

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



**Biochemické profilování nového, selektivního  
inhibitoru cyklin-dependetní kinasy 9**

**Diplomová práce**

**Bc. Vladimíra Burdová**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

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

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Jordy, Ph.D. a uvedla v ní všechny použité zdroje.

Olomouc .....

.....

Bc. Vladimíra Burdová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení celé diplomové práce, jeho cenné rady, čas a trpělivost. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., především Janě Hudcové, Olze Hustákové a Dítě Parobkové za vstřícnost a praktické rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu a pomoc při studiu.

## SOUHRN

Rodina cyklin dependentních kinas (CDK) hraje klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech, včetně regulace buněčného cyklu, transkripce a apoptosy. Mezi CDK podílející se na kontrole transkripce patří CDK9. Tato cyklin dependentní kinasa se jako součást pozitivního transkripčního faktoru *b* účastní fosforylace C-terminální domény RNA polymerasy II v místě S2 a iniciuje tak elongaci transkripce. Ze současných studií vyplývá, že inhibice CDK9 se jeví jako slibná strategie při léčbě rakoviny, zejména mnohočetného myelomu a chronické lymfocytické leukémie.

Teoretická část diplomové práce se zabývá poznatky o CDK9 a jejích specifických inhibitorů. Cílem experimentální části bylo stanovit biologické účinky nového inhibitoru cyklin-dependentní kinasy 9 na buněčné linie MCF-7 a U-266 a ověřit tak jeho preferenci k CDK9.

## **SUMMARY**

The family of cyclin-dependent kinases (CDKs) play the key role in many physiological processes, including regulation of cell cycle, transcription and apoptosis. There appears CDK9 among the CDKs involved in the control of transcription. This cyclin-dependent kinase is a component of the positive transcription of the factor *b* participating phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II at the site S2 and thus initiates the transcription elongation. Present studies suggest that inhibition of CDK9 appears as a promising strategy in the treatment of cancer, in particular multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia.

The theoretical part of the thesis deals with the knowledge of CDK9 and its specific inhibitors. The target of experimental part was to determine the biological effects of the new inhibitor of cyclin-dependent kinase 9 in cell lines MCF-7 and U-266, and thus verify its preference for CDK9.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Cyklin-dependentní kinasy (CDK)</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2</b>	<b>Vlastnosti a funkce CDK9</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Inhibitory cyklin-dependentních kinas</b> .....	<b>16</b>
2.3.1	Inhibitory CDK9 .....	16
2.3.2	Buněčné důsledky inhibitorů CDK .....	21
<b>2.4</b>	<b>Mnohočetný myelom</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b> .....	<b>27</b>
4.1.1	Přístrojové vybavení .....	27
4.1.2	Použité chemikálie .....	27
4.1.3	Použité roztoky .....	28
4.1.4	Použité protilátky .....	28
4.1.5	Použité buněčné linie .....	29
4.1.6	Použité inhibitory .....	29
<b>4.2</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>30</b>
4.2.1	Ovlivnění nádorových buněčných linií, sklizení a lyzace .....	30
4.2.2	SDS-PAGE a western blotting .....	31
4.2.3	Průtoková cytometrie .....	31
4.2.4	Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3, 7 a 9 .....	31
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Vliv látky LGR3874 na nádorovou buněčnou linii MCF-7</b> .....	<b>33</b>
5.1.1	Analýza buněčného cyklu .....	33
5.1.2	Analýza exprese vybraných proteinů .....	34
<b>5.2</b>	<b>Proapoptické účinky látky LGR3874 na nádorovou buněčnou linii U-266</b> .....	<b>37</b>
5.2.1	Analýza iniciace apoptosy v závislosti na koncentraci látky LGR3874 .....	39
5.2.2	Analýza aktivace apoptosy v závislosti na délce působení látky LGR3874 .....	41
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>54</b>

# 1 ÚVOD

Přesná regulace buněčného dělení, diferenciaci a buněčné smrti je nezbytná pro správný vývoj organismu, homeostázu počtu buněk a udržení funkce tkání. Veškeré poruchy v tomto regulačním systému mohou vést k nekontrolovatelnému růstu a množení buněk, které mohou vyústit až v rakovinu (Chial, 2008). K transformaci normálních buněk v buňky nádorové vlivem deregulace buněčného cyklu významně přispívají změny v expresi regulátorů cyklin-dependentních kinas, které vedou ke zvýšené aktivitě CDK (Carnero, 2002). Z tohoto důvodu se inhibice CDK stala významným cílem protinádorové terapie. Během posledních let vedlo intenzivní hledání farmakologických inhibitorů CDK k objevení a charakterizaci mnoha sloučenin vykazujících selektivitu k CDK, kdy některé z nich dokonce v současné době procházejí klinickým testováním v rámci léčby různých typů rakoviny (McInnes, 2008; Liu *et al.*, 2011). Kromě inhibice CDK zapojených do regulace buněčného cyklu vykazují některé inhibitory schopnost blokovat transkripci mRNA vlivem inhibice CDK9. Bylo prokázáno, že inhibice transkripce vede v buňkách k rychlému poklesu hladin antiapoptických proteinů s krátkým poločasem rozpadu a následné iniciaci apoptosy (Kryštof *et Uldrijan*, 2010). Jelikož přežití některých nádorových buněk je závislé na kontinuální expresi těchto antiapoptických proteinů, jeví se blokáce transkripce vlivem inhibice CDK9 jako možný terapeutický cíl při léčbě rakoviny, zejména mnohočetného myelomu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cyklin-dependentní kinasy (CDK)

Cyklin-dependentní kinasy patří do rodiny serin/threoninových proteinkinás (Graña *et al.*, 1994). V reakci na extracelulární a intracelulární signály, regulují buněčný cyklus a zajišťují tak buňce jeho správný průběh a načasování (Morgan, 1997). Jsou také zapojeny do dalších fyziologických procesů jako je transkripce a apoptosa (Malumbres *et Barbacid*, 2005).

V současnosti bylo u člověka na základě sekvenční podobnosti detekováno 21 genů kódujících cyklin-dependentní kinasy a 5 dalších genů, které kódují skupinu příbuzných proteinů označovaných jako CDK-like (CDKL) kinasy, účastníci se rozdílných buněčných funkcí (Malumbres *et al.*, 2009). Nejvýznamnější roli mají ty, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu, tedy CDK1/2/3/4 a 6. Do přechodu G1/S se zapojují nejprve CDK4/6 společně s cyklinem D, jež mají vliv také na průchod S fází, a poté i CDK2/cyklin E s CDK3/cyklin C. Komplex CDK1/cyklin A stimuluje průběh S/G2 a CDK1 společně s cyklinem B spouští přechod G2 fáze do mitózy. Na kontrole transkripce se podílejí CDK7/8/9 společně s cykliny H/C/T a na regulaci apoptosy mají vliv CDK5 a 11 (Knockaert *et al.*, 2002; Malumbres *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008). Struktura a funkce ostatních členů rodiny CDK jsou v současné době postupně studovány. Nejnovější studie ukazují, že tyto méně probádané CDK nemusí mít v buňkách pouze minoritní role. Například bylo prokázáno, že CDK16 je nezbytná pro správnou spermatogenezi a CDK12 a 13 spolu s cyklinem K zprostředkovávají fosforylaci CTD RNA polymerasy II a účastní se tak regulace transkripce (Mikolcevic *et al.*, 2012; Böskén *et al.* 2014).

V buňce se CDK vyskytují během celého buněčného cyklu, avšak v monomerní formě nevykazují enzymatickou aktivitu, tu získávají až po navázání jejich specifických vazebných partnerů. Ve většině případů se jedná o cykliny, které jsou exprimovány a degradovány v určitých časech a fázích buněčného cyklu, tak aby byla přesně regulována aktivita CDK (Morgan, 1995; Malumbres *et Barbacid*, 2009; Cruz *et Tsai*, 2004). CDK mohou být aktivovány také jinými vazebnými proteiny, než jsou cykliny. Například CDK5 i přes to, že má schopnost vázat cykliny D a E, je aktivována až po navázání vazebného aktivačního partnera p35 nebo p39 (Kesavapany *et al.*, 2004). Aktivace CDK také vyžaduje navázání CDK-aktivační kinasy (CAK), která fosforyluje CDK na specifických místech (Carnero, 2002). Po aktivaci tyto heterodimerní komplexy fosforylují cílové substráty podílející se na dalším průběhu buněčného cyklu, včetně transkripčních regulátorů, které vyvolávají fázově



specifickou genovou expresí, stimulují DNA replikaci nebo zahajují mitózu (Malumbres *et al.*, 2007; Malumbres *et al.* Barbacid, 2005).

Aktivita CDK je také regulována negativními CDK-inhibičními podjednotkami (CKI). V savčích buňkách se vyskytují dvě třídy těchto CDK inhibitorů, INK4 a Cip/Kip. Rodina INK4 obsahující čtyři členy (p16, p15, p18, p19) se váže a inhibuje výhradně CDK4 a CDK6, na rozdíl od rodiny proteinů Cip/Kip zahrnující proteiny p21, p27 a p57, které jsou schopny inhibovat aktivitu všech CDK (Roussel, 1999; Miller *et al.* Flaherty, 2014; Morgan, 1997).

CDK jsou tvořeny velkým C-terminálním lalokem složeným z  $\alpha$  helixů a malým N-terminálním lalokem tvořeným  $\beta$ -skládanými listy. V hydrofobní kapse vzniklé mezi dvěma laloky se nachází ATP-vazebné místo. Součástí struktur CDK je také vazebné místo pro cykliny. Většina členů rodiny CDK obsahuje inhibiční místo, které bývá fosforylované inhibitory CDK Wee1 a Myt1 a nachází se v ATP-vazebném místě, a aktivační místo, které je součástí T-smyčky a při úplné aktivaci CDK dochází k jeho fosforylaci CAK (Morgan, 1997; Pavletich, 1999; Lim *et al.* Kaldis, 2013).

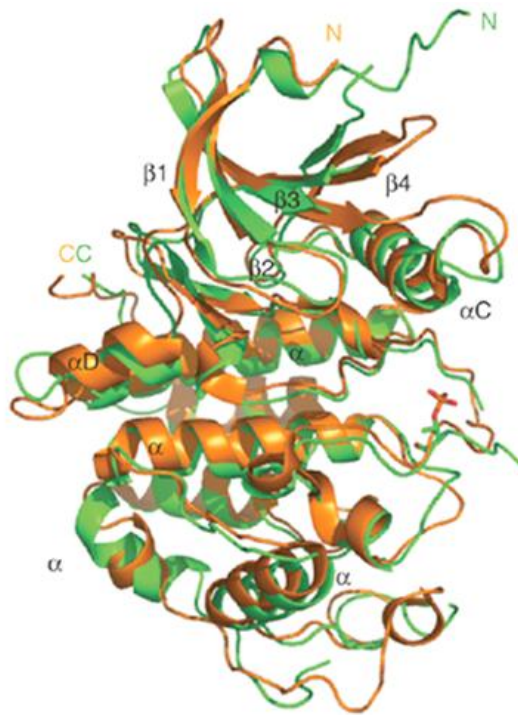
Drtivá většina nádorových onemocnění vykazuje deregulaci buněčného cyklu často vlivem pozměněné aktivity cyklin-dependentních kinas, jež vzniká v důsledku zvýšené exprese pozitivních regulátorů CDK a/nebo inaktivací inhibitorů CDK (Carnero, 2002). Na základě těchto pozorování se staly CDK cílem mnoha studií a hledání farmakologických CDK inhibitorů, za účelem terapeutického použití proti rakovině, neurodegenerativním a kardiovaskulárním onemocněním, a také při léčbě virových infekcí (HIV; Lam *et al.*, 2001; Knockaert *et al.*, 2002; Sedore *et al.*, 2007).

## 2.2 Vlastnosti a funkce CDK9

První zmínky o cyklin-dependentní kinase 9 pocházejí z 90. let minulého století, kdy byla poprvé izolována a pojmenována názvem PITALRE, který je odvozený od charakteristického motivu aminokyselin Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu (Graña *et al.*, 1994). CDK9 hraje důležitou roli při regulaci transkripce, a proto komplexně zasahuje do dalších biologických procesů jako je růst buněk, proliferace, ochrana před apoptosou a diferenciace (Romano *et al.* Giordano, 2008).

CDK9 vykazuje strukturální složení typické pro kinasy. Obsahuje N-terminální lalok (rezidua 16-108), který je složený hlavně z  $\beta$ -skládaných listů a jednoho  $\alpha$  helixu ( $\alpha$ C), a C-terminální lalok (rezidua 108-330), tvořený převážně z  $\alpha$  helixů. Strukturálně je CDK9 podobná CDK2, s níž sdílí 40% sekvenční identitu. Hlavní rozdíly se nachází v oblastech smyček

a patří mezi ně zejména smyčka před  $\alpha$ C helixem, která odpovídá kontaktní oblasti pro cyklin A u CDK2, a smyčka mezi  $\beta$ 4 a  $\beta$ 5, kde se u CDK9 nachází inserce. Také u CDK9 má hlavní funkci v regulaci fosforylace. Na rozdíl od jiných CDK, která jsou fosforylována CDK-aktivační kinasou, u CDK9 dochází k autofosforylaci Thr186 v aktivačním místě (Baumli *et al.*, 2008).



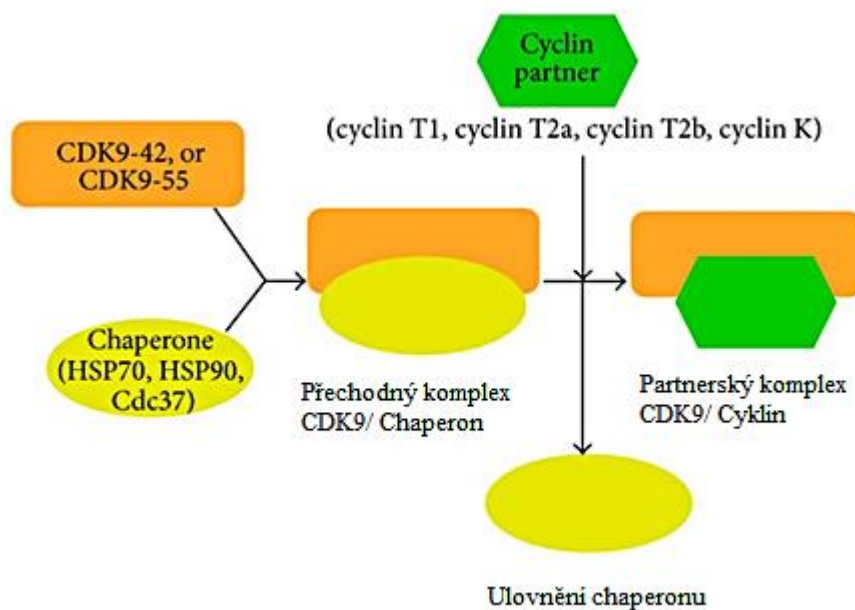
Obr. 1: Porovnání krystalových struktur CDK9 (zelená barva) a CDK2 (oranžová barva; převzato od Baumli *et al.*, 2008).

