

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta



**Expres vybraných proteinů v buňkách
mnohočetného myelomu ovlivněných
arylazopyrazoly**

Bakalářská práce

Zlata Hušková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zlata Hušková
Název práce	Expres vybraných proteinů v buňkách mnohočetného myelomu ovlivněných arylazopyrazoly
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů Univerzita Palackého v Olomouci a Institut experimentální botaniky AV ČR
Vedoucí práce	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	V současnosti intenzivně vyvíjená protinádorová léčiva jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK). Aplikací CDK inhibitorů lze u maligních buněk navodit zastavení buněčného cyklu a transkripce a tím vyvolat apoptosu. Principem působení inhibitorů CDK9 je potlačení transkripce, která vede k poklesu exprese antiapoptotických proteinů s nízkým poločasem rozpadu a navození apoptosy. Tato bakalářská práce se zabývá stanovením vlivu inhibitorů cyklin-dependentních kinas ze skupiny arylazopyrazolů na expresi antiapoptotických proteinů Bcl-2, Mcl-1 a XIAP v buňkách mnohočetného myelomu.
Klíčová slova	mnohočetný myelom, apoptosa, CDK inhibitor
Počet stran	42
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Zlata Hušková
Title of thesis	Expression of selected proteins in multiple myeloma cells treated with arylazopyrazoles
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators Palacky University & Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	Currently intensively develop anticancer drugs are cyclin-dependent kinases (CDKs) inhibitors. An application of CDK inhibitors can block of cell cycle and transcription in malignant cells and consequently the apoptosis can be induced. CDK9 inhibitors suppress transcription which leads to decreasing of expression antiapoptotic proteins with short half-life and then CDK 9 inhibitors induce apoptosis. This thesis deals with the effect of cyclin-dependent kinases inhibitor from the group arylazopyrazoles on expression antiapoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and XIAP in multiple myeloma cells.
Keywords	multiple myeloma, apoptosis, CDK inhibitor
Number of pages	42
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Radka Jordy, Ph.D. s použitím citované literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

.....

Zlata Hušková

Za dokončení své bakalářské práce bych chtěla touto cestou poděkovat všem lidem, kteří mají podíl na jejím úspěšném dokončení. Děkuji vedoucímu své bakalářské práce, Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. a Mgr. Janě Navrátilové za odborné vedení. Dále děkuji svým rodičům, kteří mě po celou dobu studií podporovali.

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE.....	7
2. ÚVOD.....	9
2.1. Mnohočetný myelom.....	10
2.1.1 Projevy nemoci	10
2.1.2 Vznik a molekulární podstata nemoci.....	11
2.1.3 Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu	13
2.2 Apoptosa.....	14
2.2.1 Vnější apoptotická dráha	15
2.2.2 Vnitřní dráha	16
2.3 Antiapoptotické proteiny	17
2.4 Cyklin-dependentní kinasy (CDK)	20
2.5 Inhibitory cyklin-dependentních kinas	21
3. MATERIÁL.....	25
3.1 Přístrojové vybavení.....	25
3.2 Použité chemikálie	25
3.3 Použité roztoky	26
3.4 Použité protilátky	26
3.5 Použité inhibitory.....	27
3.6 Buněčná linie	27
4. METODY	28
4.1 Ovlivnění a sklizení ovlivněných buněk	28
4.2 Izolace celkové RNA, reverzní transkripce.....	28
4.3 Polymerázová řetězová reakce, DNA elektroforéza	28
4.4 SDS-PAGE, western blotting	29
4.5 Imunodetekce na membráně	29
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
5.1 Analýza hladiny transkriptů pomocí RT-PCR.....	30
5.2 Analýza hladiny proteinů pomocí SDS PAGE a Western Blot.....	32
6. ZÁVĚR.....	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	35
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1. CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma Expres vybraných proteinů v buňkách mnohočetného myelomu ovlivněných CDK inhibitory.
- 2) Osvojení si laboratorních metod.
- 3) Stanovení vlivu některých inhibitorů CDK na expresi antiapoptotických proteinů Mcl-1, Bcl-2 a XIAP v buňkách mnohočetného myelomu, jedná se o inhibitory LGR 1741 a 1742.

TEORETICKÁ ČÁST

2. ÚVOD

V současné době tvoří onemocnění mnohočetným myelomem (Multiple myeloma, MM) přibližně 1 % všech malignit a patří mezi druhý nejčastější typ rakoviny krve hned po non-Hodgkinově lymfomu. Průměrná doba přežití pacientů představuje dva až tři roky (Kyle *et al.*, 2004). Jedná se o hematologické onemocnění postihující plazmatické buňky, které se díky genetickým změnám mění na buňku nádorovou. Transformované plazmatické buňky nepodléhají apoptose, ale klonální expanzi (Multiple myeloma research foundation, 2011).

Protinádorová léčba mnohočetného myelomu v praxi zahrnuje radioterapii, chemoterapii a transplantaci kostní dřeně. V současné době je ve vývoji také velké množství experimentálních terapií MM. Například antiapoptotické proteiny, které poskytují rakovinným buňkám existenční výhodu, představují slibný cíl výzkumu pro léčbu myelomu a určitý potenciál do budoucna.

Dalším cílem výzkumu jsou cyklin-dependentní kinasy regulující dva procesy důležité pro přežití maligních buněk. Jedná se o řízení buněčného cyklu a genovou transkripci (Gao *et al.*, 2006). CDK jsou hlavní regulační enzymy a jejich zablokováním pomocí inhibitorů CDK lze zastavit buněčný cyklus a transkripci u nádorových buněk, což může v určitých případech vést až k apoptose. Díky tomu jsou v současné době inhibitory CDK cílem intenzivního studování. Výzkum inhibitorů je spojen hlavně s tím, že se navrhuje a testují neustále nové a lepší inhibitory. A také se vyvíjí a hledají účinnější varianty již zavedených inhibitorů CDK.

2.1. Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je maligní hematologické onemocnění, které postihuje plazmatické buňky, jenž se díky genetickým změnám mění na buňku nádorovou (Multiple myeloma research foundation, 2011). Patří mezi druhý nejčastější typ rakoviny krve hned po non-Hodgkinově lymfomu a tvoří přibližně 10 % všech hematologických malignit. Ve skupině všech nádorových onemocnění představuje přibližně 1 %.

V současné době nebyly popsány žádné přímé příčiny vedoucí ke vzniku tohoto onemocnění. Výzkum naznačuje možnou spojitost s oslabením imunitního systému a výkonem povolání, kde je člověk vystaven rizikovým chemikáliím nebo záření (Multiple myeloma research foundation, 2011).

2.1.1 Projevy nemoci

Charakteristickými příznaky jsou bolesti v okolí kostí, únava, slabost, časté infekce, ztráta chuti k jídlu a úbytek na váze. Těžké postižení kostní tkáně v době diagnózy je přítomno až u 80 % pacientů s mnohočetným myelomem. Nejvíce bývají postiženy kosti páteře, pánve a hrudního koše. Některé další příznaky souvisí s vysokou hladinou vápníku v krvi vyvolávající poruchy funkce ledvin. Projevují se změnami v diuréze, větší žízní, neklidem, popřípadě extrémní slabostí, zmateností nebo nevolností či zvracením (Multiple myeloma research foundation, 2011). Mezi hematologické abnormality, které se často vyskytují ve spojení s mnohočetným myelomem, patří anémie, leukopenie a trombocytopenie (Laubach *et al.*, 2011).

Maligní buňky se nekontrolovatelně množí a produkují velké množství specifické protilátky zvané monoklonální (M) protein, který narušuje normální funkci kostní dřeně a poškozuje kostní tkáň. Dále pak myelomové buňky produkují nefunkční protilátky a koncentrace fyziologických imunoglobulinů klesá pod 50 %. To souvisí se selháním imunitní reakce a obranyschopnosti organismu. Krví se tyto protilátky mohou dostat až do ledvin a zde blokovat filtrační aparát, což může vést až k jejich selhání. Zároveň u většiny pacientů nastává dřeňový útlum (aplastická anémie, Multiple myeloma research foundation, 2011).

Někteří pacienti mohou zůstat bez progresu i několik let (Anderson *et al.*, 2003; Hjorth *et al.*, 1993).

2.1.2 Vznik a molekulární podstata nemoci

Plazmatické buňky jsou bílé krvinky, které produkují protilátky (imunoglobuliny). Ve zdravé kostní dřeni se B-lymfocyty diferencují v plazmatické buňky (Obr. 1), které přechází do krve. Zde cirkulují a po stimulaci produkují protilátky, které se váží na přítomné antigeny. U mnohočetného myelomu dochází u plazmatických buněk ke genetickým změnám vedoucím až k transformaci normální buňky na nádorovou (Obr. 1).

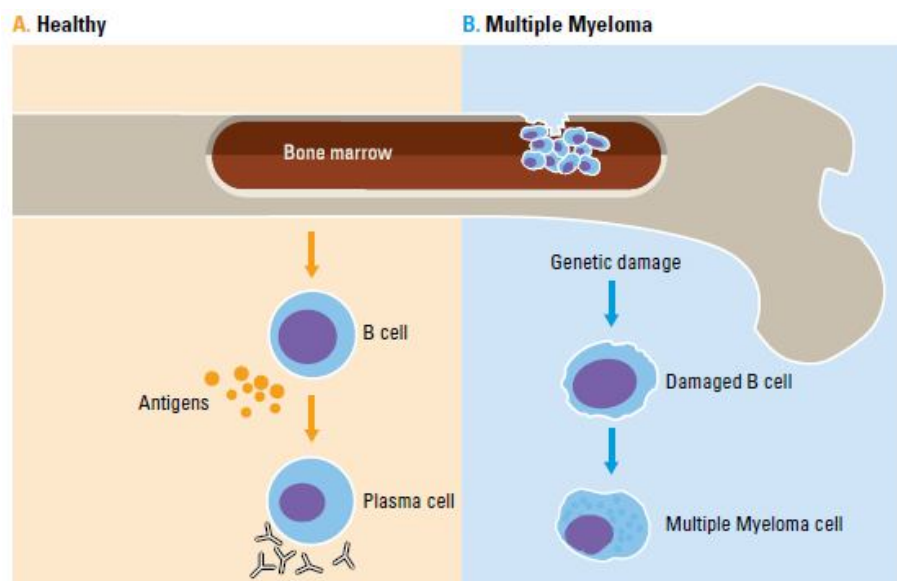
Nejčastějším typem mutací u hematologických onemocnění jsou chromozomové translokace. Jedná se o nevyvážené translokace a inserce, které se mohou týkat i více než dvou chromozomů (Fonseca *et al.*, 2004). U mnohočetného myelomu je častým nálezem přítomnost reciprokových translokací, které vznikají procesem nelegitimní switch rekombinace. Jedná se o proces, který postihuje gen pro těžké řetězce imunoglobulinů v oblasti chromozomu 14q32. Důsledkem toho se dostanou onkogeny na derivovaných chromozomech pod kontrolu molekulárních zesilovačů lokusu těžkého řetězce (Němec *et al.*, 2008). Mezi nejčastější strukturní přestavby u myelomu patří přestavby genu c-MYC.

