive parallel sequencing (MPS) of RP gene panel by selective capture hybridization we found a novel RPS7 p.V134F mutation in three female members of one family showing increased erythrocyte adenosine deaminase (eADA) activity [14]. To assess the causality of RPS7 p.V134F mutation, we developed and extensively analyzed a cellular model of this variant.

2. Patients and methods

2.1. Clinical report

The patient was an 18-year-old female born in term from second uncomplicated pregnancy with a birth weight of 2600 g. She had no congenital malformations and presented with severe anemia during the first month of life. Bone marrow aspirate showed a severe isolated erythroid aplasia and the diagnosis of DBA was established. The patient was transfusion dependent during the first year of life and required irregular red blood cell transfusions until 3 years of age. She was treated with a small dose of prednisolone on alternate days since 3 years of age, responded well to steroid therapy and is currently in remission with hemoglobin (Hb) 101 g/l and mean corpuscular volume (MCV) 112 fl. Her body height is normal.

The patient's mother and older sister are both asymptomatic and their past medical history is insignificant. They harbor no somatic malformations. Normal Hb levels (120 g/l and 127 g/l, respectively) and mild macrocytosis (MCV of 97 fl and 96 fl, respectively) were detected on laboratory examination. Other family members are healthy. Clinical case was partially reported in our previous publications [14,15].

2.2. DNA extraction, RNA extraction and cDNA preparation from patient blood samples

DNA was extracted from peripheral blood by Genomic DNA Whole Blood Kit (Qiagen, Germany) using MagCore HF116 robotic station (RBC Bioscience Corp., Taiwan) according to manufacturer's protocol. RNA isolation was performed from blood samples stored in Tempus Blood RNA Tubes using Tempus Spin RNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). RNA integrity and concentration were checked by Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) and Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA).

For reverse transcription, we pre-incubated 3 µg of total RNA with 0.3 µg of Random Primers (Promega, USA) at 70 °C for 5 min, and immediately placed the mixture on ice. Then 6 µl of RevertAid 5× RT buffer (Fermentas, Lithuania), 3 µl of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), 0.75 µl of 40 U/µl RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA), and DEPC treated water (Ambion, USA) up to a final volume of 30 µl were added, and the mixture was incubated for 5 min at room temperature. During the final step, 150 U of RevertAid Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas, Lithuania) were added to each tube and the samples were incubated at room temperature for 10 min. Finally, samples were incubated at 42 °C for 60 min and then 70 °C for 10 min.

RPS7 wild-type (RPS7-WT) vs. RPS7 p.V134F (RPS7-mut) allele ratio was estimated using RPS7 cDNA sequencing. Amplicon for target cDNA RPS7 was obtained by PCR using primers specifically designed to 5' and 3'UTR regions of the gene (tctcgcgatttgggtctct, ttcaattgaaactctggaattcaaaat).

2.3. Library preparation and sequencing

2.3.1. RP panel

RP gene panel sequencing was performed as described previously and it revealed RPS7 hg38 chr2:g.3,580,153G > T mutation, which was

subsequently confirmed by Sanger sequencing [14]. DNA was amplified by PCR with the following primers targeting exon 6 of RPS7 (catttgacttaaagaggtgc; cactaaatccactctcactg). Results from Sanger sequencing were edited and visualized in Unipro UGENE [16].

2.4. Enzyme assays

The activity of enzymes involved in anaerobic glycolysis, oxidative defense and nucleotide metabolism, particularly pyruvate kinase (PK), hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and eADA, was determined according to the methods recommended by the International Committee for Standardization in Haematology [17], with the use of leukocyte- and platelet-free erythrocyte lysates as previously described [18,19]. Briefly, the enzyme reaction was pre-incubated for 10 min at 37 °C, thereafter the substrate was added. Absorbance was measured at 340 nm (for eADA at 265 nm) in 1 min intervals for 20 min at 37 °C (Spectrophotometer Infinite 200 Nanoquant; Tecan, Switzerland) and specific enzyme activity was calculated using the Lambert-Beer law. All chemicals and purified enzymes were purchased from Sigma Aldrich (Germany).

2.5. Measurement of glutathione and ATP

Freshly prepared erythrocyte lysates, extracted with 5 % trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, Germany), were used for the measurements of reduced glutathione (GSH) and ATP levels by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) (HPLC Dionex Ultimate 3000 MS, Thermo Scientific, USA; LC/MS/MS System MDS API 3200, Applied Biosystems, USA) as previously published [18,20].

2.6. Oxidative stress and Annexin V binding

Peripheral blood erythrocytes (2×10^7 /ml) were incubated with 0.4 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF; Sigma-Aldrich, Germany) for 15 min at 37 °C as previously described [20,21]. For positive control, erythrocytes were exposed to 2 mM H₂O₂ for 10 min before DCF labeling. The levels of reactive oxygen species (ROS) were determined based on the DCF-dependent intensity of fluorescence measured by FACS Calibur (FACS Calibur, BD Biosciences, New Jersey, USA).

Annexin V binding to erythrocyte membrane was analyzed using Annexin V/FITC kit (BD Biosciences, New Jersey, USA) following manufacturer's instructions. Fluorescence intensity was also measured by FACS Calibur [21].

2.7. Cell culture and MTS viability assay

U2OS cell line (HTB-96, ATCC, USA) is derived from osteosarcoma, which is one of the most common cancer types of DBA patients, therefore it was chosen for the development of the cellular model for this disease. Cells were maintained in 75 cm² plastic tissue culture flasks and cultured in McCoy's 5A Medium w/ L-Glutamine (BE12-688F, Lonza, UK) supplemented by 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (D910, Diagnostovum, Netherlands) and 10 % fetal calf serum (10270, Gibco, Australia).

Proliferation activity was measured by MTS assay. Cells were seeded by automatic pipettor Multidrop Combi (ThermoFisher Scientific, USA) into 384 well microtiter plates (PerkinElmer, USA) at a density of 800 cells per well. They were incubated for 72 h at 37 °C, in a 5 % CO₂ atmosphere at 100 % humidity. At the end of the incubation period, 5 µl of the MTS solution (G1111, Promega, USA) was added and measurement of the optical density (OD) at 490 nm with an Envision reader (Perkin Elmer, USA) followed after incubation for 1.5 h. Cell survival (CS) was calculated by using the following equation: CS = (mean OD RPS7-mut cell line/mean OD RPS7-WT cell line) × 100 %.

2.8. CRISPR/Cas9 cell line model preparation

CRISPR/Cas9 system was used for genome editing and introduction of mutation in the *RPS7* gene into U2OS cell line. Cas9 endonuclease was directed to create a cut between bases hg38 chr2:g.3,580,178-3,580,179 by synthetic gRNA consisting of specifically designed crRNA and universal tracrRNA. The mutation was then inserted by homology directed repair according to the ssODN donor template. The donor template was designed to prevent the recutting of the edited gene by disrupting the gRNA PAM sequence. Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNAs, Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA ATTO™ (#1075928), Ultramer DNA Oligo (ssODN template) and Alt-R® S.p. HiFi Cas9 nuclease V3 (#1081061) were purchased from Integrated DNA Technologies, USA. crRNA/tracrRNA hybridization and ribonucleoprotein (RNP) complex formation was done according to the manufacturer's instructions. Electroporation of RNP complexes into cells was done by Neon™ Transfection System (1230 V, 10 ms, 4 pulses; Invitrogen™, MPK5000, USA). Monoclonal cell lines were isolated by limiting dilution. The primary screen of monoclonal cell lines, for the desired mutation, was done by comparison of RPS7-WT and RPS7-mut amplicons restriction spectra. Specific restriction site of endonuclease *Pf*FI (R0595S, New England Biolabs, UK) is invalidated in clonal cell lines carrying RPS7 p.V134F SNV. The candidate cell lines were sequenced by Sanger sequencing of PCR amplicons. This was performed to validate the accuracy of CRISPR/Cas9 insertion of SNV into the genomic locus of the *RPS7* gene. PCR amplification for restriction spectra analysis and Sanger sequencing was carried out by Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England Biolabs, UK) and specific primers: RPS7_F 5'-ACTGG-CAGTTCGTGATGCTAA-3' RPS7_R 5'-CAGTCAACCACATGGTTATGTC-3' (Generi Biotech, Czech Republic).

2.9. RNA isolation from cell lines, mRNA quantification and Sanger sequencing

Total RNA was isolated using a commercially available TRIzol reagent (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. Three micrograms of total RNA were reverse transcribed using random primers (C1181, Promega, USA) and RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (EP0451, Thermo Scientific™, USA). Two microliters of cDNA reaction were PCR-amplified on a LightCycler® Instrument 480 II/96 (05015278001, Roche, Switzerland) using the Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530L, New England Biolabs, UK) with EvaGreen® dye (#31000-T, Biotium, USA). Sequences of primers used for the evaluation of mRNA levels of RPS7 are: RPS7_F 5'-GTGGGAAG-CATGTCGTCTTT-3', RPS7_R 5'-ATTAACATCCTTGCCCGTGA-3', GAPDH_F 5'-GAAGATGGTGTGATGGGATTTC-3', GAPDH_R 5'-GAAGGT-GAAGTCCGAGT-3' (Generi Biotech, Czech Republic). GAPDH was used as an internal control. Delta-delta Ct values were used to determine relative expression as a fold change. PCR amplification for Sanger sequencing of cDNA was carried out by the same primers but without EvaGreen® dye.