Jelikož se v genu pro CDK9 vyskytují dva promotory, byly v savčích buňkách identifikovány dvě izoformy této kinasy o molekulové hmotnosti 42 kDa a 55 kDa. CDK9-55 ve srovnání s CDK-42 obsahuje na N- konci 117 aminokyselin navíc, což je důsledek v rozdílu molekulové hmotnosti (Shore *et al.*, 2003). Obě izoformy jsou lokalizované v buněčném jádře, CDK9-42 bývá přítomna i v cytoplasmě. Bylo také prokázáno, že exprese obou izoform je tkáňově i signálně specifická. Například CDK9-55 je exprimována převážně v plicích, játrech a mozkové tkáni, zatímco exprese CDK9-42 převažuje ve slezině a varlatech, ale také i v buňkách karcinomu děložního čípku (HeLa). Kromě toho experimenty naznačují, že CDK-55 se zapojuje do regulace buněčné diferenciace různých typů tkání, jako jsou svalové tkáně, hematopoetický systém a adipogeneze (Romano *et Giordano*, 2008). Míra exprese je dána i rozdílným aktivačním signálem, kdy například při diferenciaci monocytů

v makrofágy převažuje hladina CDK9-55, ale po infekci virem HIV, dochází ke zvýšení exprese CDK9-42 (Shore *et al.*, 2003).

Stejně jako ostatní cyklin-dependentní kinasy i obě izoformy CDK9 tvoří heterodimery s jejich cyklinovými partnery- cyklinem T1, T2a, T2b a cyklinem K (Romano *et* Giordano, 2008). Všechny tyto cykliny sdílejí podobnou sekvenční strukturu v CDK9-vazebné doméně, která se nachází na N-konci v tzv. cyklinovém boxu. Na rozdíl od cyklinu K, který je relativně malý a má krátkou C-terminální doménu, ostatní cykliny T obsahují na C-konci dlouhé prodloužení, ve kterém se značně sekvenčně rozcházejí (Lin *et al.*, 2002). Například cyklin T1 ve své struktuře obsahuje navíc motiv bohatý na histidin a sekvenci PEST na C-konci (Garriga *et* Graña, 2004). Cykliny T2a, T2b mají původ ve stejném genu, avšak alternativní sestřih vede k rozdílům na C-terminální doméně mezi těmito dvěma proteiny (Shore *et al.*, 2003). Zajímavostí je, že cyklin K stejně jako ostatní cykliny T tvoří heterodimery s CDK9, ale k aktivaci transkripce dochází pouze, pokud je komplex CDK9/cyklin K navázán na RNA (Lin *et al.*, 2002).

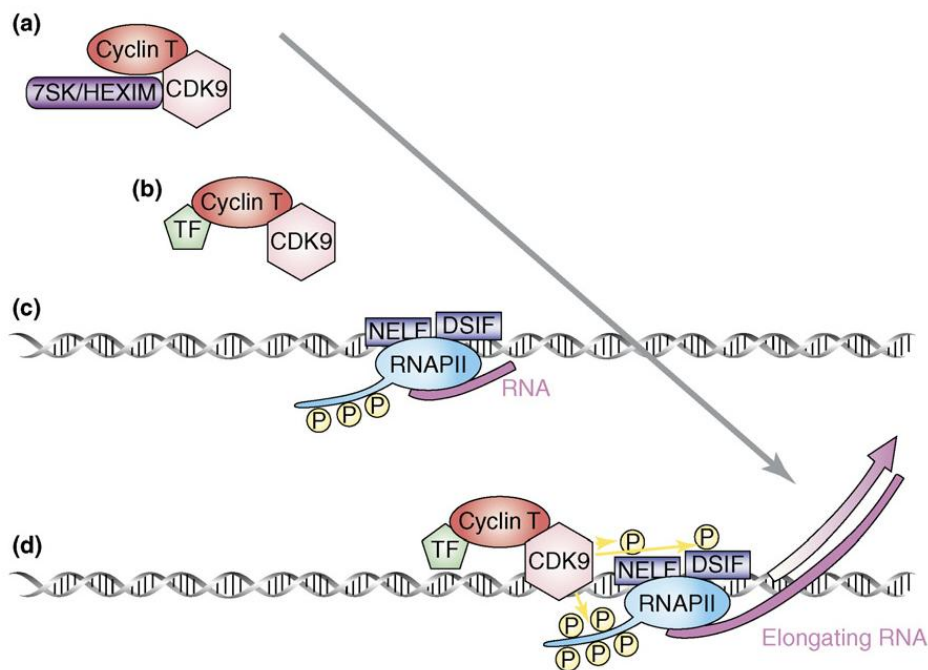
Volná CDK9 je v buňkách rychle degradována pomocí ubikvitinace a patří tak mezi proteiny s krátkým poločasem života (4-6 hodin) (Garriga *et al.*, 2003). Nově nasyntetizovaná CDK9 je tedy velmi nestabilní a proto před tím než je aktivována cykliny, dochází k přechodnému spojení s jedním z chaperonových proteinů HSP70, HSP90 nebo Cdc37 (Romano *et* Giordano, 2008). Nedávné studie naznačují, že stabilita CDK9 by mohla být spojena s fosforylací T-smyčky, protože její defosforylace vede v buňkách ke snížení hladin CDK9 vlivem proteasomální degradace (Ramakrishnan *et* Rice, 2012). Bylo také prokázáno, že rychlost degradace je ovlivněna mírou exprese CDK9, jelikož při nadměrné expresi vykazuje tato CDK kratší poločas rozpadu (cca 1 hodina), než při její fyziologické expresi (4-6 hodin; Garriga *et al.*, 2003).



Obr. 2: Schéma aktivace CDK9 (převzato od Romano, 2013).

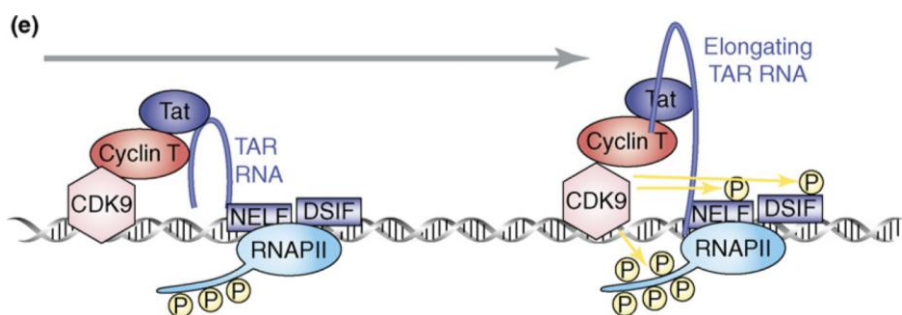
Komplex CDK9 s příslušným cyklinem T je součástí pozitivního transkripčního elongačního faktoru *b* (P-TEFb) (Mori *et al.*, 2002; Yu *et Cortez*, 2011). Ten, v buňkách aktivuje elongaci transkripce prostřednictvím fosforylace karboxylové terminální domény (CTD), která je tvořená repeticemi heptapeptidu Y1S2P3T4S5P6S7 a je součástí největší podjednotky (RPB1) RNA polymerasy II (Peng *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2011). Kvůli klíčové funkci při transkripci, je aktivita P-TEFb dynamicky a přísně regulována. V buňkách se P-TEFb vyskytuje ve dvou formách, aktivní a neaktivní. Inhibice aktivity P-TEFb je založena na navázání velkého komplexu složeného z 7SK malé jaderné RNA (snRNA), která se přímo váže na P-TEFb a zprostředkovává tak vazbu dalšího člena komplexu, a proteinu HEXIM1 nebo HEXIM2 na P-TEFb. P-TEFb může být z komplexu kdykoliv uvolněn vlivem stresu nebo hypertrofických signálů. Předpokládá se, že volná aktivní forma P-TEFb, je v buňkách pro aktivitu transkripce dostatečná, ale v poslední době se ukázalo, že zvýšení aktivity transkripce může být podpořeno navázáním proteinu Brd4 na aktivní P-TEFb. Protein Brd4 se váže na acetylované histony a může tak namířit P-TEFb na konkrétní genové promotory. Kromě toho je obecně známo, že P-TEFb aktivně váže také transkripční faktory zahrnující například jaderný faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) a myogenní regulační faktor (MyoD). K regulaci P-TEFb přispívá i řada dalších aktivátorů a supresorových proteinů, včetně posttranslační modifikace zprostředkované acetylací, ubikvitinací a fosforylací (Wang *et Fischer*, 2008; Kohoutek, 2009).

Aby mohla být transkripce iniciována, musí dojít k aktivaci transkripčního faktoru TFIIF, který je nutný pro zahájení odstranění promotoru a k syntéze krátkého úseku RNA účinkem RNA polymerasy II. Na iniciaci transkripce má vliv i transkripční faktor TFIIH (komplex CDK7/cyklin H), který fosforyluje CTD RNA polymerasy v místě S5, vyvolává její konformační změny a napomáhá k rozvolňování dvoušroubovice DNA (Kwak *et al.*, 2013; Kohoutek, 2009). Po nasyntetizování cca 50 nukleotidů nové RNA je RNA polymerasa II inhibována navázáním dvou negativních elongačních faktorů, na 5,6-dichlor-1 $\beta$ -D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB) citlivý indukující faktor (DSIF) a negativní elongační faktor (NELF). Tato inhibice souží jako kontrolní bod a omezuje rychlost transkripce po její iniciaci. K opětovnému zahájení transkripce, tedy přesněji aktivace její elongace, je dosaženo fosforylací inhibičního komplexu aktivním transkripčním faktorem P-TEFb. Ten fosforyluje protein RD, který je podjednotkou NELF a dochází k jeho disociaci z inhibičního komplexu. Fosforylací DSIF v jeho podjednotce SPT5 se tento negativní elongační faktor mění na pozitivní a zůstává součástí RNA polymerasy II. P-TEFb kromě toho také fosforyluje CTD RNA polymerasy II v místě S2 a iniciuje tak elongaci transkripce (Zhu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008).



Obr. 3: Regulační dráha cyklin dependentní kiny 9. (a) neaktivní forma P-TEFb; (b) Uvolnění inhibičního komplexu 7SK/HEMIX a navázání transkripčního faktoru nebo Brd4 na aktivní formu P-TEFb; (c) Inhibice iniciace transkripce vlivem nasednutí NELF a DSIF na RNA polymerasu II; (d) P-TEFb aktivuje elongaci transkripce mRNA fosforylací NELF/DSIF a S5 na CTD na RNA polymerase II (převzato od Wang *et al.*, 2008).

Pozitivní transkripční elongační faktor *b* se zapojuje i do replikace viru lidské imunitní nedostatečnosti-1 (HIV-1). Replikace tohoto viru je totiž závislá na transkripčních mechanismech hostitelské buňky. Transkripce pro-virové DNA, která začíná na promotoru LTR (long terminal repeat), je silně potlačena vlivem vazby negativních transkripčních elongačních faktorů 7SK/HEXIM na P-TEFb. Je dokázáno, že k elongaci transkripce dochází po navázání HIV-1 transkripčního transaktivátoru (Tat) na P-TEFb. Tat se spojuje s HIV transaktivačním regulačním elementem (TAR), který tvoří strukturu smyčky („stem-loop“) na nově vznikající RNA, a interaguje s cyklinem T1 a 7SK a soutěží tak s HEXIM o vazbu na 7SK. Zablokování tvorby komplexu P-TEFb/7SK/HEXIM vlivem Tat vede k uvolnění a aktivaci P-TEFb, který poté fosforyluje RNA polymerasu II a její inhiční faktory, a umožňuje tak efektivní elongaci transkripce viru HIV (Barboric *et al.*, 2007; Sedore *et al.*, 2007). Při studiu účinků inhibitorů CDK, bylo zjištěno, že vlivem inhibice CDK9 dochází v infikovaných buňkách k zastavení replikace viru HIV. Tento poznatek a další studium struktury CDK9, ale i Tat a HEXIM by mohlo přispět v budoucnu k antivirové léčbě (Sedore *et al.*, 2007; Narayanan *et al.*, 2012; Kryštof *et al.*, 2012).



Obr. 4: Závislost replikace viru HIV na transkripčních mechanismech hostitelské buňky na úrovni P-TEFb (převzato od Wang *et Fischer*, 2008).

Aktivita P-TEFb může přispívat ke vzniku kardiovaskulárního onemocnění, které v dnešní době patří k nejčastějším příčinám smrti na celém světě a počty úmrtí na toto onemocnění se stále zvyšují (Lips *et al.*, 2003; Kryštof *et al.*, 2009). Na vzniku kardiovaskulárního onemocnění se primárně podílí mnoho příčin, například infarkt myokardů, vrozené vady, hypertenze, virová onemocnění a srdeční hypertrofie (Latronico *et al.*, 2008). Právě poslední zmiňované onemocnění je charakteristické zvětšením velikosti diferencovaných srdečních

myocytů, což je na molekulární úrovni spojováno s intenzivní transkripcí a translací. Při srdeční hypertrofii totiž dochází k chronické aktivitě CDK9, jakožto součásti P-TEFb, která fosforylací CTD RNA polymerasy II stimuluje elongaci transkripce a dochází tak k celkovému nárůstu mRNA a proteinů v srdečních myocytech. Chronická aktivace CDK9 způsobuje nejen rozšíření myocytů, ale přispívá také k následnému selhání srdce, a tak její inhibice vlivem nových selektivních inhibitorů se zdá být vhodným farmakologickým cílem při léčbě srdeční hypertrofie (Romano *et* Giordano, 2008; Kryštof *et al.*, 2009).

Jak bylo popsáno výše, funkce komplexu CDK9/cyklin T, jakožto podjednotky P-TEFb, je dobře prostudovaná a charakterizovaná, nicméně CDK9 tvoří také komplex s cyklinem K, jehož funkce je méně jasná. Z posledních studií ale vyplývá, že komplex CDK9/cyklin K se společně s dalšími CDK zapojuje do integrity genomu. Při experimentálních pokusech, kdy byla snižována hladina CDK9 nebo cyklinu K, bylo totiž prokázáno, že v reakci na replikační stres dochází k zastavení buněčného cyklu a spontánnímu poškození DNA v replikujících se buňkách (Zhang *et al.*, 2013; Yu *et* Cortez, 2011). Průběžné kontrolování celistvosti a přesná replikace genomu jsou nutné pro přežití buněk a zabránění vzniku různých onemocnění, včetně rakoviny. Z tohoto důvodu je do průběhu buněčného cyklu zasazeno několik kontrolních bodů, které cyklus zastavují v reakci na poškození DNA (DDR) a zahajují její opravy. Podmnožinou DDR je odpověď na replikační stres (RSR), která buňkám pomáhá vyrovnat se s environmentálními a endogenními faktory, které narušují replikaci DNA. Poškození DNA v buňkách zastavuje replikaci a aktivuje RSR. Ze studia komplexu CDK9/cyklin K vyplývá, že právě aktivace RSR vede k akumulaci tohoto komplexu u chromatinu, kde interaguje s kontrolními kinasami ATR (Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related protein), které jsou součástí signální dráhy RSR, a společně omezují množství jednovláknové DNA. Podílí se i na stabilizaci zastavené replikační vidličky tím, že snižují její odbourávání a celkově tak přispívají k regeneraci replikace (Yu *et al.*, 2010; Yu *et* Cortez, 2011; Lim *et* Kaldis, 2013).