Jednou z mnoha možných genetických změn může být uniparentální disomie. Normální chromozomová sestava diploidního organismu se skládá z jedné sady chromozomů pocházejících od otce a druhé sady od matky. Uniparentální disomie je stav, kdy oba chromozomy pocházejí od jednoho rodiče, buď od otce (paternální disomie) nebo od matky (maternální disomie; Engel, 1980). Existují dva typy disomie, vrozená a získaná. Vrozená je spojena s chybami v průběhu meiosis v zárodečných buňkách a vede k vývojovým onemocněním. Získaná uniparentální disomie nejspíše vzniká chybami v mitotickém dělení a může mít za následek vývoj rakoviny. Nejčastěji vzniká disomie celého chromozomu díky chybné segregaci v mitose, kdy jeden chromozom je ztracen a druhý je zdvojen nebo dojde k chybnému rozchodu chromozomu v meiotických děleních. Další možností vzniku disomie je chyba při opravě dvouřetězcových zlomů, kdy v místě zlomu dojde ke zdvojení (Tuna *et al.*, 2009).

U zdravého člověka dochází k neustálé tvorbě a degradaci kostní tkáně působením buněk osteoblastů a osteoklastů. Kostní tkáň vzniká mineralizací mezibuněčné hmoty, která je spolu s kolagenními vlákny produkována osteoblasty. Když se osteoblast obklopí mezibuněčnou hmotou, dochází k jeho přeměně na osteocyt,

což je základní buňka zralé kosti. U mnohočetného myelomu převažuje zánik kosti nad jejím vznikem vlivem zvýšené resorpce kostní tkáně prostřednictvím osteoklastů. Ty mohou být stimulovány látkou OAF (osteoclast-activating factor), která je u mnohočetného myelomu produkována nádorovými buňkami. Jedná se o cytokin (peptid), který zvyšuje resorpci mineralizované kostní tkáně. Aktivované osteoklasty produkují enzymy kolagenasu a kyselou fosfatasu, s jejichž pomocí odbourávají kostní minerály a narušují strukturu základní hmoty. Klíčovým faktorem aktivace a diferenciaci osteoklastů je RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; Roux *et al.*, 2002), jehož produkce je indukována interleukinem 6 (IL-6). Za fyziologických podmínek je hladina interleukinu 6 nízká. Bylo prokázáno, že u pacientů s myelomem je jeho hladina zvýšená (Sati *et al.*, 1998). Jedná se o hlavní cytokin působící na buňky kostní dřeně a zprostředkovávající růst, přežití a lékovou rezistenci myelomových buněk. Je produkován především makrofágy, monocyty, B-lymfocyty a stromálními buňkami kostní dřeně. IL-6 také narušuje homeostasu v kostech, což vede k jejich degradaci.

Naopak tvorba nové kostní tkáně je snižena, protože dochází k inaktivaci osteoblastů. Bylo prokázáno, že GFI1 (growth factor independent 1 transcription represor) a TNF α (tumor necrosis factor α) potlačují produkci RUNX2 (runt-related transcription factor 2), jenž je důležitým faktorem diferenciaci osteoblastů. Díky tomu dochází k bloku osteoblastogeneze a tvorbě kosti u mnohočetného myelomu (Gilbert *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2011).



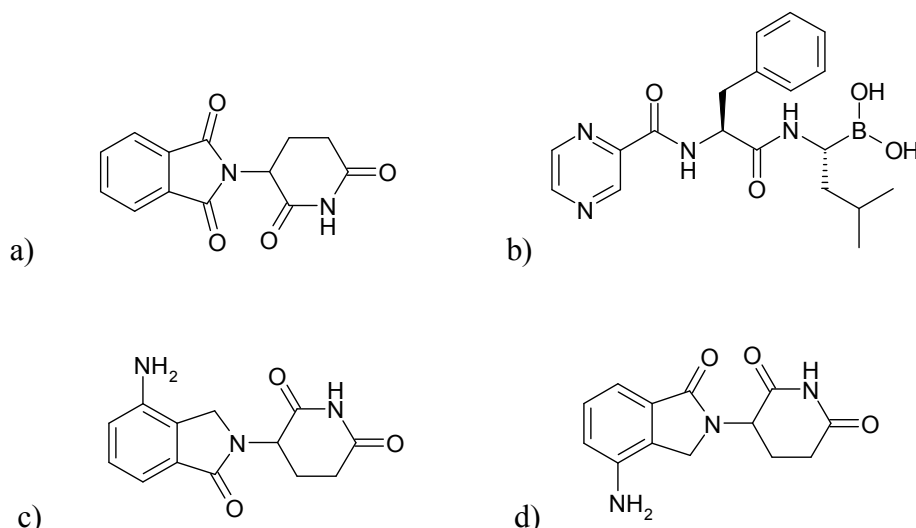
Obr. 1: Porovnání zdravé kostní tkáně s kostí poškozenou myelomovými buňkami (převzato z Multiple myeloma research foundation, 2011).

2.1.3 Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu

Za účelem diagnostiky mnohočetného myelomu se dělá velké množství laboratorních testů. Tyto testy jsou prováděny ze vzorků krve, moči a aspirátu kostní dřeně. Myelom může být diagnostikován z krevního obrazu spolu se speciálním biochemickým vyšetřením. Při něm se stanovuje koncentrace močoviny, kreatininu, vápenatých iontů, celkové bílkoviny, albuminu a C-reaktivního proteinu (Multiple myeloma research foundation, 2011). Nová kritéria pro vyřčení diagnózy MM vyžadují, aby počet plazmatických buněk v kostní dřeni převyšoval hranici 10 %, a dále pak přítomnost monoklonálního proteinu v séru nebo moči. Doplnujícími testy jsou průkaz hyperkalcémie, renální insuficience, anémie a přítomnost kostních lézí na rentgenu (International myeloma working group, 2003; Rajkumar *et al.*, 2001).

Jelikož se jedná o nádorové onemocnění, léčba mnohočetného myelomu obecně zahrnuje radioterapii, chemoterapii nebo jejich kombinaci a následně transplantaci kostní dřeně. Nejčastěji se provádí alogenní nepříbuzenská transplantace kostní dřeně, která zahrnuje infuzi kmenových buněk dárce, jenž mají nahradit chybějící funkční krvetvorbu. Cílem léčby je omezit rozvoj onemocnění, dosáhnout jejího ústupu, zlepšit kvalitu života a prodloužit přežití (Multiple myeloma research foundation, 2011). Pomocí radioterapie a chemoterapie se zasahují myelomové buňky. Díky tomu dochází k poklesu počtu myelomových buněk a snížení degradace kostní hmoty, jejíž tvorba se obnovuje. Dále se po léčbě ustaluje krvetvorba a stabilizuje obranyschopnost organismu proti infekcím.

Současný vědecký výzkum pro léčbu mnohočetného myelomu se zaměřuje především na vývoj nových látek. Cílem intenzivního studování jsou také inhibitory CDK, které mohou svým působením navodit zastavení buněčného cyklu a transkripce. Výzkum inhibitorů je spojen hlavně s tím, že se navrhuje a testují neustále nové a lepší inhibitory. A také se vyvíjí a hledají účinnější varianty již zavedených inhibitorů CDK. Ačkoli onemocnění mnohočetným myelomem zůstává nevyléčitelné, nedávné pokroky ve výzkumu jsou slibné. Příkladem léčiv zavedených do praktické medicíny (Obr. 2) mohou být thalidomid, bortezomib (Velcade), lenalidomid nebo CC-5013 (Anderson *et al.*, 2003).



Obr. 2: Chemická struktura thalidomidu (a), bortezomibu (b), lenalidomidu (c) a CC-5013 (d).

2.2 Apoptosa

Apoptosu jako děj popsal Carl Vogt již v roce 1842 (Lawen *et al.*, 2003). Termín apoptosa poprvé použili Kerr, Wyllie a Currie v roce 1972 pro buněčnou smrt s typickou morfologií apoptotických buněk (Thomas *et al.*, 2010). Apoptosa byla od začátku identifikována jako rozhodující fyziologický proces z mnoha důvodů; udržuje homeostasu tkání, zachovává velikost buněčné populace, odstraňuje cizorodé a poškozené buňky a má podíl na morfogenezi během embryonálního vývoje. Také se podílí na obraně organismu proti virům a bakteriím. Při poškození buňky způsobené nemocí, virem nebo škodlivými látkami je automaticky navozena buněčná smrt (Elmore *et al.*, 2007).

Přesná regulace apoptosy je nezbytná pro správné fungování organismu a její porucha má proto negativní vliv na organismus (Fadeel *et al.*, 2005). Nadměrná aktivace apoptosy může vést ke vzniku neurodegenerativních onemocnění, např. Parkinsonově chorobě, Alzheimerově chorobě, spinální svalové atrofii nebo AIDS (Lawen *et al.*, 2003). Naopak inhibice apoptosy může vyústit v nádorové onemocnění. Dále může také vést ke vzniku autoimunitních onemocnění jako je diabetes mellitus typu 1 nebo akutní zánět mozku a míchy (Lawen *et al.*, 2003).

Je spojena s biochemickými a fyzikálními změnami, které se týkají cytoplasmy, jádra a plazmatické membrány. Morfologické projevy zahrnují svrštění a ztmavnutí jádra, fragmentaci DNA, kondenzaci chromatinu, zmenšení celé buňky a rozpad

na menší celky ohraničené plazmatickou membránou, tzv. apoptotická tělíska. Ta jsou následně fagocytována okolními makrofágy, které rozpoznávají molekuly na povrchu apoptotických tělísek. Jedná se například o expozici fosfatidylserinu, který se v normální buňce nachází na vnitřní straně plazmatické membrány a při apoptose se přemístí na stranu vnější díky ztrátě aktivity příslušné flipasy (Elmore *et al.*, 2007). Apoptotické buňky jsou na rozdíl od nekrosy degradovány, aniž by ovlivňovaly sousední buňky. U nekrosy dochází k uvolnění celého obsahu buňky včetně enzymů do okolí, což je příčinou poškození okolních buněk s následným vznikem zánětu (Lawen *et al.*, 2003).