2.10. Cell cycle analysis

RPS7-WT and RPS7-mut cell lines were seeded at a density of 0.5×10^6 cells per 22.1 cm² tissue culture dish and after 48 h harvested and collected together with the floating cells. Cell pellets were washed with cold 1 x PBS and fixed in cold 70 % ethanol added dropwise and stored overnight at -20 °C. Afterward, pellets were washed in 1 x citrate buffer, then stained for 15 min in 50 µg/ml propidium iodide (SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA) at 37 °C and treated for another 15 min by 0.5 mg/ml RNase A (060M7000V, Sigma-Aldrich, USA). In order to stabilize, samples were kept at 4 °C for 1 h prior to measurement by 488 argon laser-equipped flow cytometer (FACSCalibur) and data were analyzed using CellQuest software version 3.3 (both Becton Dickinson, USA).

2.11. BrdU incorporation analysis

Cells were cultivated as previously described and 30 min before harvesting 10 µM 5-bromo-2'-deoxyuridine (125H0932, Sigma-Aldrich, USA) was added for pulse-labeling of newly synthesized DNA. The attached cells were collected together with the floating cells. Cell pellets were washed with cold 1 x PBS and fixed in cold 70 % ethanol added dropwise and stored overnight at -20 °C. Samples were then incubated at room temperature for 30 min in 2 M HCl containing 0.5 % Triton X-100 to denature the DNA. Following neutralization with 0.1 M Na₂B₄O₇ (pH = 8.5), the cells were washed with 1 x PBS containing 0.5 % Tween-20 and 0.1 % BSA. Staining with primary anti-BrdU antibody (clone MoBu-1, 11-286-C100, Exbio, Czech Republic) for 30 min at room temperature in the dark followed. Cells were then washed with 1 x PBS containing 0.5 % Tween-20 and 0.1 % BSA and stained with secondary anti-mouse IgG-FITC antibody (F2883, Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at room temperature. After another wash with 1 x PBS containing 0.5 % Tween-20 and 0.1 % BSA and incubation with propidium iodide (50 µg/ml, SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA) and RNase A (10 mg/ml, 060M7000V, Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at room temperature in the dark, samples were stabilized in 4 °C for 30 min prior measurement by 488 argon laser-equipped flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, USA). Data were analyzed using CellQuest software version 3.3 (Becton Dickinson, USA).

2.12. BrU incorporation analysis

Cells were cultivated as previously described and 30 min before harvesting 1 mM 5-bromouridine (850187, Sigma-Aldrich, USA) was added for pulse-labeling of newly synthesized RNA. The attached cells were collected together with the floating cells. Cell pellets were washed with cold 1 x PBS and fixed in cold 1 x PBS containing 1 % formaldehyde and 0.05 % NP-40 added dropwise at room temperature for 15 min and then stored overnight at 4 °C. Before measurement, cells were firstly washed with 1 % glycine in 1 x PBS, then with 1 x PBS and stained with primary anti-BrdU antibody cross-reacting to BrU (clone MoBu-1, 11-286-C100, Exbio, Czech Republic) for 45 min at room temperature in the dark. Afterward, samples were washed with 1 x PBS containing 0.1 % NP-40 and 0.1 % BSA and stained with secondary anti-mouse IgG-FITC antibody (F2883, Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at room temperature. Then another washing step followed with 1 x PBS containing 0.1 % NP-40 and 0.1 % BSA, fixation in 1 x PBS containing 1 % formaldehyde and 0.05 % NP-40 at room temperature for 15 min with another incubation for 1 h at 4 °C and washing in 1 % glycine in 1 x PBS. Before analysis, samples were incubated with propidium iodide (50 µg/ml, SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA) and RNase A (10 mg/ml, 060M7000V, Sigma-Aldrich, USA) for 30 min at room temperature in the dark and measured by 488 argon laser-equipped flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, USA). Data were analyzed using CellQuest software version 3.3 (Becton Dickinson, USA).

2.13. Protein synthesis analysis

To investigate the inhibition of global protein biosynthesis in RPS7-WT versus RPS7-mut cell lines Click-iT™ AHA Alexa Fluor™ 488 Protein Synthesis HCS Assay kit (C10289, Invitrogen, USA) was used. Cells were seeded at a density of 1.5×10^6 cells per 60 cm² tissue culture dish and after 48 h harvested and collected together with the floating cells. After washing with 1 x PBS, the cells were incubated for 1 h in a methionine-free medium to deplete methionine reserves. Then L-azidohomoalanine was added to the methionine-free media in a final concentration 142.9 µM for 1 h. L-azidohomoalanine, an amino acid analog of L-methionine containing an azido moiety, was incorporated into newly synthesized proteins. Afterward, the cells were washed with 1 x PBS, fixed in 1 x PBS containing 4 % formaldehyde for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.25 % Triton X-100 in PBS for

15 min and washed in 3 % BSA in 1 x PBS. The cells were then incubated with Click-iT® reaction cocktail for 30 min, at room temperature and protected from light. The cocktail contained AlexaFluor 488 conjugated alkyne in final concentration 19.4 nM which is reactive with azides via a copper-catalyzed click reaction. The resulting fluorescence signal of newly synthesized proteins was measured by 488 argon laser-equipped flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) and data were analyzed using CellQuest software version 3.3 (Becton Dickinson, USA). The antibiotic cycloheximide (01810, Sigma-Aldrich, USA), a known potent inhibitor of protein synthesis, was used as a positive control and added to cells in a methionine-free medium at a final concentration 80 µg/ml for 2 h [22].

2.14. Western blotting

RPS7-WT and RPS7-mut cell lines were seeded and collected under the same conditions as for flow cytometry analysis. Cell pellets were washed with cold 1 x PBS, and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA and cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (04693116001, Roche, Switzerland)). Protein concentration was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Scientific, USA). In total, 30 µg of cellular proteins were denatured in Laemmli buffer (10 % β-mercaptoethanol, 0.06 % bromophenol blue, 47 % glycerol, 12 % SDS, 0.5 M Tris pH 6.8), separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membrane by Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (1704150, Bio-Rad, USA). Membranes were incubated with primary antibodies against c-Myc (ab32072, Abcam, UK), cyclin D1 (2978, Cell Signaling Technology, USA), E2F1 (ab179445, Abcam, UK), BCCIP (ab97577, Abcam, UK), MDM2 (ab16895, Abcam, UK), β-catenin (ab32572, Abcam, UK), nucleolin (ab22758, Abcam, UK), p21 (2947, Cell Signaling Technology, USA), p53 (ab1101, Abcam, UK), ubiquitin (3933, Cell Signaling Technology, USA), RPS7 (ab57637, Abcam, UK), β-actin (A2228, Sigma Aldrich, USA) overnight at 4 °C followed by incubation with appropriate peroxidase-linked secondary antibody (A-2304 or A-0545, Sigma Aldrich, USA). Chemiluminescence signals were visualized by the ChemiDoc MP Documentation system (Bio-Rad, USA).

2.15. Immunofluorescence analysis

RPS7-WT and RPS7-mut cell lines were seeded 24 h before the experiment to 96-well plate (CellCarrier-96 Black, Perkin-Elmer, USA) at a density of 1×10^4 cells per well. Grown cells were washed twice with 1 x PBS, fixed by 4 % paraformaldehyde/1 x PBS for 15 min at room temperature and permeabilized by 0.3 % Triton X-100/1 x PBS for 15 min. Afterward, cells were incubated in blocking buffer for 1 h (5 % FCSi, 0.1 % Tween 20, 1 x PBS) and stained with nucleolin antibody (ab22758, Abcam, UK) overnight at 4 °C. Primary antibody was detected with species-specific secondary antibody labeled by Alexa Fluor 488 (Life Technologies, USA) in 5 % FCSi/1 x PBS for 1 h at room temperature. Thereafter cells were washed in 1 x PBS three times and stained with Hoechst 33342 (62249, Thermo Scientific™, USA). Localization and level of nucleolin expression were examined using CV7000 Voyager Cell High throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa, USA) with water objective in 60× magnification. Image quantification was calculated as a corrected spot intensity in the nucleolus using Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer, USA).

2.16. rRNA fluorescence in situ hybridization

Cells were seeded and fixed as described above and permeabilized by 70 % ethanol at –20 °C overnight. Cells were washed twice in wash buffer (2 xSSC, 10 % formamide), followed by hybridization at 37 °C for 4 h in hybridization buffer (10 % formamide, 2 xSSC, 0.5 mg/ml tRNA, 10 % dextran sulphate, 250 µg/ml BSA, 10 mM ribonucleoside vanadyl complexes and 0.5 ng/µl 5' ITS1 probe: CCTCGCCTCCG

GGCTCCGTTAATGATC conjugated with cy5). Afterward, samples were washed twice in preheated wash buffer at 37 °C and stained with Hoechst 33342 (62249, Thermo Scientific™, USA). The cells were examined using CV7000 Voyager Cell High throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa, USA). Image quantification was calculated as a corrected spot intensity in the nucleolus by Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer, USA).