Z výše uvedených vlastností vyplývá, že CDK9 hraje významnou roli v mnoha buněčných procesech. Navíc, deregulace aktivity této CDK je spojována s mnoha lidskými chorobami, včetně rakoviny, srdeční hypertrofie, infekcí HIV či patologického zánětu. Z těchto důvodů se CDK9 stává cílem pro vývoj specifických inhibitorů (Kryštof *et al.*, 2012).

## 2.3 Inhibitory cyklin-dependentních kinas

Během několika posledních let bylo objeveno a charakterizováno mnoho inhibitorů cyklin-dependentních kinas (Bose *et al.*, 2013). Patří mezi ně jak deriváty přírodních látek, tak látky čistě syntetické (Kryštof *et Uldrijan*, 2010). CDK inhibitory jsou malé molekuly, které se mezi sebou liší chemickou strukturou, avšak všechny mají společné některé vlastnosti: (i) mají nízkou molekulovou hmotnost (< 600), (ii) jsou to planární hydrofobní heterocykly, (iii) dokáží se vázat do ATP-vazebného místa CDK a kompetují tak o vazbu s molekulami ATP, (iiii) s CDK interagují především přes hydrofobní a vodíkové vazby (Kryštof *et Uldrijan*, 2010; Knockaert *et al.*, 2002). CDK inhibitory můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich účinku, na vysoce selektivní inhibitory a pan-CDK inhibitory, které mají schopnost inhibice vyššího počtu CDK (Shapiro, 2006).

Vybrané nejúčinnější CDK inhibitory v současné době prochází klinickými testy a jsou kandidáty na látky určené k léčbě různých nádorových onemocnění (Lapenna *et Giordano*, 2009). Jsou také testovány v rámci potencionální léčby dalších onemocnění spojených s deregulací CDK, jako jsou srdeční a neurodegenerativní onemocnění, virové a protozoární infekce a různé typy chronických zánětů (Knockaert *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Inhibitory CDK9

Inhibice CDK9 je v buňkách spojována s blokadou transkripce a následným poklesem hladin antiapoptických proteinů s krátkým poločasem rozpadu, který vede k iniciaci apoptózy. Schopnost snižovat hladiny těchto proteinů byla potvrzena u některých inhibitorů, které v současné době procházejí klinickým testováním v rámci léčby různých druhů rakoviny a vykazují selektivitu k CDK9 (Kryštof *et Uldrijan*, 2010; Manohar *et al.*, 2011; Whittaker *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Conroy *et al.*, 2009). Inhibice CDK9 se jeví také jako slibná strategie při léčbě patologických zánětů a srdečních chorob (Kryštof *et al.*, 2012). Mnoho současných inhibitorů vykazujících inhibici CDK9 jsou však neselektivní a inhibují i další CDK (viz Tab. 1). Návrh selektivních inhibitorů je komplikován vysokou sekvenční podobností mezi jednotlivými členy CDK rodiny. Pro maximální účinnost CDK9 inhibitorů je proto nutné studovat malé molekuly, které by byly vysoce selektivní k CDK9 (Kryštof *et al.*, 2009; Wang *et Fischer*, 2008). Současné studie se proto zaměřují na vývoj selektivních inhibitorů CDK9 prostřednictvím rentgenové krystalografické analýzy. Ta slouží ke stanovení krystalových struktur jak CDK9 tak i ostatních CDK v komplexu s cykliny, pro pochopení

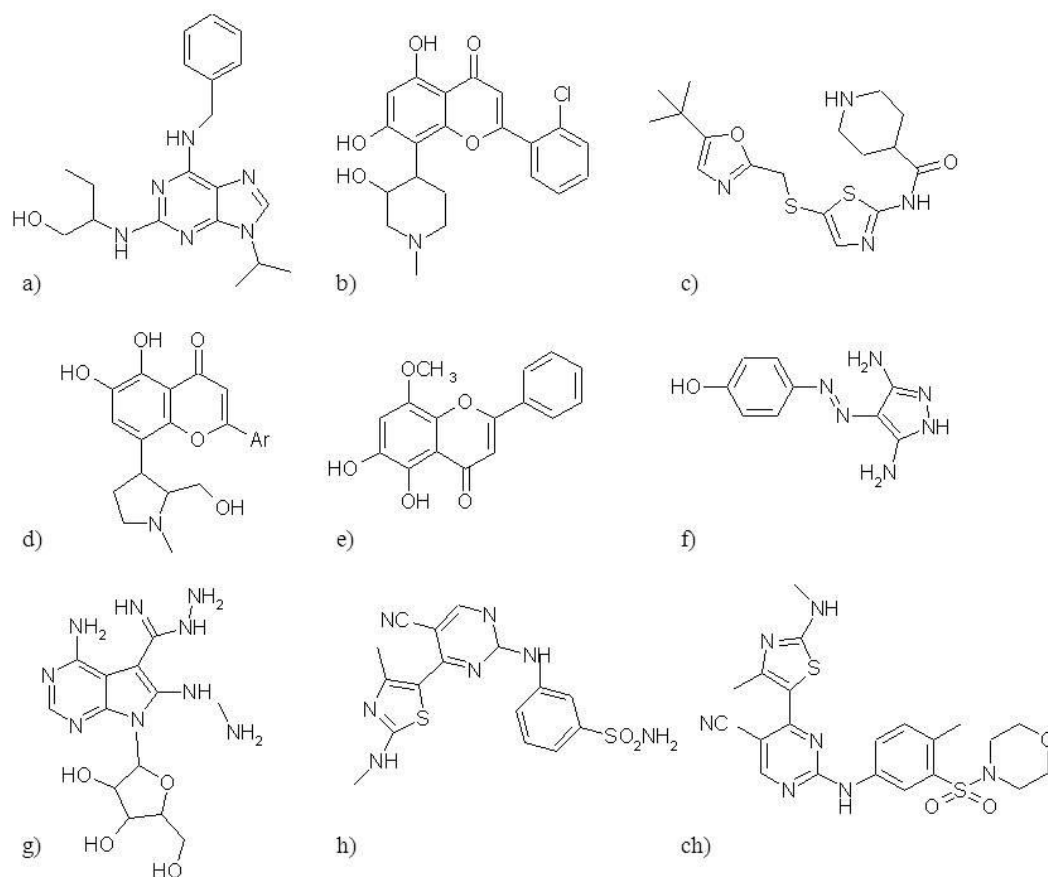


jejich fyziologické regulace a substrátové specifity (Baumli *et al.*, 2008; Wang *et Fischer*, 2008).

*Tab. 1: Selektivita vybraných inhibitorů CDK9 vyjádřená hodnotami IC50 [μM] (převzato od Bettayeb *et al.*, 2008; Dolloff *et al.*, 2012; Heuer, 2008; Kryštof *et al.*, 2006; Kryštof *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2011b; Polier *et al.*, 2011).*

Inhibitor	CDK/ příslušný cyklin					
	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D	CDK7/H	CDK9/T
<b>Roskovitin</b>	0,33	0,21	0,17	-	0,8	0,23
<b>Flavopiridol</b>	0,03-0,4	0,1	0,1	0,02-0,04	0,11-0,3	0,006
<b>SNS-032</b>	0,48	0,038	-	0,925	0,062	0,004
<b>P276-00</b>	0,079	-	0,224	0,063	2,84	0,02
<b>Wogonin</b>	-	-	-	-	12,3	0,19
<b>CAN508</b>	44	69	20	13,5	27	0,35
<b>EXEL-3700</b>	0,199	0,167		0,643	1,718	0,01
<b>EXEL-8647</b>	> 3,6	> 10		> 10	> 10	0,029
<b>SLM6</b>	< 0,3	< 0,3	-	> 10	> 10	0,133
<b>CDKI-71*</b>	0,012	-	0,004	-	0,11	0,006
<b>CDKI-83*</b>	0,072	-	0,23	-	0,405	0,021

\* selektivita inhibitorů CDK9 vyjádřená hodnotami Ki [μM]



Obr. 5: Chemická struktura vybraných inhibitorů: a) roskovitin; b) flavopiridol; c) SNS-032; d) P276-00; e) wogonin; f) CAN508; g) SLM6; h) CDKI-71; CDKI-83.

Jedna z prvních sloučenin, která byla charakterizována jako selektivní inhibitor CDK9, byl nukleotidový analog 5,6-dichloro-1- $\beta$ -ribofuranosyl-benzimidazol (DRB). Původně byl DRB navržen jako inhibitor iniciace transkripce, experimenty však prokázaly, že přednostně inhibuje transkripci na úrovni elongace. Další protein kinasou, u které byla prokázána inhibice DRB, je kasein kinasa II (Wada *et al.*, 1998; Shima *et al.*, 2003). Přestože první informace o DRB byly publikovány před více jak 10 lety a přesná selektivita toho inhibitoru není stále přesně známá, zůstává DRB překvapivě jedním z nejvíce selektivních inhibitorů pro CDK9 (MacCallum *et al.*, 2005; Kryštof *et al.*, 2009).

Mezi inhibitory procházející klinickým testováním, jež se vyznačují selektivitou k CDK9, patří roskovitin, flavopiridol, SNS-032 a P276-00 (Kryštof *et al.*, 2010; Manohar *et al.*, 2011; Whittaker *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Conroy *et al.*, 2009). Roskovitin (CYC202; Seliciclib) je 2, 6, 9-trisubstituovaný purinový analog (MacCallum *et al.*, 2005). Je to pan-selektivní inhibitor, který má vliv na buněčnou proliferaci, progresi buněčného cyklu, transkripci a také iniciaci apoptosy (Jorda *et al.*, 2011). Prochází druhou fází klinického

testování pro léčbu rakoviny plic a B-buněk, včetně mnohočetného myelomu. Jeden z prvních CDK inhibitorů, který vstoupil do klinického testování, byl inhibitor flavopiridol. Je to polosyntetický flavonoid, jehož terapeutické účinky jsou v současné době testovány ve druhé fázi u pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií. (Blachly *et Byrd*, 2013; Chen *et al.*, 2005; McInnes, 2008). Inhibitor P276-00 je derivátem flavopiridolu a společně s inhibitorem SNS-032 patří do druhé generace inhibitorů CDK. P276-00 je ve druhé fázi klinického testování v léčbě mnohočetného myelomu a nádorů hlavy a krku (Kryštof *et Uldrijan*, 2010; Malumbres *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2013). Terapeutické účinky pan-selektivního inhibitoru SNS-032 (BMS-387032) jsou testovány u pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií a mnohočetným myelom (Chen *et al.*, 2009; Conroy *et al.*, 2009). Při porovnání výše zmíněných inhibitorů, jež prochází klinickým testováním, vykazuje SNS-032 vyšší účinnost na inhibici syntézy RNA a iniciaci apoptosy (Chen *et al.*, 2009, Kryštof *et al.*, 2009). Současně byla také u flavopiridolu, roskovitinu a SNS-032 prokázána anti-angiogenní aktivita (Kryštof *et al.*, 2012). Jak se ukazuje, inhibitor roskovitin může mít vliv na snížení hladin Mcl-1 proteinu také prostřednictvím inhibice transkripce IL-6, který je aktivátorem signální dráhy JAK/STAT. Ta je v buňkách mnohočetného myelomu zodpovědná za expresi Mcl-1 genů (Raje *et al.*, 2005). Jelikož se tyto inhibitory vyznačují selektivitou nejen pro CDK9, ale i pro ostatní CDK, tak v buňkách kromě apoptosy, vyvolené inhibicí transkripce, způsobují zastavení buněčného cyklu (Manohar 2011, Whittaker *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2005; Conroy *et al.*, 2009).

Inhibitor SLM6 vykazuje strukturální homologii s nukleosidovým analogem sangivamycinem, který byl izolován z bakterie *Streptomyces rimosus*. Při studiu účinků toho inhibitoru bylo zjištěno, že u buněk mnohočetného myelomu vlivem inhibice CDK9 indukuje apoptosu při nižších nanomolárních koncentracích ve srovnání s nemaligními buněčnými liniemi a jinými typy nádorů. Kromě toho, SLM6 vykazuje *in vivo* silnější anti-MM aktivitu než flavopiridol a jeví se tak jako slibný prostředek pro léčbu mnohočetného myelomu (Dolloff *et al.*, 2012).

K novým kompetitivním inhibitorům CDK patří skupina 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazolů, které se vyznačují mírnou inhibiční účinností k CDK2/cyklin E. Nejsilnějším inhibitorem z této skupiny je 4-[(3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl) diazenyl] fenol, který bývá zkráceně označován CAN508. Bylo prokázáno, že CAN508 má až 40krát vyšší inhibiční selektivitu k CDK9 než k ostatním CDK (Kryštof *et al.*, 2006). Krystalografickou analýzou bylo zjištěno, že způsob vazby CAN508 na CDK9/cyklin T a CDK2/cyklin A je velmi podobný. Vyšší selektivita k CDK9 je dána částečně rozdílnou orientací v ATP-vazebném

místě, která vytváří větší hydrofobní vazebnou kapsu mezi CDK9 a CAN508, než je tomu v případě CDK2 a CAN508, což se následně projevuje vyšším počtem intramolekulárních vodíkových vazeb mezi CDK9 a inhibitorem CAN508 (Baumli *et al.*, 2012). V souladu s těmito vlastnostmi, CAN508 inhibuje růst u různých buněčných linií a indukuje apoptosu pomocí inhibice transtripce a indukce exprese proteinu p53. Z experimentů vyplývá, že inhibice CDK9 látkou CAN508 má také anti-angiogenní aktivitu. Ta je výsledkem snížení exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který je nutný pro aktivaci endoteliálních buněk, a intracelulární adhezní molekuly (ICAM-1), přispívající k buněčné adhezi, invazivitě a angiogenezi (Kryštof *et al.*, 2011).

Na mezinárodní konferenci v Ženevě v roce 2008 byly prezentovány firmou Exelixis nově objevené inhibitory EXEL-8647 a EXEL-3700. Při *in vitro* a *in vivo* studiích byly prokázány jejich silné inhibiční účinky k CDK9, EXEL-3700 s hodnotou  $IC_{50} = 0,0102 \mu M$  a EXEL-8647 s hodnotou  $IC_{50} = 0,029 \mu M$ . Selektivita EXEL-8647 k CDK9 je až stonásobně vyšší v porovnání s ostatním cyklin-dependentním kinasami CDK1, CDK2, CDK4 a CDK7 (viz Tab. 1). Inhibicí CDK9 dochází ke snížení fosforylace S2 RNA polymerasy II a k poklesu exprese proteinů c-Myc, Mcl-1, cyklin D1, které jsou zapojeny do buněčného růstu a přežití. Bylo prokázáno, že u modelových nádorových buněčných linií dochází vlivem EXEL-8647 a EXEL-3700 k silné blokaci buněčné proliferace a indukci apoptické buněčné smrti, charakterizované štěpením prokaspasy 3 a 9. Další podrobné informace o vlastnostech a struktuře těchto inhibitorů nejsou v současné době publikovány, jelikož si je firma Exelixis chrání (Heuer, 2008).