Apoptosa je koordinovaný a často energeticky vysoce závislý proces. Podstatou je aktivace skupiny cysteinových proteas tzv. "kaspas" (Elmore *et al.*, 2007). Jedná se o enzymy, které štěpí peptidovou vazbu specificky za aspartátem (Riedl *et al.*, 2004). V dnešní době je známo 13 druhů kaspas u člověka, ale ne všechny se podílejí na apoptose. Kaspasy, které se účastní buněčné smrti, nazýváme iniciační a exekutorové. Iniciační kaspasy 2, 8, 9 a 10 se vyskytují na začátku kaskády a podílí se na přenosu signálu a aktivačním štěpení exekutorových kaspas 3, 6 a 7 (Rastogi *et al.*, 2009). Ty poté proteolyticky štěpí tzv. substráty smrti, mezi které patří proteiny řídící opravu DNA, proteiny cytoskeletu nebo antiapoptotické proteiny, a tím zajistí vlastní průběh apoptosy (Taylor *et al.*, 2008).

2.2.1 Vnější apoptotická dráha

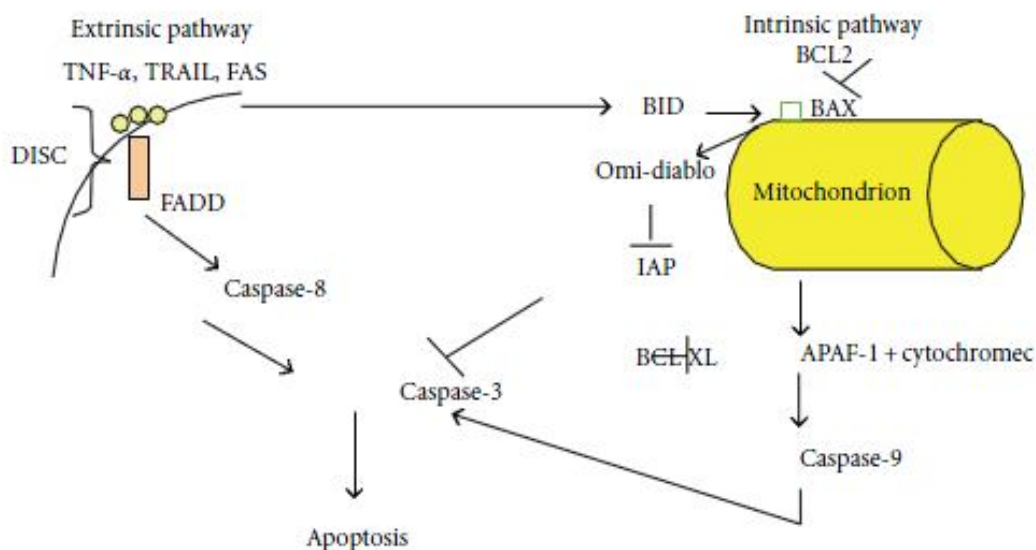
Existují dvě hlavní apoptotické dráhy; vnější (receptorová) signální dráha a vnitřní (mitochondriální) dráha (Obr. 3). Obě tyto signální dráhy jsou propojeny a molekuly jedné dráhy mohou aktivovat komponenty dráhy druhé a vzájemně se doplňovat. Aktivace vnější dráhy začíná navázáním ligandu TNF (tumor necrosis factor) nebo Fas ligandu na transmembránové receptory v cytoplazmatické membráně, tzv. "receptory smrti". Jedná se o TNF receptory (TNFR, tumor necrosis factor receptor), skupinu, které sdílí podobné cysteinové extracelulární domény (tvořené 157 aminokyselinami) a mají cytoplazmatické domény nazvané „domény smrti“. Jedná se o domény, které hrají klíčovou roli při předávání signálu z buněčného povrchu do nitra buňky. Po vazbě Fas ligandu na Fas receptor se vytvoří komplex DISC (the death inducing signalling complex). Skládá se z adaptorové molekuly FADD (Fas-associated protein with death domain), trimerizovaných receptorů smrti a prokaspasy 8 a 10.

V tomto komplexu dochází k autokatalytické aktivaci iniciačních kaspas 8 a 10 (Lawen *et al.*, 2003). Kaspasa 8 je iniciační a následně může aktivovat kaspasy exekutorové, které štěpí buněčné komponenty (Elmore *et al.*, 2007). Po aktivaci kaspas, dochází k degradaci konkrétních substrátů, stavebních kamenů (cytoskelet, DNA, atd.), ze kterých je buňka složena (Lawen *et al.*, 2003). Vznikají apoptotická tělíska, která jsou následně fagocytována.

2.2.2 Vnitřní dráha

Vnitřní nebo také mitochondriální dráha je aktivována extracelulárními a také řadou intracelulárních signálů. Mezi vnější signály patří například přítomnost volných radikálů, ischemie nebo zvýšená koncentrace vápníku. Vnitřní apoptotické signály jsou například jedy v buňce, oxidativní stres, aktivace onkogenů nebo poškozená DNA (Ficková *et al.*, 2007). Proapoptotický protein Bid (BH3 interacting-domain death agonist) tvoří spojení mezi vnější a vnitřní dráhou. Jeho aktivní forma tBid (truncated Bid) vzniká až proteolytickým štěpením, které je zprostředkováno kaspasou 8. Protein tBid se přemístí do mitochondrie, což způsobí ztrátu její funkce, vylití apoptotických proteinů a formování apoptosomu (Gross a kol., 1999; Jin a El-Deiry, 2005).

Rodina Bcl-2 proteinů je jedním z klíčových prvků vnitřní signální dráhy, protože má vliv na permeabilitu vnější membrány mitochondrií (Youle *et al.*, 2008). Oligomerizované proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny Bax (Bcl-2 associated protein X) a Bid jsou schopny tvořit ložiska na vnější membráně mitochondrií, což vede k tvorbě pórů, které umožní uvolnění cytochromu *c* z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytoplasmy. Cytochrom *c* se váže na protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) a pro-kaspasu 9 a z tohoto komplexu vzniká apoptosom. Ten zajišťuje autokatalytickou aktivaci prokaspasy 9 za vzniku volné kaspasy 9. Následuje aktivace exekutorových kaspas (Hao *et al.*, 2005) a vznik apoptotických tělísek.



Obr. 3: Vnější a vnitřní cesta aktivace apoptozy (převzato z Tzifi *et al.*, 2012)

2.3 Antiapoptotické proteiny

Geneticky nestabilní myelomové buňky jsou rezistentní k apoptotickým signálům. Vysoká exprese antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (např. Mcl-1, Bcl-2), se jeví také jako jeden z důležitých faktorů získání apoptotické rezistence buněk mnohočetného myelomu (Ong *et al.*, 1995; Puthier *et al.*, 1999; Miguel-Garcia *et al.*, 1998). V nádorových buňkách je jejich hladina velmi vysoká a to jim poskytuje určitou existenční výhodu oproti buňkám normálně proliferujícím.

Jedná se především o proteiny rodiny Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L a další) a dále také XIAP. Poločasy rozpadu těchto proteinů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). Bcl-2 rodina je skupina proteinů, jejichž úloha spočívá v regulaci mitochondriální integrity. Tyto proteiny jsou schopné regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány, což je důležitý krok v průběhu programované buněčné smrti. Mohou také působit jako klíčové faktory v buněčné proliferaci, diferenciaci a tumorigenezi a hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu (Craig *et al.*, 2002).

Tab. 1: Poločasy rozpadu antiapoptotických proteinů Bcl-2, Mcl-1 a XIAP ([1] Blagosklonny *et al.*, 1996; [2] Maurer *et al.*, 2006; [3] McNeish *et al.*, 2005; [4] Merino *et al.*, 1994; [5] Moulding *et al.*, 2001; [6] Rosato *et al.*, 2004).

Protein	Poločasy rozpadu [hod]	
	Protein	mRNA
Bcl-2 ^[1, 4]	10-24	2,5-4
Mcl-1 ^[2, 5]	<1	2,5
XIAP ^[3, 6]	6,5	3-5

V současné době je známo 20 členů Bcl-2 rodiny, která obsahuje proapoptotické i antiapoptotické proteiny (Thomas *et al.*, 2010), jenž sdílí shodnou sekvenci uvnitř Bcl-2 homologních domén (BH; Green *et al.*, 2007).

Antiapoptotické proteiny tvoří s proapoptotickými Bax, Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) a Bok (Bcl-2 related ovarian killer) heterodimery. Hydrofobní žlábek na povrchu antiapoptotických proteinů tvořený BH1, BH2 a BH3 doménami nekovalentně interaguje s BH3 doménou proapoptotických Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bak a Bim. Vznik heterodimerů antiapoptotických proteinů s proapoptotickými brání Bax, Bak a Bok oligomerizovat a vytvářet ve vnější membráně mitochondrie póry. Dojde k zamezení jejich funkce a následnému bloku apoptosy (Zha *et al.*, 1996). Bcl-2 rodina reprezentuje novou třídu protoonkogenů. Poruchy regulace exprese a funkce proteinů Bcl-2 rodiny jsou zapojeny v tumorigenezi a řadě dalších onemocnění (Vaux *et al.* 1988).

Mcl-1 je antiapoptotický člen rodiny Bcl-2. Od ostatních příbuzných proteinů se liší větším počtem aminokyselinových reziduí (350), ve srovnání s Bcl-2, který má 239 reziduí a Bcl-X_L, jenž má 233 aminokyselinových reziduí (Thomas *et al.*, 2010). Protein Mcl-1 má podobnou strukturu jako příbuzné proteiny, na svém povrchu má hydrofobní kapsu, do které se váží další proteiny s BH3 doménou (Thomas *et al.*, 2010). Mcl-1 je lokalizován v různých buněčných membránách, včetně membrán jádra, endoplazmatického retikula a mitochondrií (Akgul *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1995).

Mcl-1 je zapotřebí pro vývoj B a T lymfocytů (Opferman *et al.*, 2003). Bylo také prokázáno, že hraje zásadní roli v regulaci apoptosy makrofágů a neutrofilů (Edwards *et al.*, 2004; Steimer *et al.*, 2009) a je nezbytný pro přežití krvetvorných kmenových buněk (Opferman *et al.*, 2005) a synoviálních fibroblastů (Liu *et al.*, 2005).