2.17. Northern blotting

Pre-rRNA species were analyzed by northern blotting. 10 µg of total RNA were mixed with 1 volume of loading buffer (50 % formamide, 0.06 % formaldehyde, 10 % glycerol, 0.05 % bromophenol blue in 1× MOPS buffer) and separated on a 2 % agarose gel in the presence of MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, pH 7.0) containing 2 % formaldehyde, and run in 1 x MOPS buffer at 23 V overnight at 4 °C. RNAs were then transferred to a nylon membrane (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare, USA). After fixation by UV-crosslinking, the membranes were pre-hybridized for 1 h at 45 °C in DIG Easy Hyb (DIG Northern Starter Kit, Roche, Switzerland). The digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotide probe was then added and incubated overnight at 45 °C. The probes used in this study were: 5ITS1 (5'-CCTCGCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'), ITS2b (5'-CTGCGAGG-GAACCCCGAGCCGCA-3'), ITS2d/e (5'-GCGCGACGGCGGACGA-CACCGCGGTC-3') (Generi Biotech, Czech Republic) [23]. For detection of ITS2, probes ITS2b and ITS2d/e were mixed in equal amounts. After probes hybridization took place, the stringency washes followed. Firstly, two times for 5 min at room temperature in 2 x SSC (0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) containing 0.1 % SDS and twice for 15 min in 0.25 x SSC with SDS 0.1 %. Before the blocking step, the membranes were briefly washed in washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20, pH 7.5), then blocked in blocking solution for 30 min and incubated with the anti-digoxigenin-AP antibody (both DIG Northern Starter Kit, Roche, Switzerland) for 1 h at room temperature. Unbound antibodies were removed by two washing steps for 15 min in a washing buffer. Before measurement of the chemiluminescence signal, membranes were equilibrated for 5 min at detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5), then the CDP-Star substrate was added and the signals were acquired by the ChemiDoc MP Documentation system (Bio-Rad, USA).

2.18. Statistical analysis

All data are presented as mean ± SEM from at least three biological replicates. The statistical significance of differences was examined using one-sample *t*-test, $p < 0.05$ was considered statistically significant (GraphPad Prism version 8.0).

3. Results

The Czech and Slovak DBA registry currently includes 62 patients. Previously, causative mutations were identified in 50 out of 62 patients (81 %) in genes encoding for *RPS19*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11* and *RPS17* using massive parallel sequencing [14,15].

A novel nonsynonymous germline heterozygous transversion hg38 chr2:g.3,580,153G > T resulting in amino acid substitution p.V134F was identified by MPS in exon 6 of the *RPS7* gene in one female patient with DBA and in two of her asymptomatic relatives [14]. The mutation was subsequently confirmed by cDNA sequencing (Fig. 1). Ultra-deep cDNA sequencing (average coverage 78,285×) revealed that expression of the mutated allele is in concordance with genotype (proband: 55 % *RPS7-WT* / 45 % *RPS7-mut*, mother: 58 % *RPS7-WT* / 42 % *RPS7-mut*, sister: 63 % *RPS7-WT* / 37 % *RPS7-mut*).

Valine 134 is highly conserved in *RPS7* and substitution by phenylalanine in this position is considered possibly damaging by Polyphen2 (score 0.965). In silico protein stability predictors I-Mutant and MUpro

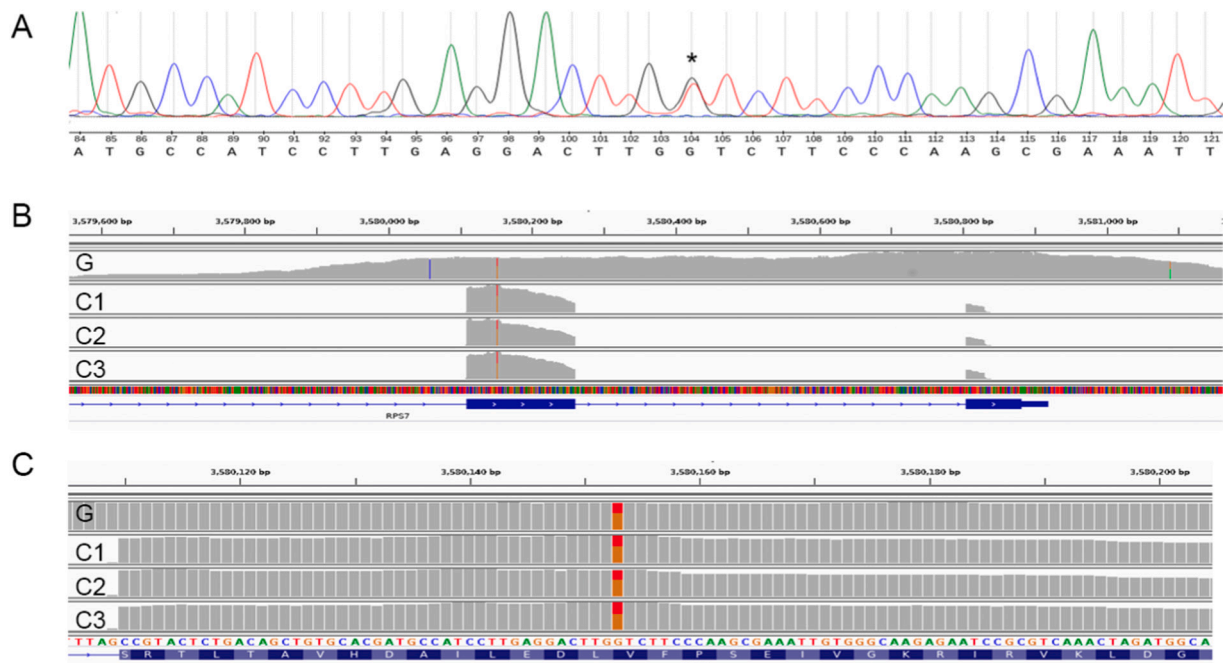


Fig. 1. *RPS7* mutation in the patient with DBA and two of her family members. The confirmation of hg38 chr2:g.3,580,153G > T heterozygous mutation in *RPS7* by Sanger sequencing technique in the patient panel (A). The mutation has been previously identified by MPS sequencing of genomic DNA (G). The mutation was later detected in patient's cDNA C1 as well as in her mother (C2) and sister (C3). Panel (B) visualizes alignments in the last two *RPS7* exons by IGV in comparison of RP gene sequencing and cDNA sequencing. Panel (C) shows the position of the mutation in exon 6 of *RPS7* in detail.

evaluated the substitution as decreasing *RPS7* protein stability (I-Mutant reliability index 9, MUpro scores were -0.97 by Neural Network method and -1 by Support Vector Machine method). Although this variant was reported in a recent update of the Czech and Slovak DBA registry [14], there was no other *RPS7* SNV described before and thus we decided to proceed with an extended evaluation of its pathogenicity and underlying disease mechanisms using a genetically modified cellular model.

3.1. Validation of CRISPR/Cas9 cellular model, translational activity, nucleolar morphology, pre-rRNA processing, *RPS7* protein stability and TP53 signaling pathway

While the DBA phenotype is usually expressed in erythroid lineage, the ribosomal stress induced by an aberration of RPs is present in many patient's tissues leading to multiple structural, signaling and metabolic abnormalities. For that reason, we selected the U2OS osteosarcoma cell line which is of the same embryonal origin as hematopoietic cells, is frequently used for mechanistic studies in DBA and has been routinely used as a cellular model for ribosomal stress, especially when nucleoli morphology was studied [24–27]. We designed and established cellular model carrying the heterozygous mutation in the *RPS7* gene (genomic coordinates: hg38 chr2:g.3,580,153G > T p.V134F) by CRISPR/Cas9 mediated editing of genomic DNA in the human U2OS cell line. We obtained one monoclonal cell line carrying only the desired non-synonymous variant (Suppl. Fig. 1 A, B). The presence of *RPS7* mutation at mRNA level was verified by Sanger sequencing (Suppl. Fig. 2A). Subsequently, we did qRT-PCR to measure the level of total *RPS7* mRNA expression. We did not find any significant changes in *RPS7* mRNA level in *RPS7*-mut cell line compared to *RPS7*-WT cells (Suppl. Fig. 2B).

Overall aberrant protein synthesis is one of the hallmarks of DBA. Therefore we have analyzed cellular uptake of L-azidohomoalanine which was incorporated into newly synthesized proteins instead of methionine. The global protein synthesis was significantly reduced in *RPS7*-mut cell line compared to the control *RPS7*-WT cells (13.63 %) (Fig. 3), thus indicating *RPS7* V134F leads to ribosome malfunction

which is possibly leading to DBA phenotype.

Next, we examined impact of *RPS7* V134F variant on cell growth. The proliferation capacity of *RPS7*-mut cells was reduced by 31.6 % compared with *RPS7*-WT (Fig. 4A). Furthermore, cell cycle analysis revealed slight G₀/G₁ block in *RPS7*-mut cells (11.43 %) which was associated with decrease in the cell count in both S phase by 4.46 % ($p < 0.02$) and G₂-M phase by 5.53 % ($p < 0.0003$) compared with *RPS7*-WT cell line (Fig. 4 B). Moreover, changes in total DNA and RNA synthesis were detected in mutant versus wild-type cells. More specifically, we detected mild increase in DNA synthesis (Fig. 4 C), while overall RNA synthesis was decreased by 18.65 % in *RPS7*-mut cells (Fig. 4 D).