Zástupcem přírodní látky, u něhož byla prokázána inhibice CDK9 a který by v budoucnu mohl přispět k onkologické léčbě, je wogonin. Je to přírodní flavonoid, obsažený v bylině *Scutellaria baicalensis*, který bývá často využíván při léčbě nemocí v tradiční čínské medicíně. Z experimentů vyplývá, že wogonin inhibuje také CDK7, avšak inhibiční selektivita k CDK9 je více jak 60krát vyšší. Aktivita ostatních CDK není tímto inhibitorem ovlivněna. Další vlastností wogoninu je, že přednostně inhibuje CDK9 u nádorových buněk ve srovnání s normálními buňkami a vykazuje tak malou nebo dokonce žádnou toxicitu pro netransformované buňky. Bylo prokázáno, že wogonin má kromě protinádorových účinků také antivirovou aktivitu. Tento fakt vyplývá ze závislosti virů na transkripčních mechanismech hostitelské buňky. Proto inhibicí CDK9 a následnou blokací transkripce hostitelských buněk vlivem wogoninu, dochází k potlačení replikace virů (Polier *et al.*, 2011).

Nedávno publikované látky CDKI-71 a CDKI-83 patří k dalším inhibitorům vykazujícím preferenci k CDK9 v nanomolárních koncentracích (Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2011b).

Inhibitor CDKI-83 se vyznačuje také selektivitou k CDK1. Studie tohoto inhibitoru naznačují, že kombinovaná inhibice CDK9 a CDK1 může vést k účinné indukci apoptosy u nádorových buněk a přispět tak při léčbě rakoviny (Liu *et al.*, 2011b). Inhibitor CDKI-71 se vyznačuje desetinásobně vyšší selektivitou k iniciaci apoptosy u nádorových buněk ve srovnání s buňkami normálními (Liu *et al.*, 2011a).

Stále se ukazuje, že nedostatečná znalost CDK9 a mechanismy její inhibice komplikují vývoj nových inhibitorů a terapeutická aplikace má tak před sebou ještě dlouhou cestu. Proto je potřeba do budoucna rozvíjet studium jak CDK9, tak jejich inhibitorů, které by měly vyšší selektivitu.

### **2.3.2 Buněčné důsledky inhibitorů CDK**

Účinky inhibitorů cyklin-dependentních kinas na nádorové buňky jsou dány jednak jejich selektivitou, ale také koncentrací, délkou působení, typem buněčné linie a jejím genetickým profilem (Wesierska-Gadek *et Kryštof*, 2009). Inhibicí aktivity CDK1/2/4 a 6 dochází k blokaci buněčné proliferace a zastavení buněčného cyklu, které je spojeno s defosforylací CDK substrátů, zatímco blokace CDK7 a 9 způsobuje inhibici transkripce vyvolávající apoptosu (Kryštof *et al.*, 2011). Transkripce, závislá na RNA polymerase II, je vysoce regulovaný proces, který zahrnuje sled událostí vedoucí k fosforylaci terminální karboxylové domény (CTD). Jedná se především o fosforylaci v místě S5 transkripčním faktorem II (TFIIH), jehož součástí je CDK7. Tento proces je nezbytný k iniciaci transkripce. CDK9, jako součást P-TEFb, fosforyluje S2 na CTD RNA polymerasy II a způsobuje tak elongaci transkripce (Liu *et al.*, 2011; Polier *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že inhibice transkripce vede k rychlému poklesu hladin antiapoptických proteinů s krátkým poločasem rozpadu a jejich odpovídající mRNA a může tak být konečnou příčinou cytotoxicity farmakologických CDK inhibitorů (Kryštof *et al.*, 2006; Polier *et al.*, 2011). Jedná se především o proteiny Mcl-1, Bcl-2, XIAP na jejichž kontinuální expresi je závislé přežití nádorových buněk a jejich úbytek v buňce koreluje právě s jejich krátkým poločasem života (Tab 1; Chen *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2001). Následné navození apoptosy je například v myelomových buňkách dobře detekovatelné díky zvýšení hladiny štěpných fragmentů PARP-1, jakožto markerů apoptosy (MacCallum *et al.*, 2005).

Tab. 2: Poločasy rozpadů antiapoptických proteinů Bcl-2, XIAP a Mcl-1 (Chen *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2001).

Protein	Poločas rozpadu [hod]	
	mRNA	Protein
Bcl-2	2,5-4	10-24
XIAP	3-5	6,5
Mcl-1	< 3	0,5-1

Vlivem inhibice CDK7 a CDK9 v nádorových buňkách nedochází pouze k inhibici exprese mnoha důležitých regulačních proteinů, ale pozorujeme také zvýšení hladin některých buněčných proteinů, a to zejména tumor supresorového proteinu p53 (Kryštof *et Uldrijan*, 2010). Protein p53 hraje klíčovou roli v navození apoptosy, buněčné senescence nebo zastavení buněčného cyklu v reakci na různé druhy buněčného stresu (Horn *et Vousden*, 2007). V normálních podmínkách je jeho hladina v buňkách udržovaná na nízké úrovni a to především díky interakci s jeho hlavním regulátorem MDM2, který slouží jako ubiquitin ligasa a podílí se tak na degradaci proteinu p53 (Vousden *et Lane*, 2007). MDM2 patří mezi proteiny s krátkým poločasem rozpadu. Vlivem inhibice transkripce dochází ke snížení hladiny MDM2 v buňce a s tím spojené narušení interakcí s proteinem p53, které vede k akumulaci p53 v buňce. Výsledky ukazují, že aktivace a akumulace supresorového proteinu p53 zvyšuje protinádorovou aktivitu některých CDK inhibitorů a může tak přispívat k léčbě nádorů (MacCallum *et al.*, 2005; Paprskářová *et al.*, 2009).

## 2.4 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je maligní onemocnění plazmatických buněk. Onemocnění je způsobené maligní transformací B-lymfocytů, které nekontrolovatelně proliferují a diferencují se až na terminální vývojová stádia tzv. plazmocyty (myelomové buňky) (Hájek *et al.*, 2011; Adam *et al.*, 1999). Vyznačuje se vznikem osteolytických lézí a s tím spojenou destrukcí skeletu (Giuliani *et al.*, 2004). Mnohočetný myelom zaujímá 2,5 % všech diagnostikovaných maligních onemocnění a 10 % hematologických onemocnění. Nejčastější výskyt tohoto onemocnění je u pacientů ve věku 60–65 let. Méně jak 2 % tvoří poté pacienti mladší 40 let. Vyšší incidence nemoci je prokázána u afro-karibské etnické skupiny obyvatel než je tomu

u kavkazské skupiny (UK Myeloma forum, 2001). I přes značný pokrok ve vývoji nových farmakologických přípravků nelze mnohočetný myelom vyléčit, dochází pouze k prodloužení kvality a délky života nemocných (Adam *et al.*, 2005; Dolloff *et al.*, 2012).

Stejně jako u jiných hematologických onemocnění je i mnohočetný myelom spojován s chromozomovými abnormalitami. Nejčastějšími strukturními přestavbami jsou reciproké translokace, které postihují gen pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgH) v oblasti chromozomu 14q32. Translokace vznikají procesem, tzv. nelegitimní switch rekombinace, kdy se vedle sebe dostávají části IgH genu, který obsahuje zesilovače transkripce, a onkogeny na jiném chromozomu. Vlivem zesilovačů dochází k narušení regulace onkogenů s následnou zvýšenou expresí, která vede k maligní transformaci B buňky (Kyle *et Rajkumar*, 2004; Němec *et al.*, 2008). Mezi nejčastější onkogeny, které jsou deregulovány primární translokací u myelomu, patří geny pro cykliny D1 a D3, jejichž zvýšená hladina u myelomových buněk podporuje zesílení proliferace (Shaughnessy *et al.*, 2001; Chesi, *et al.* 1996). Při sekundárních translokacích dochází obvykle k deregulaci Myc onkogenů, které způsobují zvýšení proliferace myelomových nádorů v pozdních stádiích progresu (Kuehl *et Bergsagel*, 2002). Bylo také prokázáno, že na přežití a růstu myelomových buněk má nedílnou část cytokin interleukin-6 (IL-6). IL-6 působí jako parakrinní faktor buněk mnohočetného myelomu a prostřednictvím aktivace signalizační kaskády STAT3 indukuje zvýšení exprese antiapoptických genů rodiny Bcl-2 (Oancea *et al.*, 2004).

Proteiny Bcl-2 rodiny hrají klíčovou roli v regulaci aktivace apoptosy, prostřednictvím interakcí proapoptických a antiapoptických proteinů této rodiny (Bouillet *et Strasser*, 2002). Členové Bcl-2 rodiny mohou být rozděleny do tří skupin na základě jejich struktury a funkce. Do proapoptické skupiny, označované jako „BH3- only“ proteiny, řadíme proteiny Bad, Bid, Bik, BIM, BMF, HRK, NOXA a PUMA, které přeměňují škodlivé podněty a buněčný stres v tzv. signál smrti. Další proapoptickou skupinou jsou proteiny Bax a Bak, které obsahují různé domény BH a jsou označovány jako multidoménné. A poslední skupinou jsou antiapoptické proteiny, které chrání buňku před různými cytotoxickými faktory, tím že inhibují buněčnou smrt a řadíme do nich proteiny Bcl-2, Mcl-1, Bcl- XL, Bcl-W a A1 (Zhang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Aktivace apoptické dráhy vede ke stimulaci BH3 proteinů, které přenáší apoptický signál dál přímou aktivací proapoptických proteinů Bcl-2 rodiny, nebo naopak inhibicí antiapoptických proteinů Bcl-2 rodiny (Taylor *et al.*, 2008). Rodina Bcl-2 proteinů hraje velmi důležitou roli v permeabilitě mitochondriální membrány. Proapoptické proteiny Bax a Bak jsou po aktivaci translokovány do membrány mitochondrie, kde oligomerizací

vytváří póry a dochází k uvolnění intermembránových proteinů, jako je cytochrom *c* do cytoplasmy. Cytochrom *c* poté tvoří s dATP, proteinem Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) a prokaspasou 9 komplex zvaný apoptosom, jehož funkcí je aktivace kaspasy 9 (Saelens *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2008). Následuje přenos signálu na efektorové kaspasy (např. kaspasa 3, 7), které štěpí buněčné substráty a způsobují tak morfologické změny, které jsou charakteristické pro apoptosu a vedou ke konečnému zániku buňky (Lawen, 2003; Rai *et al.*, 2005). Ukazuje se, že blokace aktivity antiapoptických proteinů Bcl-2 rodiny, například inhibicí interakce protein-protein nebo RNAi, zvyšuje citlivost myelomových buněk na apoptotické stimuly a stává se tak zajímavým cílem studia léčby mnohočetného myelomu a dalších hematopoetických malignit (Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Cheson, 2007).

Ze studií vyplývá, že u antiapoptického proteinu Mcl-1, jako u jediného člena rodiny Bcl-2 proteinů, je exprese regulována interleukinem IL-6 a dalším cytokinem interferonem- $\alpha$  (myeloid cell leukemia-1) (Jourdan *et al.*, 2000). Protein Mcl-1 se podílí na přežívání krvetvorných kmenových buněk a regulují indukci apoptosy u neutrofilů a eozinofilů, které mají krátký poločas rozpadu. Jsou také zapojeny do vývoje a udržování životaschopnosti T a B lymfocytů (Craig, 2002). Od ostatních členů Bcl-2 rodiny se Mcl-1 liší svou unikátní strukturou. Na rozdíl od jiných antiapoptických Bcl-2 proteinů, které jsou složené z cca 230 aminokyselin, je Mcl-1 protein, tvořený 350 aminokyselinovými rezidui, větší. Rozdíl ve velikosti je dán přítomností dvou sekvencí PEST (polypeptidové sekvence bohaté na prolin, glutamovou kyselinu, serin a threonin) u Mcl-1, místo obvyklé jedné. Sekvence PEST jsou odpovědné za krátký poločas rozpadu Mcl-1, jelikož obsahují regulační zbytky a motivy, včetně míst pro štěpení, ubikvitinaci a fosforylaci (Le Gouill *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2014). Protein Mcl-1, stejně jako ostatní členové Bcl-2 rodiny, patří mezi onkogeny, jejichž mutace podporují tumorogenezi, ochranu buňky vůči apoptickým signálům a také rezistenci na chemoterapii a radioterapii (Le Gouill *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2014). V normálních buňkách je hladina Mcl-1 přísně regulovaná na transkripční, posttranskripční a posttranslační úrovni, a navíc také degradováno prostřednictvím ubiquitin- dependentní dráhy. U nádorových buněk však dochází k deregulaci a nadměrné expresi tohoto proteinu (Warr *et al.*, 2008). Je dokázáno, že na přežití buněk mnohočetného myelomu má větší vliv protein Mcl-1, než ostatní antiapoptické proteiny Bcl-XL a Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2002; Derenne *et al.*, 2002). Inhibice aktivity Mcl-1 vede k rychlé indukci apoptosy myelomových buněk (Manohar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2002). Jedním ze způsobů, jak navodit snížení hladin Mcl-1 proteinu je inhibice transkripce prostřednictvím inhibice CDK9, která fosforyluje RNA polymerasu II



a stimuluje tak elongaci transkripce. Vzhledem k tomu, že protein Mcl-1 má velmi krátký poločas rozpadu, tak tato inhibice vede ke snížení hladiny jak mRNA, tak i proteinu a v buňce dochází k rychlému navození apoptosy (MacCallum *et al.*, 2005).

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem experimentální části diplomové práce bylo charakterizovat biologický vliv nového inhibitoru LGR3874 na regulaci transkripce, apoptosy a expresi nádorového supresoru p53 u nádorových linií MCF-7 a U-266 *in vitro* a ověřit jeho selektivitu k CDK9.

## 4 PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Přístrojové vybavení

Při zpracování diplomové práce bylo využito následující přístrojové vybavení laboratoře: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo), mikroskop Nikon TMS (Nikon), centrifuga BR4i (Jouan), váhy 440-33N (Kern), magnetické míchadlo MR-1000 Hei-Mix S (Heidolph), vodní lázeň, třepačka Reax top (Heidolph), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční vyvolávací automat LAS 4000 (FujiFilm), fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems), průtokový cytometr Cell Lab Quanta<sup>TM</sup> SC - MPL (Beckman Coulter), termocycler TC-512 (Techne), spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), elektroforetický zdroj EC 105 (E-C Aparatus Corporation),.

#### 4.1.2 Použité chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie: od firmy Sigma Aldrich- thylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), trypsin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), dimethylsulfoxid (DMSO), tetramethylethyldiamin (TEMED), kultivační médium RPMI 1640, hovězí sérový albumin (BSA), penicilin, streptomycin, glutamin, aprotinin, leupeptin, fluorid sodný, akrylamid, N,N'-metylenbisakrylamid, peroxodisíran amonný, hydroxid draselný, Nonidet P-40, Triton X-100, propidiumjodid, ribonukleáza A, bromfenolová modř, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-LEHD-AMC); od firmy Lach-ner- kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, dodecylsírán sodný (SDS), glycerol; od firmy MP Biomedicals- tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Tween 20, piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES), glycin; od firmy Thermo Scientific- chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid; od firmy Chemapol- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; od firmy Penta- Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·12H<sub>2</sub>O, ethanol, chlorid draselný; od firmy Serva- Ponceau S, 2-merkapt ethanol; od firmy Thermo Scientific- chemiluminiscenční kit se substráty peroxid a luminol.