Mcl-1 blokuje navození apoptosy tím, že váže a izoluje proapoptotické proteiny Bak a Bax. Tím dojde k zamezení jejich schopnosti tvořit póry v mitochondriální

membráně, uvolnění cytochromu *c* do cytoplasmy buněk a následně spuštění apoptosy. Antiapoptotický protein Mcl-1 je vysoce exprimován v řadě nádorových buněk, ale v normálních buňkách se vyskytuje málo nebo vůbec (Bettayeb *et al.*, 2010). Mcl-1 je protein s velmi krátkým poločasem rozpadu (30 minut, Maurer *et al.*, 2006; Moulding *et al.*, 2001). Zvýšení hladin deubiquitinasy USP9X a následná stabilizace Mcl-1, mají za následek abnormálně vysoké hladiny Mcl-1, které hojně přispívají k přežití nádorových buněk (Schwickart *et al.*, 2010). Vysoká exprese Mcl-1 byla zaznamenána u několika hematologických malignit a solidních nádorů, včetně chronické myeloidní leukémie a hepatocelulárního karcinomu (Thomas *et al.*, 2010). Nadměrná exprese Mcl-1 u transgenních myší vede k výrazně zvýšenému výskytu B-buněčného lymfomu, naopak snížení Mcl-1 je schopno vyvolat apoptosu v řadě typů nádorových buněk (Thomas *et al.*, 2010).

Růstové faktory, které jsou schopny oddálit degradaci Mcl-1, mají tendenci zvýšit buněčnou životaschopnost. Naopak nedostatek růstových faktorů nebo poškození DNA, urychlují odbourávání Mcl-1 a vedou ke snížení životaschopnosti (Thomas *et al.*, 2010). Toto se děje za fyziologických podmínek, kdy je vše v pořádku. Když je buňka nádorově transformovaná na myelomovou, exprimuje antiapoptotické proteiny oproti normálním buňkám ve vysokých hladinách, které jim zajistí přežití i za nepříznivých podmínek.

Existují 3 různé druhy Mcl-1; tzv. full lenght (40 kDa), zkrácená translační varianta na isoleucinu 10 (38 kDa) a zkrácená translační varianta na isoleucinu 33 (36 kDa). Tyto varianty Mcl-1 mají různou mitochondriální lokalizaci. Formy 40 kDa a 38 kDa jsou bohatě zastoupeny ve vnější mitochondriální membráně, zatímco 36kDa forma je spojena s vnitřní membránou a vztahuje se k mitochondriální matrix (Perciavalle *et al.*, 2012).

Antiapoptotický protein XIAP je endogenní inhibitor kaspas, který je exprimován u řady rakovin. Tento protein obsahuje tři BIR (baculoviral IAP repeat) domény. BIR2 doména je zodpovědná za navázání a inhibici aktivity kaspas 3 a 7, zatímco vazba BIR3 doménou potlačuje aktivitu kaspasy 9 (Deveraux *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1998). Hladina proteinu XIAP je zvýšena u mnoha akutních a chronických leukémií, rakoviny prostaty, plic a řady dalších nádorových onemocnění (Schimmer *et al.*, 2004).

2.4 Cyklin-dependentní kinasy (CDK)

Cyklin-dependentní kinasy jsou serin/threoninové proteinkinasy, které hrají důležitou roli především v regulaci buněčného cyklu a účastní se také regulace transkripce (Gao *et al.*, 2006). CDK byly rozsáhle studovány z důvodů jejich klíčových funkcí v základních buněčných procesech, jako je regulace buněčné smrti či apoptosa (Malumbres *et al.*, 2009a; Malumbres *et al.*, 2009b).

Během buněčného dělení jsou CDK přítomny po celou dobu cyklu, ale stávají se aktivními až po navázání své specifické podjednotky, tzv. cyklinu. Následně fosforylují cílové proteiny v buňce a ty poté iniciují jednotlivé kroky buněčného cyklu. Hladina všech cyklinů kolísá během buněčného cyklu, kdy v určitých fázích dochází k expresi různých cyklinů. Jakmile hladina některého cyklinu překročí kritickou hranici, spustí se procesy, které buňku nasměrují do konkrétní fáze cyklu. Dále hladina cyklinu klesá a připravuje buňku na nový proces. Poté dochází k ubiquitinylationi a následné degradaci v proteasomu. Cyklin-dependentní kinasy regulující buněčný cyklus jsou CDK1, CDK2, CDK4 pro průchod interfází, CDK6 pro G₁ fázi a CDK6 společně s CDK4 pro G₁/S přechod.

Ačkoli členové rodiny cyklin-dependentních kinas běžně regulují buněčný cyklus, někteří jsou spojeni s regulací transkripce prostřednictvím fosforylace koncové karboxylové domény (CTD, carboxy-terminal domain) RNA polymerasy II (Bregman *et al.*, 2000). Jedná se o CDK7, která fosforyluje Ser5 v C-koncové doméně RNA polymerasy II a je nedílnou součástí transkripčního faktoru TFIIH (Yankulov *et al.*, 1997). To má za následek zahájení transkripce. Další významnou kinasou ovlivňující transkripci je CDK9, která tvoří část elongačního faktoru P-TEFb (Chao *et al.*, 2000; Peterlin *et al.*, 2006). CDK9 fosforyluje Ser2 v CTD RNA polymerasy II a je nezbytná pro elongaci transkriptu (Chen *et al.*, 2009).

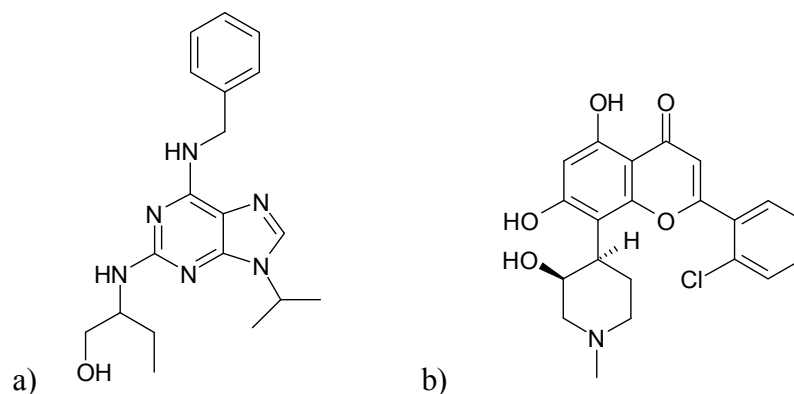
Řada nepravidelností v regulaci buněčného cyklu byla pozorována u různých typů nádorových onemocnění (Nurse *et al.*, 2000). Toto je důvod intenzivního studování CDK a také toho, že se staly cílem vývoje jejich inhibitorů.

2.5 Inhibitory cyklin-dependentních kinas

Jedná se o malé molekuly schopné pomocí inhibice CDK zastavit buněčný cyklus a transkripci a tím vyvolat apoptosu v nádorových buňkách. Hlavním mechanismem inhibice je kompetice s přirozeným CDK substrátem adenosintrifosfátem (ATP) o aktivní místo na kinase. Bylo popsáno více než 140 inhibitorů cyklin-dependentních kinas (Galons *et al.*, 2009; Malumbres *et al.*, 2008). Mezi inhibitory 1. generace intenzivně studované na konci 20. století řadíme především olomoucín, roskovitin nebo flavopiridol, do druhé generace CDK inhibitorů pak řadíme např. P276-00, SNS-032, AT7519, CR8. Některé inhibitory mají preferenci pro CDK9, což je rozhodující enzym stimulující elongaci transkripce většiny genů, které kódují proteiny. Tyto inhibitory byly testovány na buňkách mnohočetného myelomu a jsou schopny interagovat s CDK9 a CDK7 a tím zabránit fosforylaci RNA polymerasy II na Ser2 a Ser5. To se projevuje inhibicí transkripce a následným snížením hladiny mRNA u antiapoptotických proteinů s krátkým poločasem rozpadu, což vede až k apoptose (Bettayeb *et al.*, 2010).

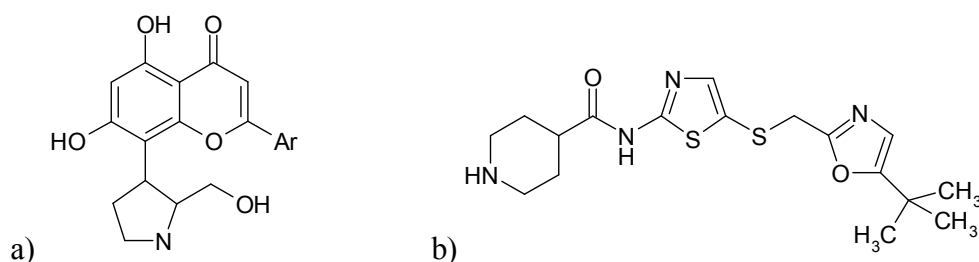
Roskovitin (Obr. 4) je protinádorové léčivo, které je odvozeno od rostlinných hormonů zvaných cytokininy. Strukturně se jedná o 2,6,9-trisubstituovaný analog purinu. Vykazuje inhibiční aktivitu proti CDK1, CDK2, CDK7 a CDK9, a proto je označován jako pan-selektivní CDK inhibitor (Jorda *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že roskovitin navozuje buněčnou smrt v buňkách mnohočetného myelomu narušením rovnováhy mezi přežitím buněk a apoptosou prostřednictvím inhibice transkripce a snížením hladiny Mcl-1 (MacCallum *et al.*, 2005).

Flavopiridol (Obr. 4) je polysyntetický flavonoid získaný z indické rostliny *Dysoxylum binectariferum* (Sedláček *et al.*, 2001), který inhibuje buněčný cyklus na rozhraní G₁/S s G₂/M. Flavopiridol snižuje transkripci pomocí inhibice CDK9 a CDK7 podobně jako roskovitin, jedná se však o jeden z nejúčinnějších známých inhibitorů CDK9 (Chen *et al.*, 2005).



Obr. 4: Chemická struktura roskovitinu (a) a flavopiridolu (b).

P276-00 (Obr. 5) také patří mezi pan-selektivní CDK inhibitory s nanomolární aktivitou vůči CDK9 (Manohar *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012). CDK inhibitor SNS-032 (Obr. 5) je silný a selektivní inhibitor aktivity CDK2, CDK7 a CDK9 (Chen *et al.*, 2009; Conroy *et al.*, 2009) a v porovnání s flavopiridolem a roskovitinem má větší účinek na inhibici syntézy RNA a navození apoptosy (Chen *et al.*, 2009).