To better understand the phenotype of *RPS7*-mut cells, we also investigated protein levels deregulated in DBA. Firstly, we focused on the TP53 signaling pathway. This pathway is known to control stress response, cell cycle, apoptosis and plays a major role in ribosomal stress (Fig. 5A). In *RPS7*-mut cells significant decrease in MDM2 levels (30 %) and a parallel 68 % increase in p21 levels were observed, while p53 levels remained unchanged. Furthermore, other DBA associated pathways were deregulated in *RPS7*-mut compared to *RPS7*-WT cellular models. We also observed reduction of c-Myc and E2F1 transcription factors levels together with decrease in cyclin D1 expression (Figs. 4 B, 5 A). Moreover, level of BCCIP protein, directly involved in incorporation of *RPS7* to small ribosomal subunit, showed significant 62 % increase in *RPS7*-mut cells. Recently a new compensatory mechanism, canonical Wnt pathway, for ribosomal stress was described by Dannheisig et al [28]. Therefore, we tested the effect of *RPS7* V134F mutation on β -catenin expression. Indeed, β -catenin level was increased by 75 % in *RPS7*-mut compared to *RPS7*-WT cell line (Fig. 5 A).

We have also examined the *RPS7* protein level in both cellular models and comparable levels were detected (Fig. 5 A). However, important difference in *RPS7* p.V134F protein stability was noted (Fig. 5 B). Interestingly, protein p21 also exhibited lower stability in *RPS7*-mut versus *RPS7*-WT cell lines (Fig. 5 B). Furthermore, we performed an immunodetection of total ubiquitinated proteins (Fig. 5 C). An apparent extra band was detected in *RPS7*-mut compared to *RPS7*-WT with a molecular weight of approximately 25 kDa corresponding to

the ubiquitinated form of RPS7 protein. We suppose that altered protein translation and/or incorporation of RPS7 V134F protein into ribosome activates targeted ubiquitinylation and degradation of the protein, which results in decreased cellular concentration and may further aggravate RPS7 deficiency.

Additionally, we performed an indirect immunofluorescence assay with an antibody against the nucleolus marker nucleolin to analyze nucleolar morphology. Nucleolar morphology was not affected in RPS7-mut cells. However, detailed analysis revealed a higher accumulation of this protein in nucleoli of RPS7-mut cells (Fig. 6), although the total amount of nucleolin in the cells was not altered (Fig. 6C).

Finally, we analyzed the maturation of pre-rRNA precursors in nucleolus, which is often affected by mutations in ribosomal proteins [29]. We identified a 10 % accumulation of pre-rRNA precursors containing the ITS1 region in RPS7-mut cells (Fig. 7A, B). To clarify which pre-ribosomal RNA processing step is affected, we performed Northern blotting. Accumulation of 45S, 41S, 30S and 26S pre-rRNAs were observed in RPS7-mut cell line (Fig. 7C). Additionally, we also detected a decrease in the 21S and 21 S-C pre-rRNAs levels in RPS7-mut model (Fig. 7C).

3.2. Erythrocyte metabolism and oxidative stress

Determination of eADA activity is considered as one of the confirmatory tests for DBA [30]. Indeed, we detected increased eADA activity not only in the affected patient but also in both of her asymptomatic family members harboring the same RPS7 mutation (patient: 4.2 ± 0.8 IU/g Hb; mother: 3.5 ± 0.2 IU/g Hb; sister: 4.6 ± 0.3 IU/g Hb; reference range: 0.8–2.5 IU/g Hb) (Table 1) [14].

We previously reported that the extent of oxidative stress and alterations of erythrocytes' properties may contribute to the high heterogeneity of clinical symptoms in DBA patients [21]. In the following experiments, we, therefore, performed analysis of the anti-oxidative defense of mature erythrocytes and of the activity of their key metabolic enzymes in the patient and her family members harboring the same RPS7 p.V134F mutation but differing in the phenotype. As shown in Fig. 2A, increased levels of ROS were detected only in the patient's erythrocytes (mean fluorescence intensity - MFI: 19.2), but not in erythrocytes of her asymptomatic mother (MFI: 13.7) and sister (MFI: 14.2; mean MFI for controls: 13.4 ± 0.8). Consistently, only the patient showed increased anti-oxidative defense parameters, particularly significantly elevated levels of reduced glutathione (GSH) and significantly increased activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) compared to her mother and sister and healthy controls (Table 1), confirming ongoing oxidative stress and stimulated anti-oxidative defense.

The concomitant significant increase in the activity of hexokinase (HK; approximately 3.5 \times), pyruvate kinase (PK; approximately 2.5 \times) and in the levels of ATP (approximately 3 \times) in the patient's red blood cells also differentiated the patient from healthy controls as well as from asymptomatic family members harboring the same mutation (Table 1). These changes in anaerobic glycolysis suggest increased demand for ATP

in patients with hypoxia caused by inadequate erythrocyte production.

Despite activated anti-oxidative defense and hyperactivated anaerobic glycolysis, flow cytometry of annexin V binding revealed increased exposure of phosphatidylserines (PS) on the membrane of the patient's erythrocytes (MFI: 1.18) compared to her family members (sister MFI: 0.903; mother MFI: 0.942) and controls (mean MFI 0.84 ± 0.11) (Fig. 2B and C). These results are consistent with our previously published data on alterations of erythrocytes' properties in DBA patients (21) and may indicate reduced capacity of patient's erythrocytes to cope with stress.

4. Discussion

Here we present detailed characterization of the first case of a missense mutation in RPS7 as a cause of DBA in humans. To date, thirty cases of RPS7 pathogenic mutations clinically associated with DBA have been reported in Ensembl database. However, all of these sequence variations were located at splice sites [29,31–34] (<https://www.ensembl.org>).

We identified the RPS7 p.V134F substitution in the patient and her mother and sister who have mild symptoms (Fig. 1). To validate the causality of the mutation, we performed a number of functional tests.

As we observed in this study and also reported previously [14,15], the phenotype of family members with identical mutation can be different, including silent carriers. All family members of patients with DBA should therefore be examined, even if asymptomatic and testing of eADA activity (Table 1) could serve as a sensitive screening method for such purpose.

We also showed that the antioxidant defense of patient's erythrocytes (Table 1) is insufficient to cope with increased ROS production (Fig. 2A), leading to alterations in erythrocytes' membrane properties (Fig. 2B and C). This may cause enhanced recognition and destruction of patients' red blood cells by reticuloendothelial macrophages in vivo and account for the phenotypic dissimilarity between the patient and her asymptomatic family members harboring the same RPS7 mutation. Profound hypoxia in the patient may further limit the antioxidant buffering capacity in her erythrocytes [35].

The functional assays were carried on a CRISPR-based cellular model with a physiological expression of RPS7 at mRNA and protein levels (Fig. 5A, Supp. Fig. 2 B). We focused on characteristic features commonly linked to DBA, e.g. effect of the SNV on global protein synthesis, proliferation, cell cycle alteration, TP53 signaling pathway, stability and degradation of RPS7 p.V134F protein compared with RPS7-WT, nucleolar morphology and maturation of pre-rRNA precursors [23,29,36–38].

The major hallmark of all ribosomopathies is impaired protein synthesis due to alterations in ribosomal components [36]. Thus our attention was firstly focused on the effect on global protein synthesis because the determination of translational capacity can shed some light on the extent of the negative effect of RPS7 p.V134F. We found that this SNV causes a significant decrease in global protein synthesis ($p < 0.01$) and proliferation capacity of mutant cells ($p < 0.001$) (Figs. 3C, 4A). This finding is likely due to the lesser ability of the BCCIP protein to

Table 1

Activity of eADA and selected enzymes of anti-oxidative defense and anaerobic glycolysis (G6PD, PK, and HK) and levels of GSH and ATP in red blood cells. *eADA activity was previously reported by Volejnikova et al., 2020 [14].

	eADA (IU/g Hb)	G6PD (IU/g Hb)	PK (IU/g Hb)	HK (IU/g Hb)	GSH (μ M)	ATP (μ mol/l)
Reference range	[0.8–2.5]	[5.4–7.0]	[5.12–5.78]	[0.8–1.6]	[1978–2888]	[188–334]
Patient	$4.2 \pm 0.8^*$ $P = 5.49E-05$	10.3 ± 0.6 $P = 7.73E-05$	14.8 ± 0.8 $P = 1.63E-03$	4.4 ± 0.05 $P = 7.75E-10$	4356 ± 44 $P = 2.03E-04$	775 ± 96 $P = 3.96E-03$
Mother	$3.5 \pm 0.2^*$ $P = 3.56E-07$	5.3 ± 0.2 NS	4.9 ± 0.2 $P = 4.13E-03$	0.7 ± 0.02 $P = 3.50E-03$	2125	205 ± 32 NS
Sister	$4.6 \pm 0.3^*$ $P = 2.14E-02$	6.5 ± 0.1 NS	6.8 ± 0.5 $P = 1.63E-03$	0.9 ± 0.13 NS	2450 ± 35 NS	251 ± 45 NS