### 4.1.3 Použité roztoky

Při provedení experimentů byly použity následující roztoky:

PBS- 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin

Činidlo Bradfordové- 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% etanol, 85% kyselina fosforečná

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

Elektroforetický pufr- 25 mM TRIS, 192 mM glycín, 0,1% SDS

Blotovací pufr- 25 mM TRIS, 192 mM glycín

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

Ponceau S- 0,2% v 1% kyselině octové

Reakční pufr pro stanovení aktivity kaspasy 3 a 7- 25 mM PIPES (pH = 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT

Reakční pufr pro stanovení aktivity kaspasy 9- 100 mM HEPES (pH = 7,5), 0,5 mM EDTA, 20% glycerol, 5 mM DTT

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

### 4.1.4 Použité protilátky

Za účelem provedení experimentů, byly použity následující protilátky:

Od firmy Santa Cruz Biotechnology myší monoklonální protilátky rozlišující proteiny PARP-1 (klon F2), proteiny Bcl-2 (klon 100 ), β-aktin (klon C4), CDK1, CDK2, CDK9 a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein Mcl-1 (klon S-19); od firmy od firmy Cell Signaling myší monoklonální protilátka rozlišující protein Rb (klon 4H1) a králičí polyklonální protilátky rozlišující proteiny fosfo-Rb Ser780, fosfo-Rb Ser807/811, XIAP, kaspasa 3, kaspasa 7, kaspasa 9; od firmy Bethyl Laboratories králičí polyklonální protilátky rozlišující proteiny fosfo-RNA polymerasa II (S2) a (S5); od firmy Chemicon myší monoklonální protilátka rozlišující celkovou RNA polymerázou II (klon ARNA-3); od firmy Sigma Aldrich myší monoklonální protilátka rozlišující tubulin (klon DM1A) a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein fosfo-Rb Ser 612; od Dr. B. Vojtěška z Masarykova

onkologického ústavu v Brně byla použita myší monoklonální protilátka rozlišující protein p53 (klon DO-1).

Po western blottingu byly primární protilátky vizualizovány pomocí sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou RAM/Px (rabbit anti-mouse) a SWAR/Px (swine anti-rabbit) od firmy Sigma Aldrich.

#### **4.1.5 Použité buněčné linie**

Za účelem experimentálního testování látky LGR3874 byly použity nádorové buněčné linie MCF-7 a U-266.

Adherentní buněčná linie MCF-7 je odvozená od adenokarcinomu prsu. Vlastností těchto buněk je, že neexprimují kaspasu 3 vlivem mutace v CASP -3 genu (Jänicke *et al.* 1998). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s přídavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu (0,1 mg/ml), penicilinu (0,1 U/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml). Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

Suspenní buněčná linie U-266 je odvozená od mnohočetného myelomu. U této buněčné linie dochází k expresi mutovaných proteinů p53 (Rowley *et al.*, 2000) a Rb (Juge-Morineau *et al.*, 1997). Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 doplněném o 10% fetální bovinní sérum, streptomycin (0,1 mg/ml), penicilin (0,1 U/ml) a L-glutamin (0,3 mg/ml).

#### **4.1.6 Použité inhibitory**

V praktické části diplomové práce byly studovány biologické účinky inhibitoru LGR3874. Tento inhibitor byl poskytnut kolegy z firmy Vichem Chemie Ltd., Budapest 1022, Hungary, kteří se dlouhodobě zabývají designem a syntézou CDK9-selektivních inhibitorů (Németh *et al.*, 2014; Németh *et al.*, 2011).

Inhibitor byl připraven jako 100 mM roztok v DMSO a dle potřeby při experimentech byl ředěn v DMSO na požadované koncentrace.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Ovlivnění nádorových buněčných linií, sklizení a lyzace

Buněčné linie MCF-7 určené pro experimenty byly po dobu 24 hodin ponechány adherovat ke dnu kultivační misky. Kultivace jak MCF-7, tak suspenzní buněčné linie U-266 probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Poté bylo kultivační médium vyměněno za médium obsahující testovanou látku o dané koncentraci a buňky byly takto inkubovány dalších 24 hodin. Příslušné koncentrace byly dosaženy rozpuštěním testovací látky v DMSO. K buňkám sloužícím jako kontrola bylo přidáno kultivační médium doplněné pouze o DMSO, bez testovací látky.

Pro analýzu metodou western blotting a metodou fluorimetrického stanovení aktivity kaspas 3, 7 a 9 byly buňky MCF-7 mechanicky seškrábány ze dna kultivační misky pomocí škrabky, centrifugovány při 4 °C, 1000 g po dobu 8 minut, buňky U-266 byly přeneseny z kultivační misky do zkumavky a následně také centrifugovány při 4 °C, 1000 g po dobu 8 minut. Následně byly promyty roztokem PBS. Promývací roztok byl odsán a získané buněčné pelety byly uskladněny při -80 °C. Buňky byly lyzovány v lyzačním pufru RIPA po dobu 25 minut na ledu (každých 5 minut docházelo k resuspendování) a sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 4 °C, 14 000 rpm 25 minut. Supernatant byl odebrán a použit pro měření koncentrace proteinů spektrofotometrickou metodou Bradfordové (Bradford, 1976) při 595 nm. Vzorky byly naředěny příslušným množstvím lyzačního pufru pro vyrovnání koncentrace proteinů ve vzorcích. K lyzátům byl přidán roztok 5x SDS (1/4 celkového objemu) a poté byly denaturovány 5 minut při 95 °C.

Pro analýzu buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie byly MCF-7 buňky sklizeny trypsinizací. Veškeré kultivační médium bylo přeneseno do zkumavky a buňky byly opláchnuty roztokem EGTA, který byl také přenesen do zkumavky. Do misky byl přidán trypsin pro uvolnění buněk ze dna a následovala 10 minutová inkubace při 37 °C. Poté byla miska opláchnuta čistým médiem a celý obsah misky opět přenesen do zkumavky. Buňky U-266 byly převedeny z kultivační misky do zkumavky. Vzorky byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C, promyty 2x v roztoku PBS. Buňky byly zafixovány pomalým přidáváním vychlazeného 70% ethanolu a uchovány při -20 °C do druhého dne.

#### **4.2.2 SDS-PAGE a western blotting**

Podle molekulové hmotnosti sledovaných proteinů probíhala elektroforetická separace v 10% nebo 15% SDS-polyakrylamidovém gelu, doplněném 5% zaostřovacím gelem. Separace proteinů probíhala nejprve cca 30 minut při napětí 80 V, ve chvíli kdy proteiny vstoupily do oblasti dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Poté byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu pomocí metody western blotting. Přenos probíhal 2 hodiny při proudu 270 mA a za stálého chlazení ledovými bloky. Membrána s proteiny byla následně obarvena v roztoku PONCEAU S a podle molekulových hmotností naneseného markeru byly z membrány vyříznuty proužky se sledovanými proteiny. Tyto membrány byly poté hodinu blokovány při pokojové teplotě v roztoku 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20. Na membrány byly nanесeny roztoky specifických primárních protilátek s blokovacím pufrém a byly inkubovány přes noc při 4 °C. Po inkubaci byly membrány promyty v TBS a TBS/Tween a 1 hodinu inkubovány při laboratorní teplotě v roztoku blokovacího pufru se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou. Po dalším promytí v TBS a TBS/Tween byla provedena vizualizace s použitím chemiluminiscenčního kitu ECL a analyzátoru LAS400 (FujiFilm).

#### **4.2.3 Průtoková cytometrie**

Pro analýzu buněčného cyklu byla použita fluorescenční sonda propidium jodid, která se inkorporuje do dsDNA. Po inkorporaci a ozáření světlem o vlnové délce 488 nm dochází k excitaci a následné emisi záření o vlnové délce 575, která stechiometricky odpovídá množství DNA v buňce. Celý průběh je detekován a analyzován softwarem Quanta Collection a Quanta Analysis (oba Beckman Coulter).

Buňky fixované v 70% ethanolu byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C, buněčný pelet byl promyt v 1 ml PBS a po další 8 minutové centrifugaci došlo opět k resuspendování peletu v roztoku PBS, který obsahoval 20 µl RNAsy (konečná koncentrace 200 µg/ml) a 10 µl propidium jodidu (konečná koncentrace 10 µg/ml). Vzorčky byly inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě a průběžně vortexovány. Následně probíhala analýza buněčného cyklu na průtokovém cytometru, který sledoval relativní změny v obsahu DNA.

#### **4.2.4 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3, 7 a 9**

Metoda je založená na proteolytickém štěpení specifických peptidových substrátů pro kaspasy 3/7 a kaspasu 9. Při štěpení dochází k uvolnění fluorescenční značky AMC (7-amido-4-

methylokumarin), která po excitaci světla o vlnové délce 346 nm emituje záření o vlnové délce 442 nm, které je zaznamenáno detektorem.

Lyzáty buněk byly napipetovány do mikrotitrační destičky v takovém množství, které odpovídalo 15  $\mu\text{g}$  proteinů., a poté bylo přidáno reakční pufr se substrátu Ac-DEVD-AMC (100  $\mu\text{M}$ ) pro stanovení aktivity kaspasy 3/7 a Ac-LEHD-AMC (100  $\mu\text{M}$ ) pro stanovení aktivity kaspasy 9. Mikrotitrační destičky se vzorky byly poté inkubovány při laboratorní teplotě, ve tmě a v daných časových intervalech byla měřena fluorescence při 346/442 nm pomocí fluorescenčního readeru Fluoroskan Ascent od firmy Labsystems. Pro konečné stanovení relativní aktivity kaspas ve vzorcích byla měřena autolýza substrátu v lyzačním pufru (negativní kontrola).



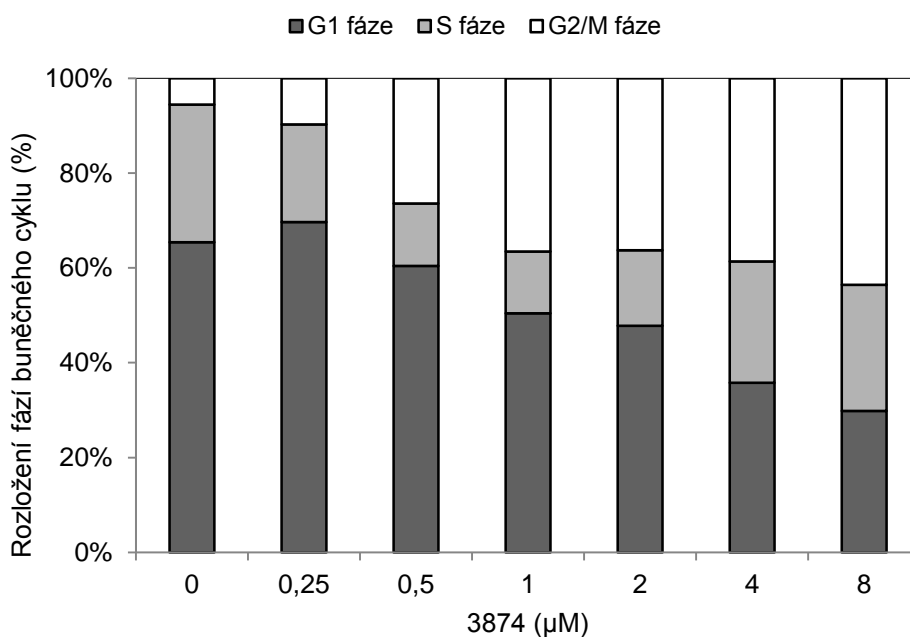
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Vliv látky LGR3874 na nádorovou buněčnou linii MCF-7

#### 5.1.1 Analýza buněčného cyklu

Pro zjištění změn distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, byla využita metoda průtokové cytometrie. Asynchronní buněčná linie MCF-7 byla po dobu 24 hodin inkubována s látkou LGR3874 v rozdílných koncentracích. Z výsledků je patrné, že se zvyšující se koncentrací látky LGR3874 docházelo k postupnému poklesu buněk v G1 fázi a zároveň k navýšení počtu buněk v G2/M fázi. V porovnání s neovlivněnými buňkami je patrný pokles počtu ovlivněných buněk v S fázi u koncentrací 0,25-1  $\mu\text{M}$ .

Výsledky z analýzy buněčného cyklu dokazují, že inhibitor LGR3874 má vliv na průběh buněčného cyklu. Podobný efekt na buněčný cyklus byl zaznamenán u nádorových linií HCT-116 po působení inhibitorů CDKI-71 a flavopiridolu. Tyto inhibitory se vyznačují selektivitou k CDK9 a předpokládá se u nich, že hlavní cytotoxicita není založena na bloku buněčného cyklu (Liu *et al.*, 2011).

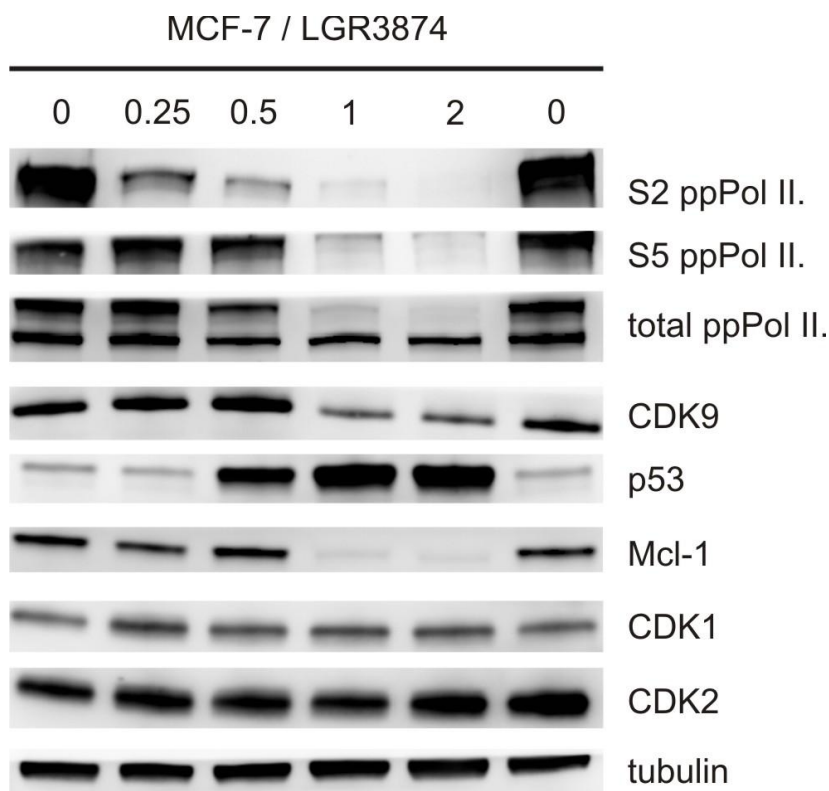


Obr. 6: Histogram procentuálního zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu asynchronních buněk MCF-7 po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR3874. Data získaná z analýzy buněčného cyklu byla hodnocena pomocí programu Multicycle AV for Windows (Phoenix Flow Systems).