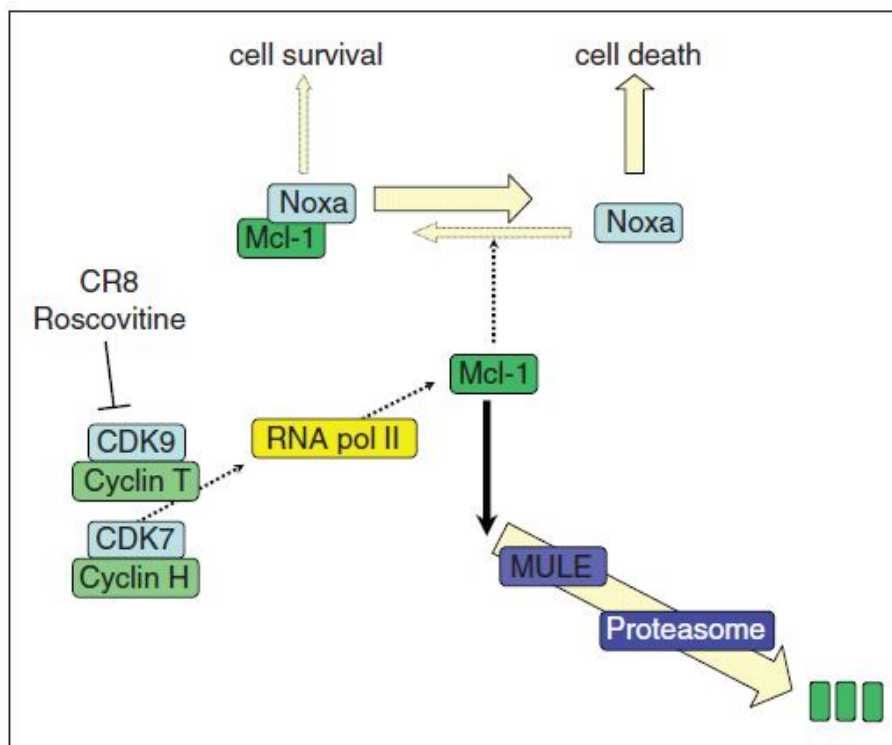


Obr. 5: Chemická struktura P276-00 (a) a SNS-032 (b).

Dlouhotrvající inhibice CDK7 a CDK9 může nakonec vést k úplnému zastavení transkripce, která se projeví poklesem transkriptů, ale zároveň i proteinů. Bezprostřední efekt bude pozorovatelný na transkriptech a proteinech s krátkým poločasem rozpadu, jako jsou například antiapoptotické proteiny Mcl-1 a XIAP (Lam *et al.*, 2001).

Na obrázku 6 (Obr. 6) je popsán předpokládaný mechanismus působení inhibitorů cyklin-dependentních kinas CR8 a roskovitinu v buňkách neuroblastomu. CDK inhibitory interagují s CDK7 a CDK9 a zabráňují fosforylaci RNA polymerasy II na Ser2 a Ser5. Tím dochází k inhibici transkripce a to vede ke snížení hladiny mRNA a proteinů s krátkým poločasem rozpadu (např. Mcl-1). Antiapoptotický protein Mcl-1 je následně označen Mcl-1 ubiquitin ligasou [MULE] a degradován pomocí proteasomu.

Na základě určitých strukturních motivů byly vyvinuty nové CDK inhibitory 1741 a 1742, u kterých se očekává podobný účinek jako v případě inhibitoru CR8.



Obr. 6: Předpokládaný mechanismus působení CDK inhibitorů CR8 a roskovitin v buňkách neuroblastomu (převzato z Bettayeb et al., 2010).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. MATERIÁL

3.1 Přístrojové vybavení

V bakalářské práci bylo použito následující přístrojové vybavení: termocycler TC-512 (Techne), spektrofotometr Synergy H4 Hybrid reader (Bio-Tek), elektroforetická vana (Biometra), scanner FLA-7000 (Fujifilm), centrifuga BR4i (Jouan), váhy 440-33N (Kern), magnetické míchadlo MR-1000 Hei-Mix S (Heidolph), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO₂ inkubátor (Sanyo), vodní lázeň, třepačka Reax top (Heidolph), odstředivka MPW 15 (Med-instruments), třepačka s kývavým pohybem Mini Rocket MR-1 (BioSan), malá centrifuga EPP 5702 (Eppendorf), elektroforetický zdroj EC 105 (E-C Aparatus Corporation), termostat MBT 250 (Kleinfelo labortechnik), kamera LAS-4000 (Fujifilm), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), mikroskop TMS (Nikon), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad).

3.2 Použité chemikálie

Při zpracování experimentální části byly využity chemikálie od firmy Sigma-Aldrich (DirectLoadTM wide range DNA marker (50 bp - 10 kbp, kat. č: D7058), *Taq* DNA polymerase, 10x PCR buffer, 25 mM roztok MgCl₂, kultivační médium RPMI 1640, aprotinin, peroxodisíran amonný, bromfenolová modř, hovězí sérový albumin (BSA), dimethylsulfoxide (DMSO), dithiothreitol (DTT), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), leupeptin, N,N'-metylenbisakrylamid, penicilin/streptomycin, tetramethylethylendiamin, trypsin, ethidium bromid, Nonidet P-40, Ponceau S, ammonium persulfate (APS), kyselina boritá, glutamin, pyruvát, glukosa, kyselina octová). Fermentas (set nukleotidů dNTPs: dGTP, dATP, dCTP a dTTP, každý 2,5 mM). Takara (1st strand cDNA Synthesis Kit), Invitrogen (fetální sérum), MP Biomedicals (kyselina chlorovodíková, glycerol, chlorid draselný, fluorid sodný, laurylsíran sodný (SDS), akrylamid, glycin, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Tween 20), Penta (ethanol, kyselina fosforečná, chlorid sodný, Na₂HPO₄·12H₂O), Serva (2-merkptoethanol) a Qiagen (RNeasy Mini kit). Thermo Scientific (chemiluminiscenční kit ECL, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate).

Dále byly použity primery od firmy KRD o následujících sekvencích:

Mcl-1 F: 5'- GGT GGC ATC AGG AATGT – 3'

Mcl-1 R: 5'- ATC AAT GGG GAG CAC T – 3'

28S rRNA F: 5'- AAG CAG GAG GTG TCA GAA A -3'

28S rRNA R: 5'- GTA AAA CTA ACC TGT CTC ACG – 3'

XIAP F: 5' - TGG GAC ATG GAT ATA CTC AGT TAA CAA – 3'

XIAP R: 5' – GTT AGC CCT CCT CCA CAG TGA A – 3'

Bcl-2 F: 5' - TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC – 3'

Bcl-2 R: 5' - TGC ATA TTT GTT TGG GGC AGG – 3'

3.3 Použité roztoky

V bakalářské práci byly použity následující roztoky:

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,4 – 7,5), TBS (137 mM NaCl, 20 mM TRIS, pH=6,8), RIPA pufr (20 mM TRIS pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 pH = 7,4), 5x vzorkovací pufr (0,3 M TRIS pH = 6,8, 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol), elektroforetický pufr (25 mM TRIS, 192 mM glycín, 0,1% SDS), blotovací pufr (25 mM TRIS, 192 mM glycín), blokovací roztoky: 5% nízkotučné sušené mléko v PBS s 0,1% Tween 20 a 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20, 6x koncentrovaný nanášecí pufr, TBE pufr (89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA), 1% agarosa v TBE, akrylamid:bisakrylamid (37,5:1), 1M TRIS pH 8,8, 1M TRIS pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, 0,2% Ponceau S v 1% CH₃COOH, leupeptin (1 µg/ml), aprotinin (1 µg/ml), chemiluminiscenční kit ECL (luminol:peroxid, 1:1).

3.4 Použité protilátky

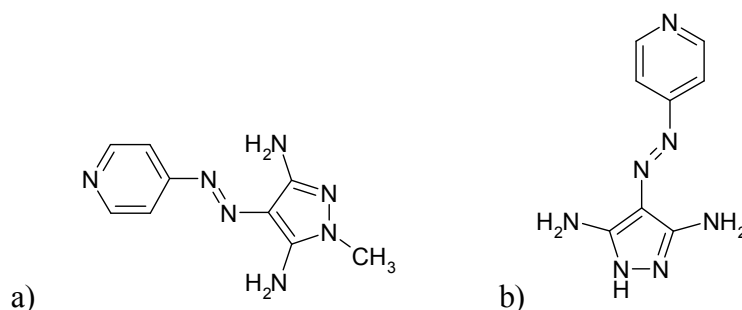
Pro detekci studovaných proteinů byly užity protilátky (Tab. 2) od firmy Cell Signaling (XIAP), Santa Cruz (Mcl-1, klon S-19; β-aktin, klon C-4), Calbiochem (Bcl-2, klon Ab-2) a Sigma Aldrich (sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou).

Tab. 2: Ředění, zdroj a hmota proteinu primárních protilátek.

Protilátka	Ředění	Zdroj	Hmota proteinu [kDa]
XIAP	1:1000	Cell Signalling	53
Mcl-1	1:200	Santa Cruz	40
β-aktin	1:1000	Santa Cruz	42
Bcl-2	1:50	Calbiochem	26

3.5 Použité inhibitory

V experimentální části byly testovány biologické účinky dvou vybraných sloučenin vycházejících ze série 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazolů (Obr. 7; Kryštof *et al.*, 2006) z kolekce Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.. Tyto inhibitory byly připraveny RNDr. Petrem Cánkařem, Ph.D. z Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Oba arylazopyrazoly vykazují selektivitu vůči cyklin-dependentním kinasám (nepublikovaná data) včetně CDK9 a liší se navzájem rozdílnou preferencí vůči CDK4/6.



Obr. 7: Chemická struktura látek 1741 (a) a 1742 (b).

3.6 Buněčná linie

Experimenty byly provedeny s buněčnou linií RPMI-8226 odvozenou od mnohočetného myelomu (Moore *et al.*, 1968). Nádorové buňky byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 (RPMI, 15% fetální sérum, L-glutamin (0,3 mg/ml), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (0,1 mg/ml), 1% pyruvát) v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Veškerá práce s buňkami byla sterilní a probíhala ve flow-boxu. Buněčná linie RPMI-8226 byla komerčně koupena z The Global Bioresource Center (ATCC).