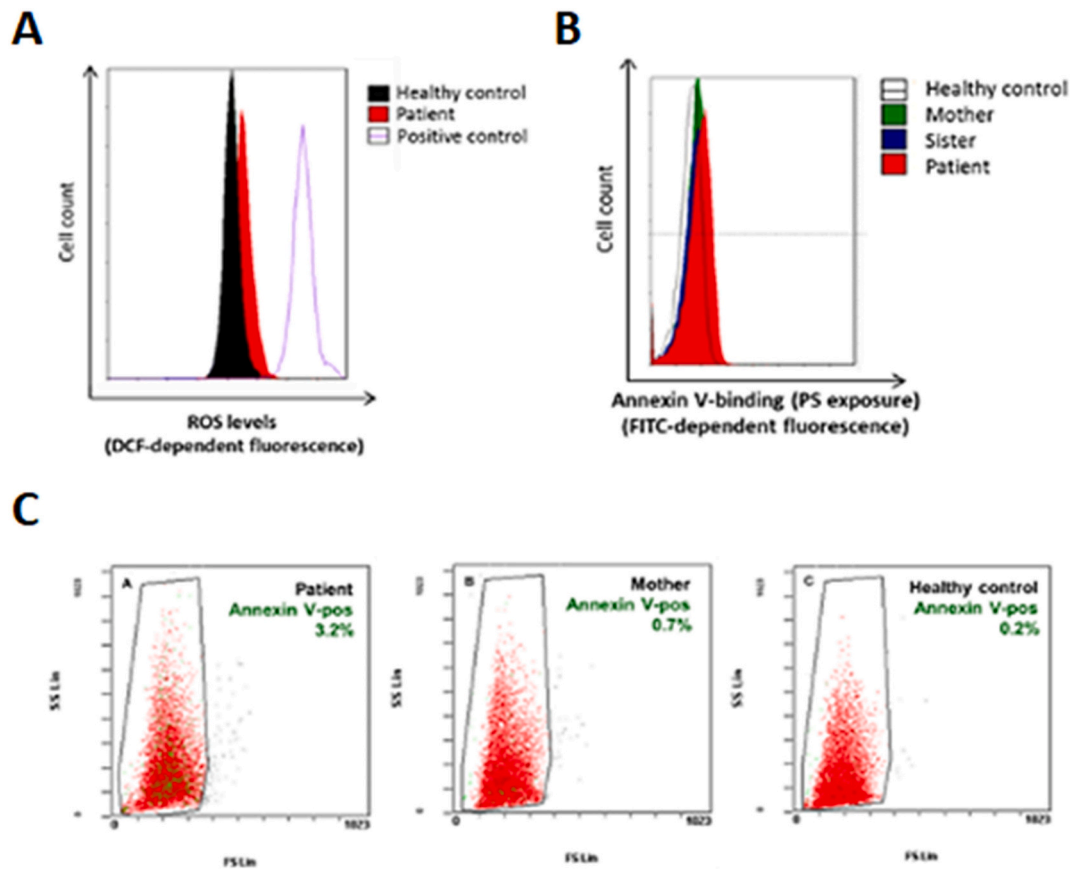


Fig. 2. Determination of ROS levels and Annexin V binding assay. Representative plots and histograms showing elevated levels of ROS (A), increased phosphatidylserine (PS) exposure on erythrocyte membrane (B) and increased percentage of Annexin V-positive erythrocytes (C) in the DBA patient compared to her asymptomatic family member and healthy control. In panel (A), DCF-dependent intensity of fluorescence is proportional to the concentration of ROS; erythrocytes of a healthy control treated with H_2O_2 served as a positive control for induced ROS formation. In panels (B) and (C), increased Annexin V-binding to RBC reflects increased exposure of PS on the erythrocyte membrane.

incorporate RPS7 p.V134F protein into the ribosome as the BCCIP protein specifically binds to the central region (amino acids 59–134) of RPS7 protein [39] (Fig. 5A). RPS7 mutant cell line also demonstrated a slight block in the G_1 phase of the cell cycle most likely caused by decreased protein levels of cyclin D1 and transcription factors c-Myc and E2F1 ($p < 0.05$) (Figs. 4B, 5A). Significantly lower level of c-Myc, a well known global transcription and translation regulator, most probably stands beside the impaired RNA synthesis and modest block in G_1 phase of the cell cycle [40,41] (Figs. 4B, D, 5A). Elevated oxidative stress in patient erythrocytes can be linked to moderately increased DNA synthesis, in the cellular model carrying RPS7 mutation, due to activated DNA repair processes [42] (Figs. 2A, 4C).

As it was previously described, the RPS7 deficiency causes p53-dependent ribosomal stress due to direct interaction with RPL5, RPL11, MDM2 and p53 [43]. Our question was whether a change in single amino acid of RPS7 may impact the TP53 signaling pathway and induce ribosomal stress. Therefore, we examined protein levels of p53 which, remained unchanged in RPS7-mut cell line, while p21 level was significantly increased ($p < 0.000001$). Protein MDM2, a ubiquitin ligase regulating the p53, level was significantly decreased ($p < 0.0004$) (Fig. 5A). We suppose that the higher expression of p21 can be caused by diminished ubiquitination activity of MDM2 and in turn decreased degradation of p53 and other target proteins.

Interestingly, in silico protein stability predictors I-Mutant and MUpPro evaluated the p.V134F substitution potentially destabilizing RPS7 protein and this fact was experimentally confirmed (Fig. 5B).

TP53 signaling pathway activation is one of the key attributes of ribosomal stress, while others are linked to nucleolus, where

transcription and maturation of ribosomal RNA (rRNA) takes place [44]. As it was previously reported, the haploinsufficiency of RPS7 results in impaired pre-rRNA processing during early stages [29]. Indeed, significantly increased ($p < 0.05$) abundance of pre-rRNA precursors detected by ITS1 probe in the RPS7-mut cell line (Fig. 7B). More specifically, 45S, 41S, 30S and 26S pre-rRNA precursors were accumulated at the expense of later stages pre-rRNA precursors 21S and 21 S-C (Fig. 7C). These findings are consistent with Gazda et al. study [29]. Another interesting finding linked to the maturation of pre-rRNAs is that nucleolin is preferentially located in nucleoli of RPS7-mut cells ($p < 0.05$) (Fig. 6). This multifunctional protein is promoting pre-rRNA transcription and acts in the early steps of pre-rRNA processing [44]. Our hypothesis is that higher localization of nucleolin in nucleoli is a compensatory response to insufficient levels of 21S and 21 S-C pre-rRNA precursors. However, a more detailed study of the mechanism involved would certainly shed more light on pathways regulating the maturation of pre-rRNAs in DBA.

To better understand compensatory mechanisms of the ribosomal stress related to RPS7 alteration, we immunodetected the main transcription factor of canonical Wnt pathway, β -catenin. This pathway was recently reported to play an important role in reduction of nucleolar and ribosomal stress by Dannheisig et al. [28]. In case of our CRISPR-based cellular model of RPS7 deficiency, the level of β -catenin was significantly induced ($p < 0.000001$) (Fig. 5A). This finding is in agreement with Dannheisig et al. study [28].

Our results show that SNV in the RPS7 gene cause lower stability of the RPS7 protein and probably its higher presence in ribosome-free form due to negatively affected binding capacity to BCCIP protein, which regulates the localization of RPS7 to ribosomes, under physiological

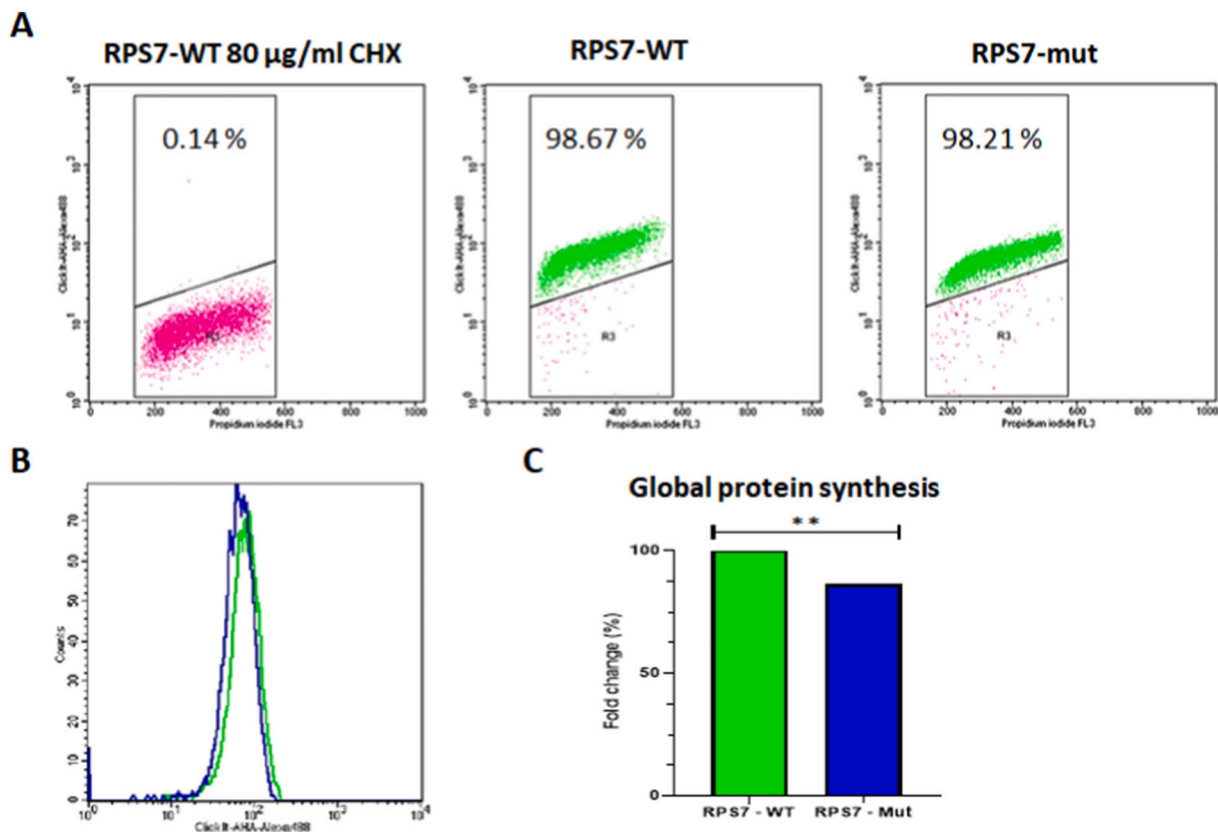


Fig. 3. Analysis of protein synthesis by flow cytometry in RPS7-WT versus RPS7-mut cell lines. (A) The upper gate represents the cell population actively synthesizing proteins. (B, C) The global protein synthesis was determined by the intensity of incorporated L-azidohomoalanine in the cell population actively synthesizing proteins; $n = 3$ biological replicates.