### 5.1.2 Analýza exprese vybraných proteinů

V dalších experimentech byly sledovány změny v expresi vybraných proteinů, u nádorové linie MCF-7 po ovlivnění látkou LGR3874, pomocí metody SDS-PAGE a následného western blottingu. Pro zjištění vlivu inhibice CDK9 na transkripci byla sledována hladina proteinů RNA polymerasy II, její fosfoformy S2 a S5, proteinu Mcl-1 a p53. Dále byl studován vliv látky LGR3874 na hladiny CDK1/2 a CDK9. Z výsledků je patrné, že již při koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$  látky LGR3874 dochází k viditelnému poklesu fosforylace RNA polymerasy II v pozici S2. Snížení hladiny fosforylace RNA polymerasy II v místě S5 bylo detekováno při koncentraci látky 1 a 2  $\mu\text{M}$  a plně koreluje se snížením hladiny fosforylované formy u celkové RNA polymerasy II. Pokles fosforylace RNA polymerasy II byl také potvrzen rapidním snížením antiapoptického proteinu Mcl-1, a navíc došlo k nárůstu tumor supresorového proteinu p53. Při vyšších koncentracích látky bylo zaznamenáno snížení hladin CDK9. Hladiny CDK1 a 2 zůstaly nezměněné.

Defosforylace CTD RNA polymerasy II v místech S5 a S2 s následnou inhibicí transkripce jsou v buňkách spojovány s inhibicí CDK9 a CDK7. Z výsledků vyplývá, že látka LGR3874 má již při nižších koncentracích inhibiční efekt na fosforylaci místa S2, jež je substrátem CDK9, a vykazuje tak možnou preferenční inhibici pro CDK9 než pro CDK7, jejíž substrátem je místo S5 RNA polymerasy II. V porovnání s výsledky z obdobného experimentu s inhibitorem CAN508, který má také vyšší selektivitu pro CDK9 (Kryštof *et al.*, 2011), vykazuje látka LGR3874 silnější inhibiční efekt na buněčnou linii MCF-7, jelikož k signifikantním změnám dochází již při koncentraci 0,25  $\mu\text{M}$ . Vlivem inhibice transkripce dochází v buňkách k rychlému úbytku proteinů s krátkým poločasem rozpadu. Jedním z takových proteinů je i antiapoptický protein Mcl-1 (Chen *et al.*, 2005), u kterého dle předpokladu došlo vlivem látky LGR3874 k poklesu hladiny. Dalším proteinem s krátkou dobou životnosti je ubiquitin ligasa MDM-2, která slouží jako negativní regulátor tumor supresorového proteinu p53. Inhibice transkripce vede k rychlému poklesu hladiny MDM-2 a následné akumulaci proteinu p53 (Kryštof *et al.*, 2006), což se také potvrdilo v tomto experimentu. Stejný buněčný efekt byl zaznamenán u inhibitorů flavopiridolu a roskovitinu (MacCallum *et al.*, 2005). Na rozdíl od CDK1 a 2, jejichž hladiny zůstaly v závislosti na koncentraci látky nezměněné, u CDK9 bylo viditelné rapidní snížení hladin při vyšších koncentracích. Pozorovaný pokles hladin CDK9 bude zřejmě dopadem inhibice fosforylace CDK9 vlivem inhibitoru. Studie totiž prokázaly, že CDK9 se v defosforylovaném a tedy neaktivním stavu vyznačuje krátkým poločasem rozpadu a je v buňkách rychle degradována na úrovni proteinu (Ramakrishnan *et al.*, 2012).



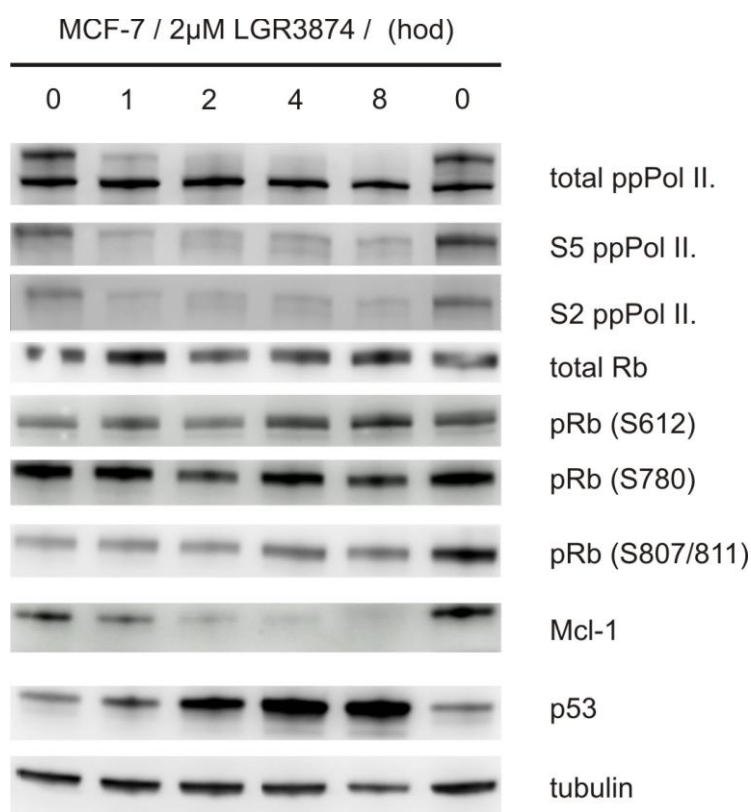
*Obr. 7: Analýza exprese proteinů RNA polymerasy II fosforylované v místech S2 a S5, celkové RNA polymerasy II, CDK9, p53 a na transkripci závislém antiapoptickém proteinu Mcl-1 v MCF-7 buňkách po 24 hodinovém ovlivnění látkou LGR3874. Protein tubulin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích.*

Pro ověření inhibičního efektu vůči CDK9 a zjištění kinetiky buněčných změn byly vybrány koncentrace 2 a 0,5  $\mu\text{M}$  látky LGR3874, při kterých byly pomocí analýzy western blottingu sledovány změny hladin proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu, transkripce a apoptosy po působení látky v různých časových intervalech.

Z výsledků je patrné, že po přidavku 2 $\mu\text{M}$  látky LGR3874 dochází prakticky k okamžitému inhibičnímu účinku na fosforylaci RNA polymerasy II a jejích fosfoforem S2 a S5. Tyto výsledky jsou ve shodě s poklesem hladiny na transkripci závislém proteinu Mcl-1 a se zvýšením hladin proteinu p53. Hladiny celkového proteinu Rb a jeho fosfoforem S612, S780 a S807/811 zůstaly ve všech časových intervalech nezměněny.

Jelikož během 8 hodinového působení látky LGR3874 nedocházelo k opětovnému navýšení hladin fosforylace RNA polymerasy II, jsou tyto výsledky ve shodě s výsledky z předešlého experimentu (Obr. 7). Dále byly studovány změny ve fosforylaci

retinoblastomového proteinu, který hraje klíčovou roli v přechodu G1 fáze do S fáze a je tak zapojen do regulace buněčného cyklu. Protein Rb v defosforylovaném stavu interaguje s transkripčním faktorem E2F a brání expresi genů nezbytných pro vstup do S fáze. Postupnou fosforylací Rb kinasami CDK4/6 a CDK2 dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F a následné aktivaci genů potřebných pro vstup do S fáze a syntézu DNA (Lim *et al.*, 2013). Protože během celého časového intervalu nedošlo k žádné výrazné změně a hladiny fosforylace zůstaly vyrovnané, dá se předpokládat, že látka LGR3874 při zvolené koncentraci neinhibuje CDK4/6 a CDK2.

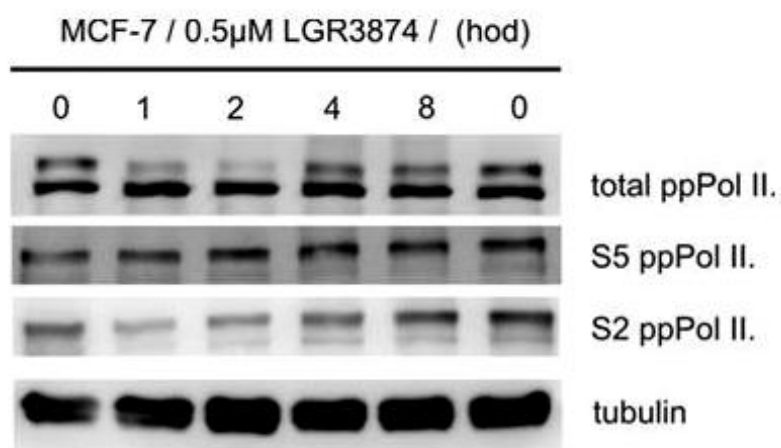


Obr. 8: Analýza exprese proteinů RNA polymerasy II fosforylované v místech S2 a S5, celkové RNA polymerasy II, p53, Mcl-1, proteinu Rb fosforylovaném v místech S612, S780 a S807/811 a celkového Rb v buněčné linii MCF-7 po ovlivnění látkou LGR3874 v koncentraci 2  $\mu$ M v různých časových intervalech. Protein tubulin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích.

V časovém experimentu s 0,5 $\mu$ M látkou LGR3874 byly analyzovány změny v hladinách proteinů RNA polymerasy II fosforylované v místech S2 a S5 a celkové RNA polymerasy II.

V případě celkové RNA polymerasy II bylo v časových intervalech 4 a 8 hodin zaznamenáno zvýšení hladin fosforylace. U její fosfoformy S5 zůstaly hladiny během celého časového intervalu nezměněny. Hladiny RNA polymerasy II fosforylované v pozici S2 vykazovaly postupný nárůst s délkou působení inhibitoru.

Výsledky ukazují, že během celého časového intervalu nedošlo k významným změnám v hladinách celkové RNA polymerasy II a RNA polymerasy fosforylované v místech S2 a S5, které by souvisely s jejich defosforylací vlivem testované látky. Pokles fosforylace byl zaznamenán až po 24 hodinovém působení inhibitoru (Obr. 7). V porovnání s experimentem s koncentrací 2  $\mu\text{M}$  tak vykazuje látka LGR3874 při nižší koncentraci pomalejší dynamiku inhibice fosforylace RNA polymerasy II a jejich fosfoform.



Obr. 9: Analýza exprese proteinů RNA polymerasy II fosforylované v místech S2 a S5, celkové RNA polymerasy II v buněčné linii MCF-7 po ovlivnění látkou LGR3874 v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  v různých časových intervalech. Protein tubulin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích

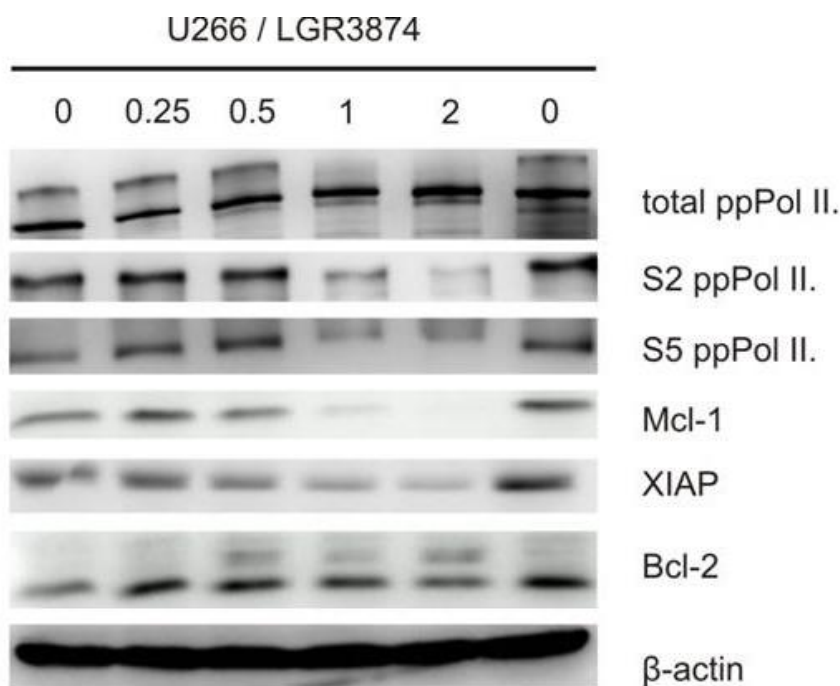
## 5.2 Proapoptické účinky látky LGR3874 na nádorovou buněčnou linii U-266

Účinky látky LGR3874, jakožto potencionálního inhibitoru CDK9, byly sledovány také na buněčných liniích mnohočetného myelomu U-266. Jak bylo uvedeno a blíže popsáno v kapitole 3.4., hematopoetické onemocnění mnohočetný myelom se vyznačuje nadměrnou expresí antiapoptického proteinu Mcl-1, který má velký vliv na přežití buněk mnohočetného myelomu (Warr *et Shore*, 2008; Zhang *et al.*, 2002). Zabránění exprese proteinu Mcl-1

prostřednictvím inhibice CDK9 se jeví jako slibný cíl při léčbě mnohočetného myelomu a proto byly biologické účinky látky LGR3874 testovány právě na tomto buněčném modelu.

Při analýze proapoptických účinků látky LGR3874 na buněčnou linii U-266 byl nejprve studován inhibiční vliv na regulaci transkripce. Pomocí metody western blottingu byly sledovány změny v hladinách proteinů RNA polymerasy II fosforylované v pozici S2 a S5, celkové RNA polymerasy II a antiapoptických proteinů Mcl-1, Bcl-2 a XIAP. Experiment prokázal snižující hladiny fosforem S2 a S5 RNA polymerasy II v závislosti na zvyšující se koncentraci látky LGR3874, což odpovídá klesajícímu trendu fosforylace u celkové RNA polymerasy II. Došlo také ke snížení hladin antiapoptických proteinů Mcl-1, XIAP a Bcl-2, u kterého byla navíc pozorována změna v hladině fosforylace.

Z výsledků vyplývá, že inhibitor LGR3874 vykazuje u buněk U-266 podobné inhibiční účinky na fosforylaci RNA polymerasy II jako v případě experimentu s buněčnou linií MCF-7 (Obr. 7). Snížení hladin fosforylace RNA polymerasy II v pozici S2 potvrdilo inhibici CDK9. Dále dle předpokladu došlo vlivem inhibice transkripce ke snížení hladin antiapoptických proteinů s krátkým poločasem rozpadu. Nejvyšší pokles hladiny byl pozorován u proteinu Mcl-1, který má mezi těmito antiapoptickými proteiny nejkratší poločas rozpadu (0,5-1 hod) vlivem přítomnosti sekvence PEST, která je zodpovědná za rychlou degradaci proteinu v buňkách (Le Gouill *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Tyto výsledky jsou v souladu s inhibičními mechanismy pan-selektivních inhibitorů roskovitinu a P276-00, které vykazují selektivitu k CDK9 (MacCallum *et al.*, 2005; Manohar *et al.*, 2011).