4. METODY

4.1 Ovlivnění a sklizení ovlivněných buněk

Buňky linie RPMI-8226 byly sklizeny, jejich počet byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky a poté bylo rozpipetováno po 2 milionech buněk v 10 ml média na každou kultivační misku ($\varnothing$ 60,1 cm²). Látky LGR 1741 a 1742 byly přidány do média ihned ve zvolených koncentracích a působily po dobu 24 hodin. Poté byly jednotlivé misky sklizeny, vzorky zcentrifugovány při 4 °C, 1000 g po dobu 5 minut, jednou promyty PBS a pelety uchovány při -80 °C. Lyzování buněk bylo provedeno v RIPA pufru. Další zpracování vzorků se lišilo podle toho, zda byly určeny pro analýzu hladiny proteinů či RNA.

4.2 Izolace celkové RNA, reverzní transkripce

Izolace celkové RNA byla provedena pomocí kitu RNeasy Mini kit od firmy Qiagen přesně podle instrukcí výrobce. Koncentrace celkové RNA v jednotlivých vzorcích byla změřena pomocí spektrofotometru Synergy H4 Hybrid Reader. Dále byla provedena reverzní transkripce pomocí kitu 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara). Reverzní transkripce byla provedena v termocycleru při teplotě 42 °C po dobu 60 min s následnou inaktivací enzymu při 95 °C po dobu 5 minut. Výsledná koncentrace cDNA byla změřena na spektrofotometru Synergy H4 Hybrid Reader.

4.3 Polymerázová řetězová reakce, DNA elektroforéza

Polymerázová řetězová reakce byla provedena v gradientovém termocycleru (Techne). Vstupní množství cDNA v reakci odpovídalo 2 µg cDNA. Celkový objem reakce byl 50 µl. Teplotní profil reakce je uveden v tabulce (Tab. 3). Počet cyklů byl 35.

Tab. 3: Teplotní profil PCR reakce.

Fáze	Teplota [°C]	Čas
Počáteční denaturace	94	5 min
Denaturace	94	40 s
Annealing	48	30 s
Extenze	72	90 s
Finální extenze	72	5 min

Pro detekci PCR produktu byl připraven 1% agarosový gel. Vzorky byly smíchány s 6x koncentrovaným nanášecím pufrem (30% glycerol, 0,25% bromfenolová modř) a naneseny na gel. Byla provedena separace po dobu 1 hodiny při 80 V. Produkty polymerázové řetězové reakce byly v gelu vizualizovány pomocí analyzátoru FLA-7000 a výsledky analyzovány v programu MultiGauge®.

4.4 SDS-PAGE, western blotting

Vzorky určené pro analýzu hladiny proteinů byly ultrazvukovány, zcentrifugovány (14 000 rpm, 4 °C, 25 min) a koncentrace proteinů v supernatantu byla stanovena dle Bradfordové (Bradford, 1976) spektrofotometricky při 595 nM. Ke vzorkům byl přidán 5x SDS nanášecí pufr a proteiny ve vzorku byly denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C. Elektroforéza proteinů z ovlivněných vzorků byla provedena polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným za denaturujících podmínek. Byl použit 10% dělicí gel a 5% zaostřovací gel. Separace probíhala nejdříve při 80-90 V po dobu 30 minut, poté při 120-150 V 1 – 1,5 hodiny. Po ukončení separace byly proteiny z dělicího gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Biorad) metodou western blottingu při konstantním proudu 270 mA po dobu 2 hodin za neustálého chlazení. Nablotovaná membrána byla obarvena v roztoku Ponceau S po dobu 5 minut.

4.5 Imunodetekce na membráně

Membrána byla odbarvena a následně blokována v 5% roztoku mléka v PBS s 0,1% Tweenem 20 nebo 3% roztoku BSA v TBS s 0,1% Tweenem 20, ve kterém byla blokována 1 hodinu. Imunodetekce proteinů byla provedena pomocí specifických protilátek. Na membránu byly nejprve naneseny roztoky primární protilátky v příslušném ředění (Tab. 2). Protilátky byly inkubovány přes noc v lednici (4 °C). Po inkubaci byly membrány střídavě opláchnuty v TBS a TBS-T a poté na ně byly naneseny sekundární protilátky na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly membrány opět střídavě opláchnuty v TBS a TBS-T. Vizualizace proteinů byla provedena za použití chemiluminiscenčního kitu ECL a analyzátoru LAS-400 (Fujifilm).

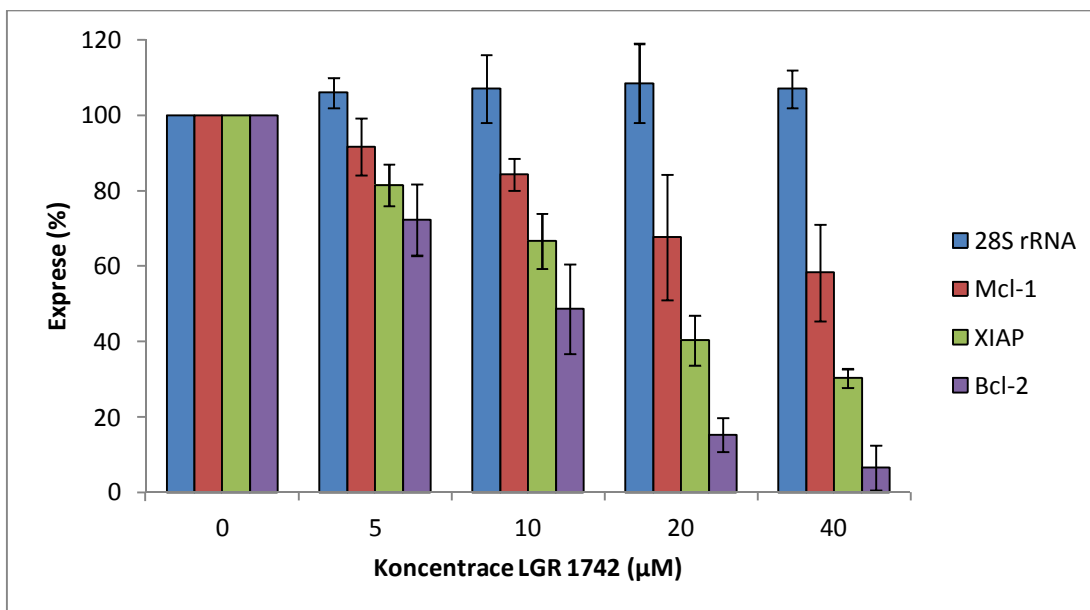
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza hladiny transkriptů pomocí RT-PCR

Praktická část bakalářské práce byla zaměřena na sledování hladiny vybraných transkriptů pomocí RT-PCR po ovlivnění buněčné linie RPMI-8226 azopyrazolem LGR 1742 (Obr. 8). Po 24 hodinovém ovlivnění buněk zvyšující se koncentrací látky 1742 byl pozorován pokles hladiny mRNA pro Mcl-1, XIAP a Bcl-2. Největší pozornost byla soustředěna na hladinu transkriptů Mcl-1, jelikož jeho pokles je spojován s navozením apoptosy buněk mnohočetného myelomu (Derenne *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002) a je předmětem zájmu mnoha dalších studií s CDK inhibitory, které jeho pokles zprostředkovávají prostřednictvím inhibice transkripce přes CDK9 (Bettayeb *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; Conroy *et al.*, 2009; Manohar *et al.*, 2011).

V ovlivněných buňkách došlo ke snížení hladiny všech pozorovaných transkriptů. Největší pokles byl pozorován u Bcl-2, kde došlo ke snížení o 90 % při použití nejvyšší koncentrace 1742. Hladiny transkriptů XIAP a Mcl-1 klesaly postupně se vzrůstající koncentrací použitého inhibitoru a hladina Mcl-1 byla snížena při nejvyšší koncentraci 1742 o 40 % oproti kontrole.

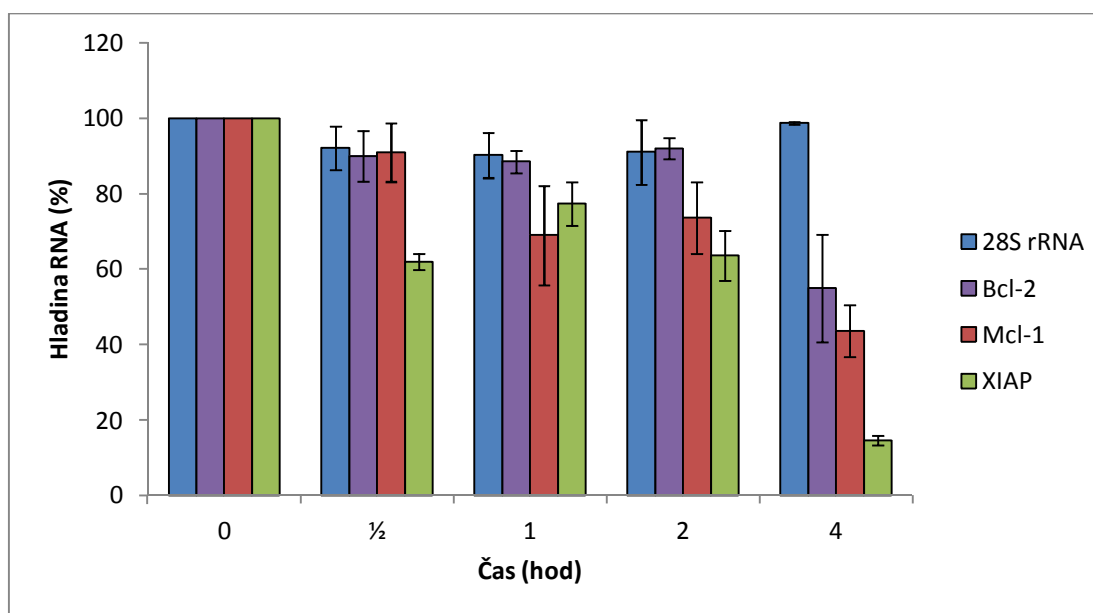
Tyto výsledky se neshodovaly s předpokladem, kdy dle stability měla se zvyšující se koncentrací klesat nejvíce hladina transkriptů u Mcl-1 díky jeho krátkému poločasu rozpadu (2,5 hodiny; Maurer *et al.*, 2006; Moulding *et al.*, 2001). Hladiny transkriptů Bcl-2 s poločasem rozpadu mRNA 2,5-4 hodiny (Blagosklonny *et al.*, 1996; Merino *et al.*, 1994) a XIAP s poločasem rozpadu 3-5 hodin (Rosato *et al.*, 2004) měly klesat podobně. Výsledky naopak korelují s hodnotami, které byly sledovány v podobném experimentu s inhibitorem CDK SNS-032 (Chen *et al.*, 2009), kdy hladina transkriptů Mcl-1 klesla méně než hladina mRNA u Bcl-2 a XIAP. SNS-032 je silný inhibitor CDK9 a CDK7 a blokuje transkripci, která umožňuje fosforylaci RNA polymerasy II. To úzce souvisí s poklesem hladin transkriptů u Mcl-1 a XIAP.