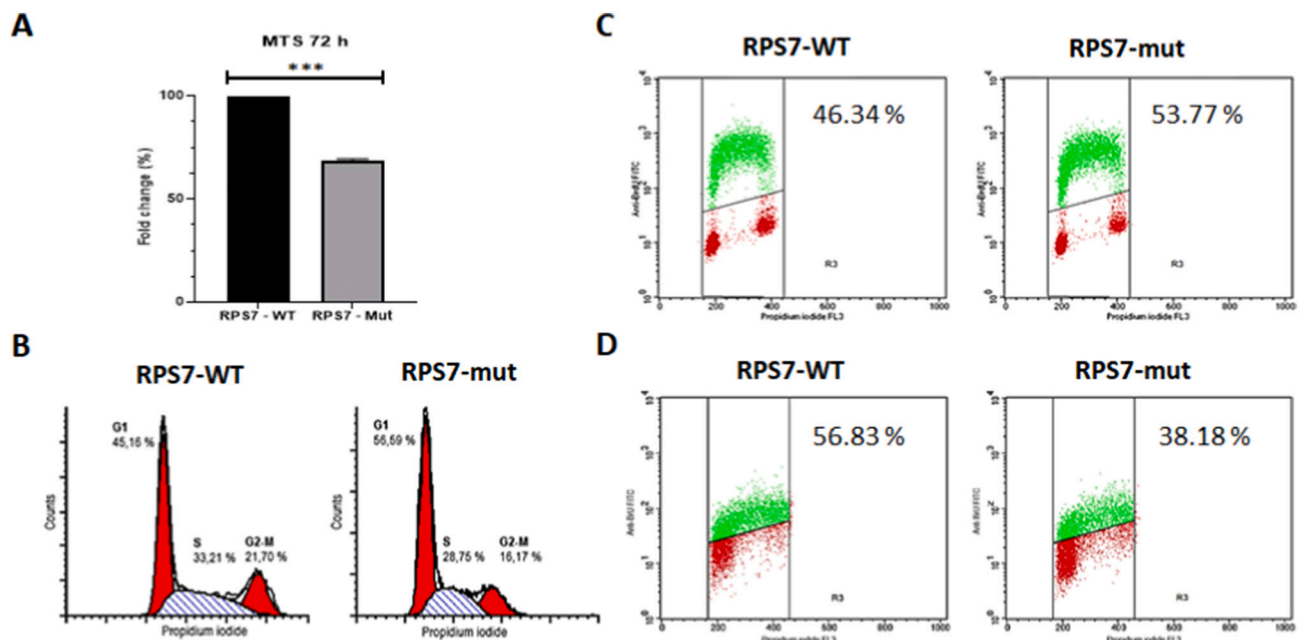


Fig. 4. Results from analysis of cellular proliferation in RPS7-WT versus RPS7-mut cell lines. (A), cell cycle (B), DNA synthesis (C) and RNA synthesis (D); $n = 3$ biological replicates.

conditions [39]. This leads to ribosomal stress with remarkable impact on protein synthesis, pre-rRNAs maturation and proliferation capacity.

In conclusion, the presented functional tests revealed multiple cellular abnormalities associated with the novel RPS7 p.V134F variant

and support pathogenicity of the mutation in DBA. Our case study demonstrates that comprehensive analyses of larger patients cohorts and cellular model systems are needed to further elucidate the pathophysiology of DBA and to better understand disease-modifying conditions,

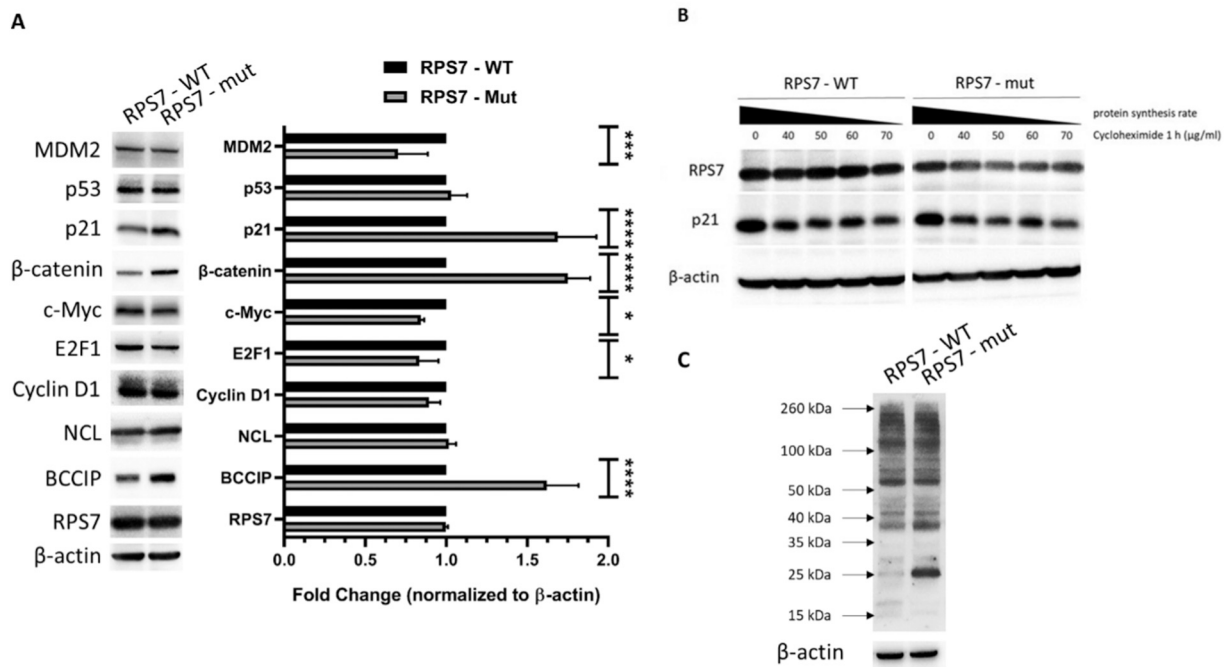


Fig. 5. Alterations in protein expression, stability and ubiquitination in RPS7-WT versus RPS7-mut cell lines. (A) Western blots showing the levels of MDM2, p53, p21, β -catenin, c-Myc, E2F1, cyclin D1, nucleolin, BCCIP, RPS7, β -actin and normalization to β -actin. (B) Stability of RPS7 and p21 proteins after inhibition of translation by increasing concentrations of cycloheximide. (C) Total ubiquitin content.; n = 3 biological replicates.

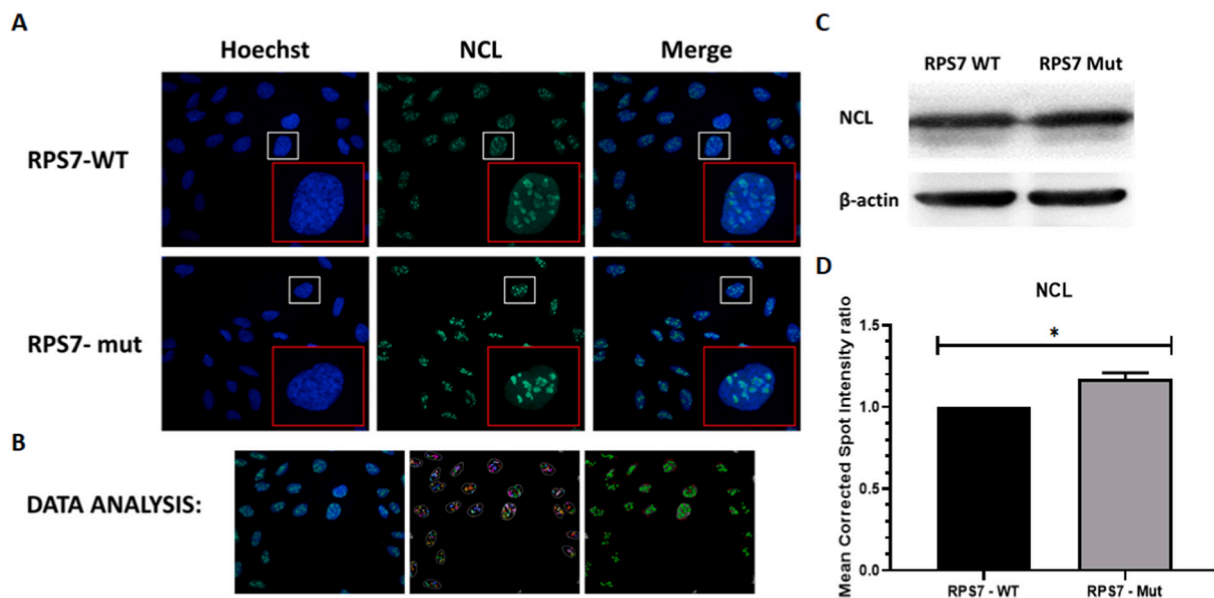


Fig. 6. SNV in RPS7 gene (RPS7-mut) does not increase the total level of nucleolin but causes higher protein accumulation in nucleoli. A) From the left side: cell nuclei stained with Hoechst 33342, localization of nucleolin, merge. (B) Illustration of image analysis using Columbus software. (C) Western blot shows the total levels of nucleolin and β -actin. (D) Statistical analysis of nucleolin amount in nucleoli (mean corrected spot intensity per nucleolus); n = 3 biological replicates.

including oxidative stress, in symptomatic versus asymptomatic carriers.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2022.102690>.