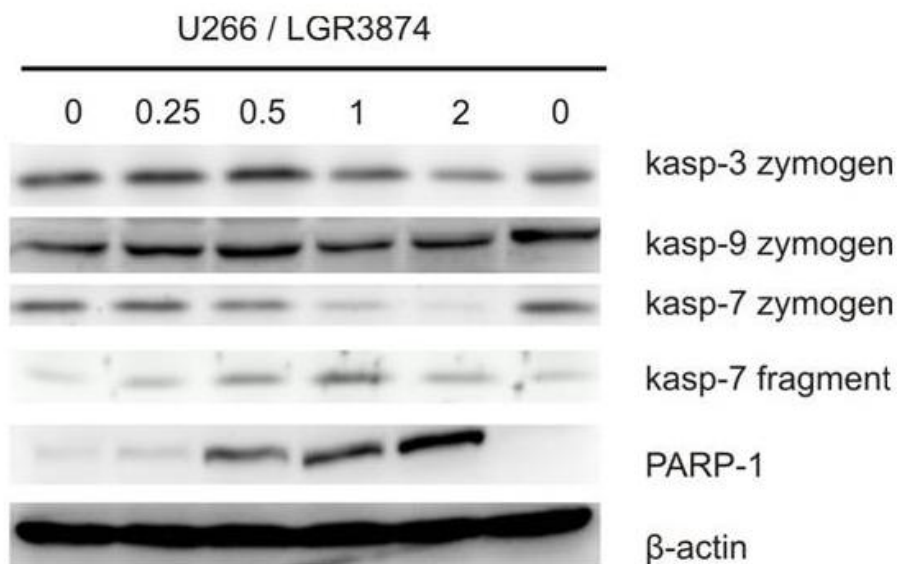
Obr. 10: Analýza exprese proteinů RNA polymerasy II fosforylované v místech S2 a S5, celkové RNA polymerasy II a antiapoptických proteinů Mcl-1, XIAP a Bcl-2 v buňkách U-266 po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR3874. Protein  $\beta$ -aktin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích.

### 5.2.1 Analýza iniciace apoptosy v závislosti na koncentraci látky LGR3874

Pro zjištění proapoptických účinků látky LGR3874 v různých koncentracích na buněčnou linii U-266 byly použity metody western blotting a fluorimetrické stanovení aktivity kaspas.

Analýzou western blottingu byly pozorovány změny v hladinách proteinu PARP-1 a kaspas 3, 7 a 9, které jsou v buňkách syntetizovány v neaktivní formě, tzv. zymogenu. V apoptických buňkách dochází proteolytickým štěpením zymogenů ke vzniku aktivních fragmentů kaspas (Cohen, 1997). Z výsledků vyplývá, že u všech tří zmiňovaných zymogenů kaspas, docházelo k plynulému poklesu hladin se zvyšující se koncentrací látky. U aktivní formy kaspasy 7, bylo nejvyšší hladiny exprese dosaženo při koncentraci 1  $\mu$ M. Dále byla sledována hladina substrátu aktivní formy kaspasy 3, proteinu PARP-1, který je v buňkách zapojený do procesů oprav DNA. V apoptických buňkách dochází ke štěpení celkového proteinu PARP-1 (113 kDa) na dva fragmenty- menšího 24 kDa a většího 89 kDa (Gobeil *et al.*, 2001), který byl v tomto experimentu detekován při koncentraci 0,5-2  $\mu$ M, kdy nejvyšší hladina proteinu odpovídala nejvyšší koncentraci látky LGR3874.

Detekce zvýšení hladin aktivované kaspasy 7 a proteinu PARP-1, který slouží jako marker apoptosy (Gobeil *et al.*, 2001), v tomto experimentu dokazují, že látka LGR3874 v buňkách U-266 indukuje mitochondriální dráhu apoptosy v závislosti na koncentraci.

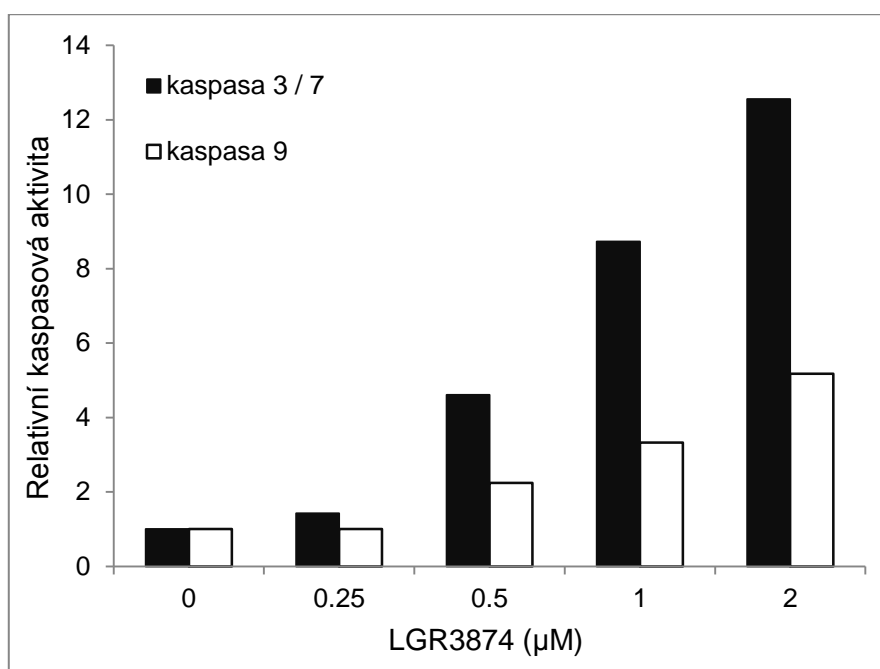


Obr. 11: Analýza exprese proteinů kaspasy 3, 7 a 9 zymogenu, kaspasy 7 fragmentu a PARP-1 v buňkách U-266 po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR3874. Protein  $\beta$ -aktin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích.

U buněk U-266 ovlivněných látkou LGR3874 v různých koncentracích byly dále sledovány proapoptické účinky pomocí fluorimetrického stanovení kaspas 3, 7 a 9. Získané absolutní hodnoty fluorescence byly normalizovány dle kontrolního vzorku a přepočteny na hodnoty relativní. Z výsledků měření vyplývá, že relativní aktivita kaspasy 3 a 7 rostla se vzrůstající koncentrací látky LGR3874. Nejvyšší aktivita byla proto zaznamenána při koncentraci 2  $\mu$ M. V případě kaspasy 9, nebyl nárůst aktivity tak rapidní jako u kaspasy 3 a 7, jelikož při koncentraci 0,25  $\mu$ M byla aktivita kaspasy 9 srovnatelná s aktivitou u kontrolních buněk neovlivněných látkou LGR3874, poté docházelo k pozvolné aktivaci této kaspasy.

Naměřené hodnoty odpovídají výsledkům z western blottingu (Obr. 11), kdy byl detekován pokles hladin neaktivních kaspas a naopak zvyšující se trend u aktivované kaspasy 7. Tato data dokazují, že látka LGR3874 vyvolává v buněčných liniích U-266 silnou aktivaci apoptosy po 24 hodinovém působení v závislosti na koncentraci inhibitoru. V porovnání s novým a nedávno publikovaným inhibitorem AAP1742, který má podobné inhibiční účinky na buněčné linie mnohočetného myelomu (Jorda *et al.*, 2014), vykazuje inhibitor LGR3874 proapoptické účinky již při nižších koncentracích a jeví se tak jako silnější inhibitor.





Obr. 12: Indukce apoptozy u nádorové buněčné linie U-266 po 24 hodinovém ovlivnění látkou LGR3874. Aktivita kaspas 3/7/9 v buněčných lyzátech byla měřena pomocí fluorogenního substrátu Ac-DEVD-AMC nebo Ac-LEHD-AMC, po 5 hodinové inkubaci.

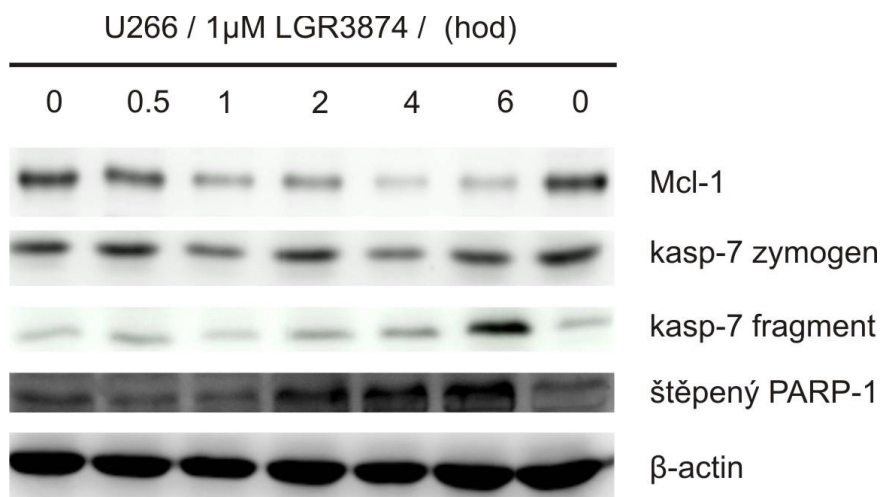
### 5.2.2 Analýza aktivace apoptozy v závislosti na délce působení látky LGR3874

Pomocí metod western blotting a fluorimetrického stanovení aktivity kaspas byla u buněčné linie U-266 sledována kinetika indukce apoptozy vlivem látky LGR3874 ve vybrané koncentraci 1 μM.

Metodou western blottingu byla sledována hladina exprese vybraných proteinů, zapojených do regulace apoptozy. Již po půlhodinovém působení látky LGR3874 byl detekován plynulý pokles hladiny antiapoptického proteinu Mcl-1. V případě neaktivní formy kaspasy 7 bylo zaznamenáno snížení hladiny v čase 1 a 4 hodiny, v ostatních časových intervalech byly hladiny toho proteinu srovnatelné s těmi u buněk neovlivněných látkou LGR3874. U aktivní formy kaspasy 7 došlo k viditelnému nárůstu hladiny pouze po 6 hodinovém působení látky. Fragment proteinu PARP-1 byl zaznamenán v časech 2–6 hodin, kdy nejvyšší hladina odpovídala nejdelšímu časovému intervalu působení látky.

Výsledky dokazují, že nárůstu hladin apoptických markerů, v tomto případě aktivované kaspasy 7 a proteinu PARP-1, předcházelo snížení hladiny antiapoptického proteinu Mcl-1,

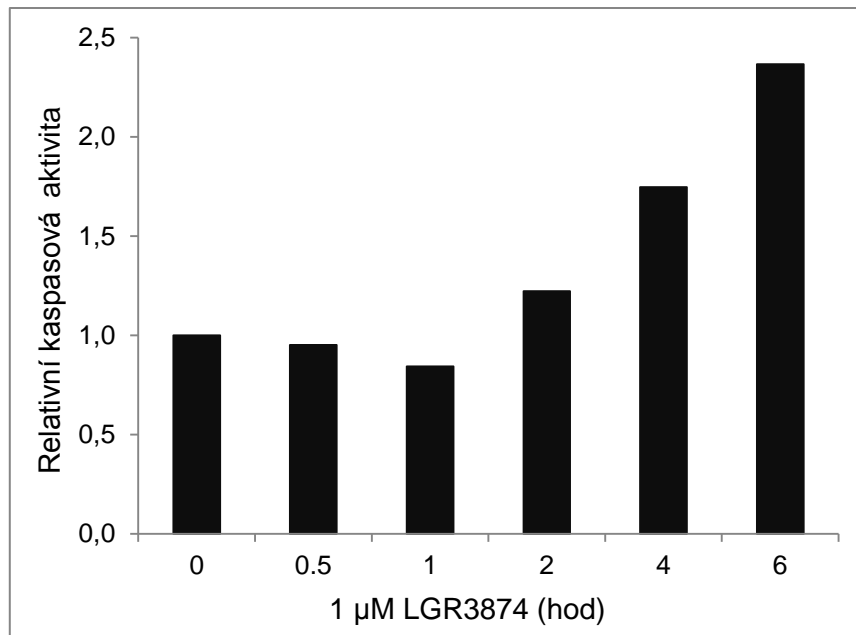
kteří je výsledkem inhibice transkripce. Dle předpokladu tak látka LGR3874 v buňkách mnohočetného myelomu indukuje apoptosu vlivem transkripční inhibice.



*Obr. 13: Analýza exprese vybraných apoptických proteinů v buňkách U-266 po ovlivnění 1μM látkou LGR3874 v uvedených časech. Protein β-aktin byl použit jako kontrola pro ověření rovnoměrné hladiny proteinů ve vzorcích.*

Pro ověření proapoptických účinků látky LGR3874 v koncentraci 1 μM na nádorovou buněčnou linii U-266, byla fluorimetrickým měřením stanovena aktivita kaspasy 3/7. V časech 0,5 a 1 hodina byla zaznamenána klesající aktivita kaspasy 3. V následujících časech došlo k nárůstu aktivity této kaspasy, kdy nejvyšší aktivita byla detekována po 6 hodinovém působení látky LGR3874.

Z výsledků je patrné, že v průběhu 6 hodinového působení látky LGR3874 dochází k pomalé aktivaci kaspasy 3/7. Tyto výsledky se shodují s výsledky z analýzy hladin exprese pomocí metody western blottingu (Obr. 11). V porovnání s výsledky stanovení kaspasové aktivity (Obr. 12) je patrné, že po 24 hodinovém působení látky LGR3874 dochází k silné aktivaci kaspasy 7 a tady k silnějším proapoptickým účinkům. Z časových experimentů tedy vyplývá, že látka LGR3874 indukuje v buňkách U-266 apoptosu také v závislosti na čase.



*Obr. 14: Indukce apoptosy u nádorové buněčné linie U-266 po ovlivnění látkou LGR3874 v koncentraci 1 μM, v rozdílných časových intervalech. Aktivita kaspasy 3/7 v buněčných lyzátech byla měřena pomocí fluorogenního substrátu Ac-DEVD-AMC po 5 hodinové inkubaci.*

## 6 ZÁVĚR

Použitím několika nezávislých metod byly sledovány biologické účinky látky LGR3874, jakožto potencionálního inhibitoru CDK9 na buněčných liniích MCF-7 a U-266.

Z výsledků analýzy regulace transkripce vyplývá, že po ovlivnění obou buněčných linií látkou LGR3874 dochází ke snížení hladin fosforylace RNA polymerasy II s rostoucí koncentrací testované látky. Pokles fosforylace RNA polymerasy II v pozici S2 potvrdil buněčnou inhibici CDK9. Jelikož byl inhibiční efekt na fosforylaci místa S2 pozorován již při nižších koncentracích dá se předpokládat, že látka LGR3874 vykazuje možnou preferenční inhibici pro CDK9 než pro CDK7. Potlačení transkripce vlivem inhibice CDK9 bylo doprovázené snížením hladin proteinu s krátkým poločasem rozpadu Mcl-1 a akumulací tumor supresorového proteinu p53. Nezávislými metodami byly studovány proapoptické účinky látky LGR3874 na buněčných liniích mnohočetného myelomu U-266, jejichž přežití je závislé na kontinuální expresi antiapoptického proteinu Mcl-1. Výsledky ukázaly, že inhibice transkripce v buňkách mnohočetného myelomu po ovlivnění látkou LGR3874 vede k navození apoptosy v závislosti na koncentraci a délce působení.