Obr. 8: Hladiny transkriptů vybraných proteinů v buněčné linii RPMI-8226 ovlivněných látkou 1742 v různých koncentracích po dobu 24 hodin. Hladina 28S rRNA byla použita jako interní standard.

V dalším experimentu byla látka 1742 testována na buněčné linii RPMI-8226 v různých časových intervalech a to při koncentraci 20 µM (Obr. 9). V různých časových intervalech se snižovala hladina transkriptů Mcl-1 až na konečných 50 % po 4 hodinách. Byl pozorován pokles také u XIAP a to o 40 % již po 30 minutách po přidání inhibitoru k buňkám. Po 4 hodinách pak došlo k poklesu až o 80 % kontrolní hladiny. Hladina transkriptů u Bcl-2 se snížila po 2 hodinách pouze o 10 %, k výraznějšímu poklesu o 40 % došlo až po 4 hodinách.

Naměřené hodnoty se výrazně nelišily od předpokládaných výsledků, kdy k nejrychlejšímu poklesu hladiny transkriptů mělo podle poločasů rozpadu dojít u Mcl-1, dále potom u Bcl-2 a XIAP. Zjištěné výsledky v porovnání s hodnotami, které byly sledovány v podobném experimentu s flavopiridolem (Chen *et al.*, 2005), vyšly nepatrně odlišně. V časovém intervalu nejrychleji klesala hladina transkriptů Bcl-2 a dále již pomaleji hladina u Mcl-1 a XIAP. Inhibice transkripce pomocí flavopiridolu je řízena vnitřní stabilitou jednotlivých transkriptů. Některé specifické motivy v sekvenci mRNA mohou tvořit signály pro rychlou degradaci. AREs (adenylate/uridylate-rich elements) na 3' netranslatovaném úseku mnoha mRNA označují tyto mRNA pro rychlou a selektivní degradaci. ARE motivy v Mcl-1 a Bcl-2 transkriptech mohou vysvětlit jejich krátké poločasy rozpadu (Chen *et al.*, 2005).

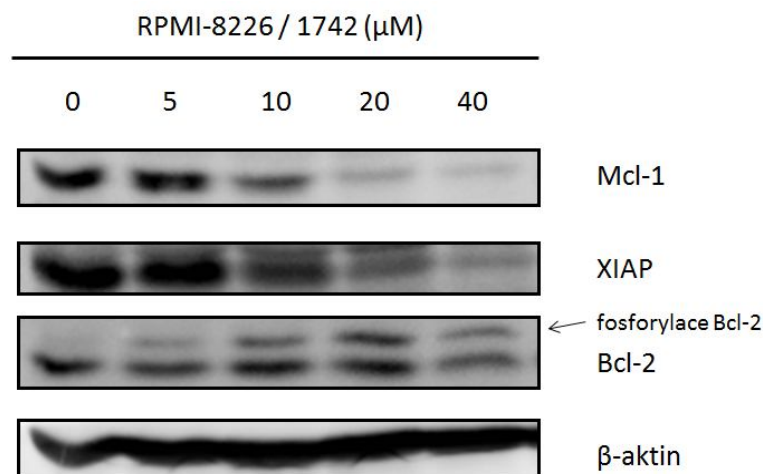


Obr. 9: Hladiny transkriptů vybraných proteinů v buněčné linii RPMI-8226 ovlivněných látkou 1742 (20 μ M) v různých časových intervalech. Hladina 28S rRNA byla použita jako interní standard.

5.2 Analýza hladiny proteinů pomocí SDS PAGE a Western Blot

Dále byla experimentální část zaměřena na sledování hladiny vybraných proteinů pomocí SDS PAGE a Western Blot po ovlivnění buněčné linie RPMI-8226 azopyrazolem 1742 (Obr. 10). Oproti kontrole došlo k rapidnímu poklesu hladiny proteinů u Mcl-1 a XIAP až ve vyšších koncentracích 20 a 40 μ M. Hladina proteinů Bcl-2 se neměnila v průběhu ovlivnění, ale došlo ke změně hladin fosforylace.

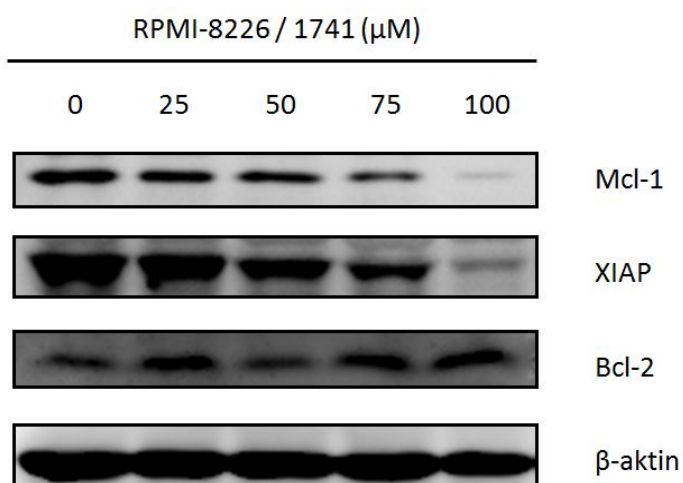
Mcl-1 je antiapoptotický protein s velmi krátkým poločasem rozpadu (30 minut, Maurer *et al.*, 2006; Moulding *et al.*, 2001) díky přítomnosti degradace PEST sekvence a jeho pokles koreluje s defosforylací RNA polymerasy na Ser2. Protein XIAP má o něco delší poločas rozpadu (6,5 hodin; McNeish *et al.*, 2005). U obou byl podle předpokladu pozorován pokles hladiny proteinů se zvyšující se koncentrací látky 1742. Bcl-2 má delší poločas rozpadu (10-24 hodin; Blagosklonny *et al.*, 1996; Merino *et al.*, 1994) a postrádá PEST sekvenci, proto hladina jeho proteinů se dle očekávání v průběhu ovlivnění neměnila. Naměřené výsledky se shodují s publikovanými výsledky, kdy byl použit inhibitor SNS-032 (Chen *et al.*, 2009). V tomto experimentu došlo k výraznému poklesu hladiny proteinů Mcl-1 a XIAP se zvyšující se koncentrací látky. Naopak nebyla pozorována žádná změna hladiny proteinů u Bcl-2.



Obr. 10: Expresa vybraných proteinů v buněčné linii RPMI-8226 ovlivněných látkou 1742 v různých koncentracích. β -aktin byl zvolen pro kontrolu rovnoměrného nanášení proteinu.

Dále byl zkoumán také vliv látky LGR 1741 na hladinu proteinů v buněčné linii RPMI-8226 (Obr. 11). Podobně jako u 1742 byl pozorován se zvyšující se koncentrací látky postupný pokles hladiny proteinů Mcl-1 a XIAP, kdy k největšímu snížení došlo až při nejvyšší koncentraci 100 μM . Hladina proteinu Bcl-2 se téměř neměnila, protože Bcl-2 má delší poločas rozpadu, jak již bylo výše komentováno.

Výsledky jasně dokumentují, že azopyrazol 1741 působí podobným účinkem jako látka 1742, nicméně vykazuje nižší účinnost, pravděpodobně díky rozdílné selektivitě vůči některým cyklin-dependentním kinasám.



Obr. 11: Expresa vybraných proteinů v buněčné linii RPMI-8226 ovlivněné látkou 1741 v různých koncentracích. β -aktin byl zvolen pro kontrolu rovnoměrného nanášení proteinu.

6. ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit působení dvou arylazopyrazolů, CDK inhibitorů s preferencí k transkripční CDK9, v buňkách mnohočetného myelomu. Konkrétně byly sledovány hladiny transkriptů a proteinů u mitochondriálních antiapoptotických proteinů s rychlým poločasem rozpadu (Bcl-2, Mcl-1 a XIAP) v ovlivněných buňkách v závislosti na koncentraci látky a čase působení pomocí analýzy RT-PCR a imunoblotu.

Po ovlivnění buněk látkou 1742 ve zvyšujících se koncentracích došlo k největšímu poklesu hladiny transkriptů u Bcl-2, dále pak u XIAP a Mcl-1. V různých časových intervalech byl po ovlivnění stejnou látkou pozorován pokles transkriptů u všech sledovaných antiapoptotických proteinů. Inhibice transkripce se projevila poklesem hladiny proteinů u Mcl-1 při koncentraci 20 μ M látky 1742. Mcl-1 je antiapoptotický protein s velmi krátkým poločasem rozpadu (30 minut). Protein XIAP má delší poločas rozpadu než Mcl-1, ale také byl pozorován pokles hladiny proteinů při 20 μ M látky. Další antiapoptotický protein Bcl-2 má delší poločas rozpadu než ostatní sledované proteiny, proto se hladina jeho proteinů neměnila v průběhu ovlivnění. V dalším experimentu byl sledován vliv inhibitoru 1741 na buňky mnohočetného myelomu v různých koncentracích a opět byl pozorován pokles hladiny proteinů podobně jako u látky 1742.

Studium arylazopyrazolů 1741 a 1742 prokázalo, že působí předpokládaným mechanismem (Obr. 6) jako jiné CDK inhibitory (např. CR8 a roskovitin). Tyto inhibitory interagují s CDK9 a CDK7 a tím zabraňují fosforylaci RNA polymerasy II na Ser2 a Ser5. Díky tomu dochází k inhibici transkripce a následnému snížení hladiny mRNA a proteinů s krátkým poločasem rozpadu a dochází tak k navození apoptosy, stěžejnímu procesu při léčbě mnohočetného myelomu a podobných malignit.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	ammonium persulfate
AREs	adenylate/uridylate-rich elements
ATP	adenosine triphosphate
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology domains
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	baculoviral IAP repeat
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BSA	bovine serum albumine
CDK	cyclin-dependent kinase
CTD	carboxy-terminal domain
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DISC	the death inducing signalling complex
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FADD	Fas-associated protein with death domain
GFI1	growth factor independent 1 transcription represor
IL-6	interleukin 6
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MM	multiple myeloma
mRNA	messenger ribonucleic acid

OAF	osteoclast-activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEST	peptide sequence of proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SDS	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serin
TBE	tris/borate/EDTA
tBid	truncated Bid
TBS	tris-buffered saline
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNF α	tumor necrosis factor α
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminomethane
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akgul, C. *et al.* (2000): In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett.* (478), 72–76.