CRedit authorship contribution statement

PV performed MPS sequencing, bioinformatics analysis and annotation of genetic variants, AK performed CRISPR/Cas9 cell line model preparation, MTS viability assay, cell cycle analysis, BrdU incorporation analysis, BrU incorporation analysis, protein translational analysis,

Western blotting analysis, statistical analysis, ZM performed Northern blotting analysis and rRNA FISH, MO performed mRNA quantification, nucleoli morphology analysis, immunofluorescence analysis, statistical analysis, JV and DP participated in patient management, PV, AK, JV, MO, ZM, MHa, and MHo drafted the manuscript. RM and PK performed enzyme assays and were responsible for GSH, ATP measurements. OJ examined ROS levels and Annexin V binding. MHa, MHo participated in study design, data analysis and interpretation of results. DP and MHa conceived and designed the work and finally revised the manuscript. All authors approved the final manuscript.

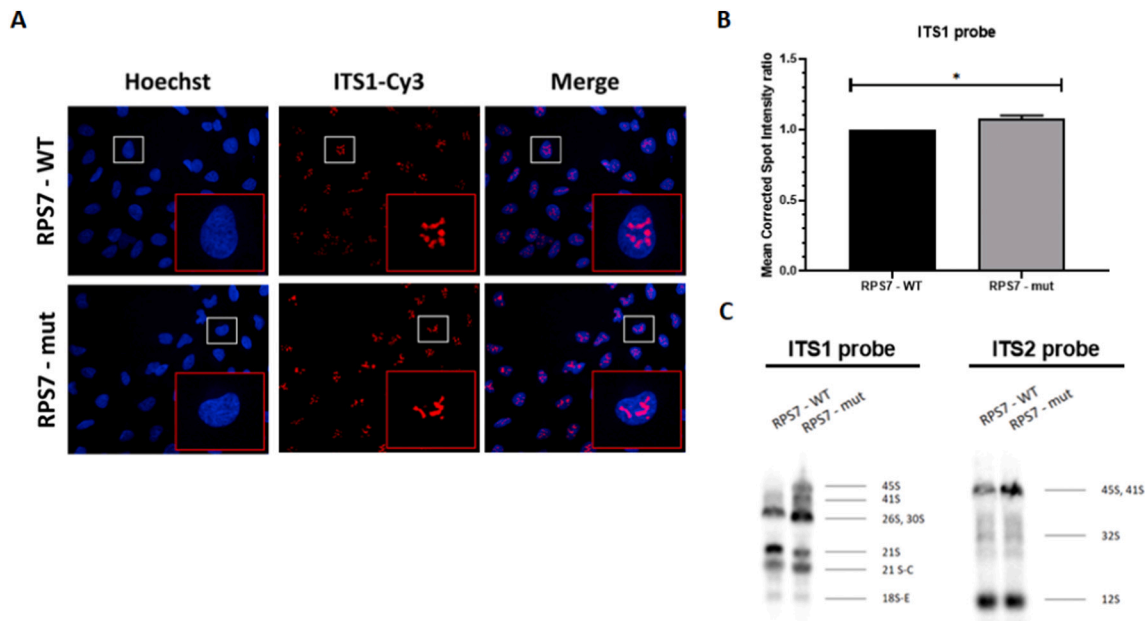


Fig. 7. Detection of pre-ribosomal RNA by FISH and Northern blotting in RPS7-WT versus RPS7-mut cell lines. (A) From the left side: cell nuclei stained with Hoechst 33342, localization of pre-rRNA by ITS1 probe, merge. (B) Statistical analysis of pre-rRNA amount in nucleoli (mean corrected spot intensity per nucleolus). (C) Detection of pre-rRNA species by Northern blotting; n = 3 biological replicates.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Renata Burianova for help with flow cytometry data analysis.

Funding

Supported by grants of the Czech Ministry of Health (AZV16-32105A), Czech Ministry of Education, Youth and Sports (8F20005, EATRIS-CZ LM2018133, ACGT-CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448), Technological Agency of the Czech Republic (PerMed TACR TN 01000013) and Palacky University Olomouc (IGA UP LF_2021_019, IGA UP LF_2021_038, and IGA_LF_2021_004).

References

- [1] S. Ball, Diamond Blackfan anemia, *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Prog.* 2011 (2011) 487–491, <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.487>.
- [2] F. Ikeda, K. Yoshida, T. Toki, T. Uechi, S. Ishida, Y. Nakajima, Y. Sasahara, Y. Okuno, R. Kanezaki, K. Terui, T. Kamio, A. Kobayashi, T. Fujita, A. Sato-Otsubo, Y. Shiraishi, H. Tanaka, K. Chiba, H. Muramatsu, H. Kanno, S. Ohga, A. Ohara, S. Kojima, N. Kenmochi, S. Miyano, S. Ogawa, E. Ito, Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia, *Haematologica* 102 (2017) e93–e96, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.153932>.
- [3] E. Errichiello, A. Vetro, T. Mina, A. Wischmeijer, E. Berrino, M. Carella, M. Romagnoli, P. Sacchini, T. Venesio, M. Zecca, O. Zuffardi, Whole exome sequencing in the differential diagnosis of Diamond-Blackfan anemia: clinical and molecular study of three patients with novel RPL5 and mosaic RPS19 mutations, *Blood Cell Mol. Dis.* 64 (2017) 38–44, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.002>.
- [4] J. Cmejlova, L. Dolezalova, D. Pospisilova, K. Petrylova, J. Petrak, R. Cmejla, Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia, *Haematologica* 91 (2006) 1456–1464.
- [5] V.G. Sankaran, R. Ghazvinian, R. Do, P. Thiru, J.-A. Vergilio, A.H. Beggs, C.A. Sieff, S.H. Orkin, D.G. Nathan, E.S. Lander, H.T. Gazda, Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in diamond-blackfan anemia, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 2439–2443, <https://doi.org/10.1172/JCI63597>.
- [6] K.W. Gripp, C. Curry, A.H. Olney, C. Sandoval, J. Fisher, J.X.-L. Chong, L. Pilchman, R. Sahrroui, D.L. Stabley, K. Sol-Church, Diamond-blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28, *Am. J. Med. Genet. A* 164A (2014) 2240–2249, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36633>.
- [7] K.A. O'Brien, N.E. Seidel, J. Farrar, A. Vlachos, Nisc Comparative Sequencing Program, S.M. Anderson, X. An, E. Atsidaftos, H. Malech, R.J. Arceci, S.R. Ellis, J. M. Lipton, D.M. Bodine, Autosomal recessive Diamond-Blackfan anemia: identification of mutations in MCM2 and FlnB, *Blood* 122 (2013) 589, <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.589.589>.
- [8] P.A. Trainor, A.E. Merrill, Ribosome biogenesis in skeletal development and the pathogenesis of skeletal disorders, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 769–778, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.010>.
- [9] P. Gustavsson, T.N. Willing, A. van Haeringen, G. Tchernia, I. Dianzani, M. Donnér, G. Elinder, J.I. Henter, P.G. Nilsson, L. Gordon, G. Skeppner, A. Kreuger, N. Dahl, L. van't Veer-Korthof, Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb, *Nat Genet.* 16 (1997) 368–371, <https://doi.org/10.1038/ng0897-368>.
- [10] H. Cario, H. Bode, P. Gustavsson, N. Dahl, E. Kohne, A microdeletion syndrome due to a 3-mb deletion on 19q13.2–Diamond-blackfan anemia associated with macrocephaly, hypotonia, and psychomotor retardation, *Clin. Genet.* 55 (1999) 487–492, <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.1999.550616.x>.
- [11] K.M. Goudarzi, M.S. Lindström, Role of ribosomal protein mutations in tumor development (review), *Int. J. Oncol.* 48 (2016) 1313–1324, <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3387>.
- [12] N. Danilova, K.M. Sakamoto, S. Lin, Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family, *Blood* 112 (2008) 5228–5237, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132290>.
- [13] J. Badhai, A.-S. Fröjmark, E.J. Davey, J. Schuster, N. Dahl, Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 1036–1042, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.002>.
- [14] J. Volejnikova, P. Vojta, H. Urbankova, R. Mojzíkova, M. Horvathova, I. Hochova, J. Cermak, J. Blatny, M. Sukova, E. Bubanska, J. Feketeova, D. Prochazkova, J. Horakova, M. Hajdich, D. Pospisilova, Czech and slovak diamond-blackfan anemia (DBA) registry update: clinical data and novel causative genetic lesions, *Blood Cells Mol. Dis.* 81 (2020), 102380, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.102380>.
- [15] D. Pospisilova, J. Cmejlova, B. Ludikova, J. Stary, Z. Cerna, J. Hak, P. Timr, K. Petrylova, J. Blatny, S. Vokurka, R. Cmejla, The czech National Diamond-Blackfan Anemia Registry: clinical data and ribosomal protein mutations update, *Blood Cells Mol. Dis.* 48 (2012) 209–218, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.02.002>.
- [16] K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics* 28 (2012) 1166–1167, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
- [17] E. Beutler, K.G. Blume, J.C. Kaplan, G.W. Löhr, B. Ramot, W.N. Valentine, International Committee for Standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis, *Br. J. Haematol.* 35 (1977) 331–340, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x>.
- [18] R. Mojzíkova, P. Dolezel, J. Pavlicek, P. Mlejnek, D. Pospisilova, V. Divoky, Partial glutathione reductase deficiency as a cause of diverse clinical manifestations in a