Anderson, K. C. (2003): Multiple myeloma: how far have we come? *Mayo Clinic Proceeding* (78), 15-17.

Bettayeb, K., Baunbek, D., Delehouze, C., Loaec, N., Hole, A. J., Baumli, S., Endicott, J. A., Douc-Rasy, S., Bénard, J., Oumata, N., Galons, H., Meijer, L. (2010): CDK inhibitors roscovitine and CR8 trigger Mcl-I down-regulation and apoptotic cell death in neuroblastoma cells. *Genes & Cancer* I(4), 369-380.

Blagosklonny, M. V., Alvarez, M., Fojo, A., Neckers, L. M. (1996): Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leuk Res.* (20), 101-107.

Bregman, D. B., Pestell, R. G., Kidd, V. J. (2000): Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci* (5), D 244–257.

Conroy, A., Stockett, D. E., Walker, D., Arkin, M. R., Hoch, U., Fox J. A., Hawtin, R. E. (2009): SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemother Pharmacol* (64), 723-732.

Craig, R. W. (2002): MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* (16), 444-454.

D'Souza, S., del Prete, D., Jin, S., Sun, Q., Huston, A. J., Kostov, F. E., Sammut, B., Hong, C. S., Anderson, J.L., Patrene, K. D., Yu, S., Velu, C. S., Xiao, G., Grimes, H. L., Roodman, G. D., Galson, D. L. (2011): Gfi1 expressed in bone marrow stromal cells is a novel osteoblast suppressor in patients with multiple myeloma bone disease. *Blood* (118), 6871-6880.

Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L. *et al.* (2002): Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein in human myeloma cells. *Blood* (100), 194–199.

Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1999): Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* (18), 5242–5251.

Edwards, S. W. *et al.* (2004): Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem. Soc. Trans.* (32), 489–492.

Elmore, S. (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol pathol* (35), 495-516.

Engel, E. (1980): A New Genetic Concept: Uniparental Disomy and Its Potential Effect, Isodisomy. *American Journal of Medical Genetics*. (6), 137-143.

Fadeel, B., Orrenius, S. (2005): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* (258), 479–517.

Ficková, M. a Nagy, M. (2007): Apoptóza – programovaná bunková smrť a rastlinné metabolismy. *Chem. Listy*. (101), 131-137.

Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Davies, F. E., Drach, J., Greipp, P. R., Kirsch, I. R., Kuehl, W. M., Hernandez, J. M., Minvielle, S., Pilarski, L. M., Shaughnessy, J. D. Jr., Stewart, A. K. a Avet-Loiseau, H. (2004): Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* (64), 1546-1558.

Galons, H., Oumata, N., Meijer, L. (2009): Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin Ther Patents* (20), 377-404.

Gao, N., Kramer, L., Mohamed, R., Dent, P., Grant, S. (2006): The three-substituted inuline cyclin-dependent kinase 2 inhibitor 3-[1-(3*H*-Imidazol-4-yl)-meth-(*Z*)-ylidene]-5-methoxy-1,3-dihydro-indol-2-one (SU9516) kills human leukemia cells via down-regulation of Mcl-1 through a transcriptional mechanism. *Mol. Pharmacol* (70), 645-655.

Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, G. S., Nanes, M. S. (2002): Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP2αA) is inhibited by tumor necrosis factor-α. *J Biol Chem.* (277), 2695- 2701.

Green, D. R. (2007): Life, death, BH3 profiles, and the salmon mousse. *Cancer Cel.* (12), 97-99.

Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst P., Korsmeyer, S. J. (1999): Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* (274), 1156-1163.

Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C.-C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W.-C., Ohashi, p., Wang, X., Mak, T. W. (2005): Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* (121), 579–591.

Hjorth, M., Hellquist, L., Holmberg, E., Magnusson, B., Rödger, S., Westin, J. (1993): Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I—a randomized study. *European Journal of Haematology* (50), 95-102.

Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., *et al.* (2000): Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J. Biol Chem.* (275), 28345-28348.

Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V., Plunkett, W. (2005): Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* (106), 2513-2519.

Chen, R., Wierda, W. G., Chubb, S., Hawtin, R. E., Fox, J. A., Keating, M. J., Gandhi, V., Plunkett, W. (2009): Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (113), 4637-4645.

International Myeloma Working Group (2003): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group, *British Journal of Haematology* (121), 749-57.

Jin, Z., El-Deiry, W. S. (2005): Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* (4):139-163.

Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D. *et al.* (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J. Med. Journal* (54), 2980-2993.

Kryštof, V., Cankař, P., Fryšová, I., Slouka, J., Kontopidis, G., Džubák, P., Hejdúch, M., Srovnal, J. *et al.* (2006): 4-Arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J. Med. Chem.* (49), 6500-6509.

Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. (2004): Multiple myeloma. *The new england journal of medicine* (351), 1860-1873.

Lam, L. T., Pickeral, O. K., Peng, A. C., *et al.* (2001): Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol.* (2): RESEARCH0041.

Laubach, J., Richardson, P., Anderson, K. (2011): Multiple myeloma. *The annual review in of medicine* (62), 249-264.

Lawen, A. (2003): Apoptosis-an introduction. *BioEssays* (25), 888-896.

Liu, H. *et al.* (2005) Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* (175), 8337–8345.

MacCallum, D. E., Melville, J., Frame, S. *et al.* (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitrine) Induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II - dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* (65), 5399-5407.

Malumbres, M., Barbacid M. (2009a): Cell cycle CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* (9), 153-166.

Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, L., Lathi, J. M., Manning, G., *et al.* (2009b): Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* (11), 1275-1276.

Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., Bischoff, J. R. (2008): CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci* (29), 16-21.

Manohar, S. M., Rathos, M. J., Sonawane, V., Rao, S. V., Joshi. K. S. (2011): Cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of Cdk9-T1 and RNA polymerase II-dependent transcription. *Leukemia research*.

Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., Green, D. R. (2006): Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell.* (21), 749-760.

McNeish, I. A., Lopes, R., Bell, S. J., *et al.* (2005): Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* (302), 69-82.

Merino, R., Ding, L., Veis D. J., Korsmeyer S. J., Nunez, D. (1994): Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J.* (13), 683-691.

Miguel-Garcia, A., Orero, T., Matutes, E., Carbonell, F., Miguel-Sosa, A., Linares, M., *et. al.* (1998): Bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study. *Haematologica* (83), 298-304.

Moore, G. E., Kitamura, H. (1968): Cell line derived from patient with myeloma. *N. Y. State J. Med.* 68, 2054-2060.

Moulding, D. A., Akgul, C., Derouet, M., White, M. R. H., Edwards, S. W. (2001): Bcl-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* (70), 783-792.

Multiple myeloma research foundation (2011): Multiple myeloma, Norwalk Connecticut.

Němec, P., Kuglík, P., Hájek, R. (2008): Úloha chromozomových translokací při vzniku a vývoji mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* (21), 53-58.

Nurse, P. (2000): A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* (100), 71–78.

Ong, F., van Nieuwkoop, J. A., de Groot-Swings, G. M., Hermans, J., Harvey, M. S., Kluin, P. M., *et al.* (1995): Bcl-2 protein expression is not related to short survival in multiple myeloma. *Leukemia* (9), 1282-1284.

Opferman, J. T. *et al.* (2005): Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* (307), 1101–1104.

Opferman, J. T. *et al.* (2003): Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* (426), 671–676.

Perciavalle, M. R., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J. *et al.* (2012): Anti-apoptotic Mcl-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol.* (14), 575-583.

Peterlin, B. M., Price, D. H. (2006): Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell.* (23), 297-305.

Puthier, D., Pellat-Deceunynck, C., Barille, S., Robillard, N., Rapp, M. J., Juge-Morineau, N., *et al.* (1999): Differential expression of Bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia* (13), 289-324.

Rajkumar, S. V., Dispenzieri, A., Fonseca, R., *et al.* (2001): Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia* (15), 1274-1276.

Rastogi, R. P., Sinha, R., Sinha, R. P. (2009): Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI journal.* (8), 155-181.

Riedl, S. J., Shi, Y. (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (5), 897-907.

Rosato, R. R., Dai, Y., Almenara, J. A., Maggio, S. C., Grant, S. (2004): Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation. *Leukemia* (18), 1780-1788.

Roux, S., Meignin, V., Quillard, J. *et al.* (2002): RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol* (117), 86–92.

Sati, H., Apperley, J. F., Greaves, M. *et al.* (1998): Interleukin-6 is expressed by plasma cells from patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* (101), 287–295.

Sedláček, H. H. (2001): Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol.* (38), 139-170.

Schimmer, A. D., Welsh, K., Pinilla, C., Wang, Z. *et al.* (2004): Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* (1), 25-35.

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., *et al.* (2010): Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* (463), 103-107.

Shirsath, N. P., Manohar, S. M., Joshi, K. S. (2012): P276-00, a cyclin-dependent kinase inhibitor, modulates cell cycle and induces apoptosis in vitro in mantle cell lymphoma cell lines. *Molecular Cancer* (11), 77.

Steimer, D. A. *et al.* (2009): Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood* (113), 2805–2815.

Takahashi, R., Deveraux, Q. L., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998): A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* (273), 7787–7790.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (9), 231-241.

Thomas, L. W., Lam, C., Edwards, S. W. (2010): Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Letters* (584), 2981-2989.

Tuna, M., Knuutila, S., Mills, G. B. (2009): Uniparental disomy in cancer. *Trends in Molecular Medicine* (15), 120-128.

Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., Scorilas, A. (2012): The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Advances in Hematology*.

Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* (335), 440–442.

Yang, T., Kozopas, K. M. and Craig, R. W. (1995): The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* (128), 1173–1184.

Yankulov, K. Y., Bentley, D. L. (1997): Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH. *EMBO J.* (16), 1638-1646.

Youle, R. J., Strasser, A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (9), 47-59.

Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T., Reed, J. C. (1996): Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* (271), 7440–7444.

Zhang, B., Gojo, I., Fenton, R. G. (2002): Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* (99), 1885–1893.