- family with unstable hemoglobin (Hemoglobin Haná, $\beta 63(E7)$ his-Asn), *Blood Cells Mol. Dis.* 45 (2010) 219–222, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.07.003>.
- [19] R. Mojzickova, P. Koralkova, D. Holub, Z. Zidova, D. Pospisilova, J. Cermak, Z. Striezencova Lalahova, K. Indrak, M. Sukova, M. Partsova, J. Kucerova, M. Horvathova, V. Divoky, Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios, *Br. J. Haematol.* 165 (2014) 556–563, <https://doi.org/10.1111/bjh.12779>.
- [20] Z. Zidova, K. Kapralova, P. Koralkova, R. Mojzickova, D. Dolezal, V. Divoky, M. Horvathova, DMT1-mutant erythrocytes have shortened life span, accelerated glycolysis and increased oxidative stress, *Cell. Physiol. Biochem.* 34 (2014) 2221–2231, <https://doi.org/10.1159/000369665>.
- [21] K. Kapralova, O. Jahoda, P. Koralkova, J. Gursky, L. Lanikova, D. Pospisilova, V. Divoky, M. Horvathova, Oxidative DNA damage, inflammatory signature, and altered erythrocytes properties in diamond-blackfan anemia, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), <https://doi.org/10.3390/ijms21249652>.
- [22] T. Schneider-Poetsch, J. Ju, D.E. Eyler, Y. Dang, S. Bhat, W.C. Merrick, R. Green, B. Shen, J.O. Liu, Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 209–217, <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>.
- [23] C. Carron, M.-F. O'Donohue, V. Choesmel, M. Faubladiet, P.-E. Gleizes, Analysis of two human pre-ribosomal factors, bystin and hTsr1, highlights differences in evolution of ribosome biogenesis between yeast and mammals, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 280–291, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq734>.
- [24] R.A. Idol, S. Robledo, H.-Y. Du, D.L. Crimmins, D.B. Wilson, J.H. Ladenson, M. Bessler, P.J. Mason, Cells depleted for RPS19, a protein associated with diamond blackfan anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production, *Blood Cell Mol. Dis.* 39 (2007) 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.02.001>.
- [25] K. Yang, J. Yang, J. Yi, Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases, *Cell Stress* 2 (2018) 125–140, <https://doi.org/10.15698/cst2018.06.139>.
- [26] K. Holmberg Olausson, M. Nistér, M.S. Lindström, p53-Dependent and -independent nucleolar stress responses, *Cells* 1 (2012) 774–798, <https://doi.org/10.3390/cells1040774>.
- [27] P. Moudry, K. Chroma, S. Bursac, S. Volarevic, J. Bartek, RNA-interference screen for p53 regulators unveils a role of WDR75 in ribosome biogenesis, *Cell Death Differ.* (2021), <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00882-0>.
- [28] D.P. Dannheisig, J. Bächle, J. Tasic, M. Keil, A.S. Pfister, The Wnt/ β -catenin pathway is activated as a novel nucleolar stress response, *J. Mol. Biol.* 433 (2021), 166719, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.018>.
- [29] H.T. Gazda, M.R. Sheen, A. Vlachos, V. Choesmel, M.-F. O'Donohue, H. Schneider, N. Darras, C. Hasman, C.A. Sieff, P.E. Newburger, S.E. Ball, E. Niewiadomska, M. Matysiak, J.M. Zaucha, B. Glader, C. Niemeyer, J.J. Meerpohl, E. Atsidaftos, J. M. Lipton, P.-E. Gleizes, A.H. Beggs, Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in diamond-blackfan anemia patients, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 769–780, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.004>.
- [30] A. Vlachos, S. Ball, N. Dahl, B.P. Alter, S. Sheth, U. Ramenghi, J. Meerpohl, S. Karlsson, J.M. Liu, T. Leblanc, C. Paley, E.M. Kang, E.J. Leder, E. Atsidaftos, A. Shimamura, M. Bessler, B. Glader, J.M. Lipton, Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference, *Br. J. Haematol.* 142 (2008) 859–876, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07269.x>.
- [31] G. Gerrard, M. Valgañón, H.E. Foong, D. Kasperaviciute, D. Iskander, L. Game, M. Müller, T.J. Aitman, I. Roberts, J. de la Fuente, L. Foroni, A. Karadimitris, Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with diamond-blackfan anaemia, *Br. J. Haematol.* 162 (2013) 530–536, <https://doi.org/10.1111/bjh.12397>.
- [32] N.S. Smetanina, I.V. Mersyanova, M.A. Kurnikova, G.S. Ovsyannikova, L. A. Hachtryan, V.O. Bobrynnina, M.A. Maschan, G.A. Novichkova, J.M. Lipton, A. A. Maschan, Clinical and genomic heterogeneity of diamond blackfan anemia in the Russian Federation, *Pediatr. Blood Cancer* 62 (2015) 1597–1600, <https://doi.org/10.1002/pbc.25534>.
- [33] T. Ichimura, K. Yoshida, Y. Okuno, T. Yujiri, K. Nagai, M. Nishi, Y. Shiraishi, H. Ueno, T. Toki, K. Chiba, H. Tanaka, H. Muramatsu, T. Hara, H. Kanno, S. Kojima, S. Miyano, E. Ito, S. Ogawa, S. Ohga, Diagnostic challenge of diamond-blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing, *Int. J. Hematol.* 105 (2017) 515–520, <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2151-7>.
- [34] T. Akram, A. Fatima, J. Klar, J. Hoeber, M. Zakaria, M. Tariq, S.M. Baig, J. Schuster, N. Dahl, Aberrant splicing due to a novel RPS7 variant causes diamond-blackfan anemia associated with spontaneous remission and meningocele, *Int. J. Hematol.* 112 (2020) 894–899, <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02950-6>.
- [35] S.C. Rogers, A. Said, D. Corcuera, D. McLaughlin, P. Kell, A. Doctor, Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance, *FASEB J.* 23 (2009) 3159–3170, <https://doi.org/10.1096/fj.09-130666>.
- [36] R. Cmejla, J. Cmejlova, H. Handrkova, J. Petrak, D. Pospisilova, Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in diamond-blackfan anemia, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 1178–1182, <https://doi.org/10.1002/humu.20608>.
- [37] D. Chen, Z. Zhang, M. Li, W. Wang, Y. Li, E.R. Rayburn, D.L. Hill, H. Wang, R. Zhang, Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function, *Oncogene* 26 (2007) 5029–5037, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210327>.
- [38] Y. Zhu, M.V. Poyurovsky, Y. Li, L. Biderman, J. Stahl, X. Jacq, C. Prives, Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2, *Mol. Cell* 35 (2009) 316–326, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.014>.
- [39] Q. Ba, X. Li, C. Huang, J. Li, Y. Fu, P. Chen, J. Duan, M. Hao, Y. Zhang, J. Li, C. Sun, H. Ying, H. Song, R. Zhang, Z. Shen, H. Wang, BCCIP β modulates the ribosomal and extraribosomal function of S7 through a direct interaction, *J. Mol. Cell Biol.* 9 (2017) 209–219, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx019>.
- [40] T.R. Kress, A. Sabò, B. Amati, MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production, *Nat. Rev. Cancer* 15 (2015) 593–607, <https://doi.org/10.1038/nrc3984>.
- [41] I. Perez-Roger, S.H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing, H. Land, Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1), *EMBO J.* 18 (1999) 5310–5320, <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5310>.
- [42] R.A. Egler, E. Fernandes, K. Rothermund, S. Sereika, N. de Souza-Pinto, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, E.V. Prochownik, Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-myc function by peroxiredoxin 1, *Oncogene* 24 (2005) 8038–8050, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208821>.
- [43] S. Bursac, M.C. Brdovcak, M. Pfannkuchen, I. Orsolic, L. Golomb, Y. Zhu, C. Katz, L. Daftuar, K. Grabusic, I. Vukelic, V. Filić, M. Oren, C. Prives, S. Volarevic, Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 20467–20472, <https://doi.org/10.1073/pnas.1218535109>.
- [44] L.M. Ogawa, S.J. Baserga, Crosstalk between the nucleolus and the DNA damage response, *Mol. Biosyst.* 13 (2017) 443–455, <https://doi.org/10.1039/c6mb00740f>, accessed 22.12.2021, https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSG00000171863;r=2:3575260-3580920.