Na základě výše uvedených poznatků z experimentů bylo potvrzeno, že inhibitor LGR3874 vykazuje selektivitu k CDK9 a jeho buněčné účinky jsou v souladu s dříve popsányými mechanismy roskovitinu, flavopiridolu nebo P276-00, které se také vyznačují inhibicí CDK9.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

Adam, Z., Hájek, R., Mayer, J., Ščudla, V., Vorlíček, J. *et al.* (1999): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie, pp. 461–463, Masarykova univerzita, Brno

Adam Z., Krejčí M., Penka M., Pour L., *et al.* (2005): Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu – zdrojová data použitá pro Doporučení České myelomové skupiny, Myelomové sekce České hematologické společnosti a expertů Slovenské republiky pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfúze a hematologie dnes* 11 (1): 12–51

Bai, L., Wang, S. (2014): Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med* 65: 139–55

Barboric, M., Yik, J. H., Czudnochowski, N., Yang, Z., Chen, R., Contreras, X., Geyer, M., Matija Peterlin, B., Zhou, Q. (2007): Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 35(6): 2003–12

Baumli, S., Hole, A. J., Noble, M. E., Endicott, J. A. (2012): The CDK9 C-helix exhibits conformational plasticity that may explain the selectivity of CAN508. *ACS Chem Biol* 7(5): 811–6

Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E. D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A. N., Debreczeni, J. E., Knapp, S., Johnson, L.N. (2008): The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *EMBO J* 27(13): 1907–18

Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J. A., Galons, H., Meijer, L. (2008): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27 (44): 5797–807

Blachly, J.S., Byrd, J.C. (2013): Emerging drug profile: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* 54(10): 2133–43

Bose, P., Simmons, G. L., Grant, S. (2013): Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 22(6): 723–38

Bösken, C. A., Farnung, L., Hintermair, C., Merzel Schachter, M., Vogel-Bachmayr, K., Blazek, D., Anand, K., Fisher, R. P., Eick, D., Geyer, M. (2014): The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nat Commun* 5:3505 doi: 10.1038/ncomms4505

Bouillet, P., Strasser, A. (2002): BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115(8): 1567–74

Carnero, A. (2002): Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer* 87(2): 129–33

Cohen, G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 (1): 1–16

- 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(4): 723–32
- Craig, R. W. (2002): MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16(4): 444–54
- Cruz, J. C., Tsai, L. H. (2004): A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 14(3): 390–4
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M.J., Harousseau, J. L., Bataille, R., Amiot, M. (2002): Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100: 194–199
- Doloff, N. G., Allen, J. E., Dicker, D. T., Aqui, N., Vogl, D., Malysz, J., Talamo, G., El-Deiry, W. S. (2012): Sangivamycin-like molecule 6 exhibits potent anti-multiple myeloma activity through inhibition of cyclin-dependent kinase-9. *Mol Cancer Ther* 11(11): 2321–30
- Fan, F., Tonon, G., Bashari, M. H., Vallet, S., Antonini, E., Goldschmidt, H., Schulze-Bergkamen, H., Opferman, J. T., Sattler, M., Anderson, K. C., Jäger, D., Podar, K. (2014): Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer Lett* 343(2): 286–94
- Garriga, J., Bhattacharya, S., Calbó, J., Marshall, R. M., Truongcao, M., Haines, D. S., Graña, X. (2003): CDK9 is constitutively expressed throughout the cell cycle, and its steady-state expression is independent of SKP2. *Mol Cell Biol* 23(15): 5165–73
- Garriga, J., Graña, X. (2004): Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 337: 15–23
- Giuliani, N., Colla, S., Rizzoli, V. (2004): New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Exp Hematol* 32(8): 685–91
- Gobeil, S., Boucher, C. C., Nadeau, D., Poirier, G. G. (2001): Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 8(6): 588–94
- Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P. P., Rosenblatt, J., Morgan, D. O., Giordano, A. (1994): PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3834–8
- Hájek, R., Krejčí, M., Pour, L., Adam, Z. (2011): Multiple myeloma. *Klinická onkologie* 24: 10–13
- Heuer, T. S. (2008): Discovery of selective CDK9 small molecule inhibitors: CDK9 inhibition in tumor cells is associated with inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *AACR-*

NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets, Cancer Therapeutics, Discovery, Biology and Clinical Applications. Geneva, Switzerland

Horn, H. F., Vousden, K. H. (2007): Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26(9): 1306–16

Chen, S., Dai, Y., Pei, X. Y., Myers, J., Wang, L., Kramer, L. B., Garnett, M., Schwartz, D. M., Su, F., Simmons, G. L., Richey, J. D., Larsen, D. G., Dent, P., Orlowski, R. Z., Grant, S. (2012): CDK inhibitors up-regulate BH3-only proteins to sensitize human myeloma cells to BH3 mimetic therapies. *Cancer Res* 72(16): 4225–37

Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V., Plunkett, W. (2005): Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 106(7): 2513–9

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(19): 4637–45

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Brents, L. A., Smith, C. M., Gerhard, D. S., Kuehl, W. M. (1996): Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 88: 674–681

Cheson, B. D. (2007): Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ther Clin Risk Manag* 3: 855–870

Chial, H. (2008): Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1: 33

Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., Porter, A. G. (1998): Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273(16): 9357–60

Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Voller, J., Sturc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistrík, M., Bártek, J., Strnad, M., Krystof, V. (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem* 54(8): 2980–93

Jorda, R., Navrátilová, J., Hušková, Z., Schütznerová, E., Cankař, P., Strnad, M., Kryštof, V. (2014): Arylazopyrazole AAP1742 Inhibits CDKs and Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells via Mcl-1 Downregulation. *Chem Biol Drug Des* doi: 10.1111/cbdd.12330

Jourdan, M., De, V. J., Mehti, N., Klein, B. (2000): Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ* 7: 1244–1252

Juge-Morineau, N., Harousseau, J. L., Amiot, M., Bataille, R. (1997): The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 24(3-4): 229–37

- Kesavapany, S., Li, B. S., Amin, N., Zheng, Y. L., Grant, P., Pant, H.C. (2004): Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochim Biophys Acta* 1697 (1-2): 143–53
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 23(9): 417–25
- Kohoutek, J. (2009): P-TEFb- the final frontier. *Cell Div* 4:19. doi: 10.1186/1747-1028-4-19
- Kryštof, V., Cankar, P., Frysová, I., Slouka, J., Kontopidis, G., Dzubák, P., Hajdúch, M., Srovnal, J., de Azevedo, W. F. Jr, Orság, M., Paprskářová, M., Rolcík, J., Látr, A., Fischer, P. M., Strnad, M. (2006): 4-aryloxy-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J Med Chem* 49(22): 6500–9
- Kryštof, V., Baumli, S., Fürst, R. (2012): Perspective of cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a drug target. *Curr Pharm Des* 18(20): 2883–90
- Kryštof, V., Chamrád, I., Jorda, R., Kohoutek, J. (2009): Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Med Res Rev* 30(4): 646–66
- Kryštof, V., Rárová, L., Liebl, J., Zahler, S., Jorda, R., Voller, J., Cankař, P. (2011): The selective P-TEFb inhibitor CAN508 targets angiogenesis. *Eur J Med Chem* 46(9): 4289–94
- Kryštof, V., Uldrijan, S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 11(3): 291–302
- Kuehl, W. M., Bergsagel, P. L. (2002): Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2: 175–187
- Kwak, H., Lis, J. T. (2013): Control of transcriptional elongation. *Annu Rev Genet* 47: 483–508
- Kyle, R. A., Rajkumar, S. V. (2004): Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 351(18): 1860–73
- Lam, L. T., Pickeral, O. K., Peng, A. C., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltneane, J. M., Averett, L. M., Zhao, H., Davis, R. E., Sathyamoorthy, M., Wahl, L. M., Harris, E. D., Mikovits, J. A., Monks, A. P., Hollingshead, M. G., Sausville, E. A., Staudt, L. M. (2001): Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2(10): RESEARCH0041.1-0041.11
- Lapenna, S., Giordano, A. (2009): Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8(7): 547–66
- Latronico, M. V., Elia, L., Condorelli, G., Catalucci, D. (2008): Heart failure: targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1643–1648
- Lawen, A. (2003): Apoptosis- an introduction. *Bioessays*. 25(9):888–96



- Le Gouill, S., Podar, K., Harousseau, J. L., Anderson, K. C. (2004): Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle* 3(10): 1259–62
- Lim, S., Kaldis, P. (2013): Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140(15): 3079–93
- Lin, X., Taube, R., Fujinaga, K., Peterlin, B. M. (2002): P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA. *J Biol Chem* 277(19): 16873–8
- Lips, D. J., de Windt, L. J., van Kraaij, D. J., Doevendans, P. A. (2003): Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: Alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 24: 883–896
- Liu, X. R., Shi, S. H., Lam, F., Pepper, C., Fischer, P. M., Wang, S. D. (2011): CDKI-71, a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cells compared to flavopiridol. *Int. J. Cancer* 130: 1216–1226
- Liu X1, Lam F, Shi S, Fischer PM, Wang S. (2011): In vitro antitumor mechanism of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor CDKI-83. *Invest New Drugs* 30(3): 889–97
- MacCallum, D. E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Lane, D. P., Green, S. R. (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 65(12): 5399–407
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630–641
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3): 153–66
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H., Wolgemuth, D. J. (2009): Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11(11): 1275–6
- Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., Bischoff, J. R. (2007): CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci* 29(1):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. *Leuk Res* 35: 821–830
- McInnes, C. (2008): Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discov Today* 13(19-20): 875–81

- Mikolcevic, P., Sigl, R., Rauch, V., Hess, M. W., Pfaller, K., Barisic, M., Pelliniemi, L. J., Boesl, M., Geley, S. (2012): Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Mol Cell Biol.* 32(4): 868–79
- Miller, D. M., Flaherty, K. T. (2014): Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* doi: 10.1111/pcmr.12211. [Epub ahead of print]
- Mishra, P. B., Lobo, A. S., Joshi, K. S., Rathos, M. J., Kumar, G. A., Padigar, M. (2013): Molecular mechanisms of anti-tumor properties of P276-00 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 11:42. doi: 10.1186/1479-5876-11-42
- Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* 374(6518): 131–4
- Morgan, D. O. (1997): Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261–91
- Mori, T., Anazawa, Y., Matsui, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., Arakawa, H. (2002): Cyclin K as a direct transcriptional target of the p53 tumor suppressor. *Neoplasia* 4(3): 268–74
- Narayanan, A., Sampey, G., Van Duyne, R., Guendel, I., Kehn-Hall, K., Roman, J., Curren, R., Galons, H., Oumata, N., Joseph, B., Meijer, L., Caputi, M., Nekhai, S., Kashanchi, F. (2012): Use of ATP analogs to inhibit HIV-1 transcription. *Virology* 432(1): 219–31
- Němec, P., Kuglík, P., Hájek, R. (2008): Úloha chromozomových translokací při vzniku a vývoji mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 21(2): 53–58
- Németh, G., Greff, Z., Sipos, A., Varga, Z., Székely, R., Sebestyén, M., Jászay, Z., Béni, S., Nemes, Z., Pirat, J. L., Volle, J. N., Virieux, D., Gyuris, Á., Kelemenics, K., Ay, E., Minarovits, J., Szathmary, S., Kéri, G., Orfi, L. (2014): Synthesis and evaluation of phosphorus containing, specific CDK9/CycT1 inhibitors. *J Med Chem* 57(10): 3939–65
- Németh, G., Varga, Z., Greff, Z., Bencze, G., Sipos, A., Szántai-Kis, C., Baska, F., Gyuris, A., Kelemenics, K., Szathmáry, Z., Minárovits, J., Kéri, G., Orfi, L. (2011): Novel, selective CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection. *Curr Med Chem* 18(3): 342–58
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M. A., Almasan, A. (2004): Apoptosis of multiple myeloma. *Int J Hematol* 80: 224–231
- Paprskářová, M., Kryštof, V., Jorda, R., Dzubák, P., Hajdúch, M., Wesierska-Gadek, J., Strnad, M. (2009): Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *J Cell Biochem* 107(3): 428–37
- Pavletich, N. P. (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287(5): 821–8
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., Price, D. H. (1998): Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12(5): 755–62

- Polier, G., Ding, J., Konkimalla, B. V., Eick, D., Ribeiro, N., Köhler, R., Giaisi, M., Efferth, T., Desaubry, L., Krammer, P. H., Li-Weber, M. (2011): Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. *Cell Death Dis* 2: e182
- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V. K. (2005): Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4(3): 138–44
- Raje, N., Kumar, S., Hideshima, T., Roccaro, A., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Chauhan, D., Munshi, N. C., Green, S. R., Anderson, K. C. (2005): Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* 106(3): 1042–7
- Ramakrishnan, R., Rice, A. P. (2012): Cdk9 T-loop phosphorylation is regulated by the calcium signaling pathway. *J Cell Physiol* 227(2): 609–17
- Romano, G. (2013): Deregulations in the cyclin-dependent kinase-9-related pathway in cancer: implications for drug discovery and development. *ISRN Oncol*: 305371. doi: 10.1155/2013/305371
- Romano, G., Giordano, A. (2008): Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle* 7(23): 3664–8
- Roussel, M. F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18(38): 5311–7
- Rowley, M., Liu, P., Van Ness, B. (2000): Heterogeneity in therapeutic response of genetically altered myeloma cell lines to interleukin 6, dexamethasone, doxorubicin, and melphalan. *Blood* 96(9): 3175–80
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16): 2861–74
- Sedore, S. C., Byers, S. A., Biglione, S., Price, J. P., Maury, W. J., Price, D. H. (2007): Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res* 35(13): 4347–58
- Shapiro, G. I. (2006): Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology* 24: 1770–1783
- Shaughnessy, J., Jr., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., Sawyer, J., Barlogie, B., Bergsagel, P. L., Kuehl, M. (2001): Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 98: 217–223
- Shima, D., Yugami, M., Tatsuno, M., Wada, T., Yamaguchi, Y., Handa, H. (2003): Mechanism of H-8 inhibition of cyclin-dependent kinase 9: study using inhibitor-immobilized matrices. *Genes Cells* 8(3): 215–23

- Shore, S. M., Byers, S. A., Maury, W., Price, D. H. (2003): Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* 307: 175–82
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 231–41
- UK myeloma forum. British Committee for Standards in Haematology (2001): Diagnosis and management of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 115: 522–540
- Vousden, K. H., Lane, D. P. (2007): p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 275–83
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S., Handa, H. (1998): DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12(3): 343–56
- Wang, S., Fischer, P. M. (2008): Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci* 29(6): 302–13
- Warr, M. R., Shore, G. C. (2008): Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Curr Mol Med* 8(2): 138–47
- Wesierska-Gadek, J., Kryštof, V. (2009): Selective cyclin-dependent kinase inhibitors discriminating between cell cycle and transcriptional kinases: future reality or utopia? *Ann N Y Acad Sci* 1171: 228–41
- Whittaker, S. R., Walton, M. I., Garrett, M. D., Workman, P. (2004): The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 64(1): 262–72
- Yu, D. S., Cortez, D. (2011): A role for CDK9-cyclin K in maintaining genome integrity. *Cell Cycle* 10(1): 28–32
- Yu, D. S., Zhao, R., Hsu, E. L., Cayer, J., Ye, F., Guo, Y., Shyr, Y., Cortez, D. (2010): Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Rep* 11(11): 876–82
- Zhang, B., Gojo, I., Fenton, R. G. (2002): Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* 99: 1885–1893
- Zhang, H., Park, S. H., Pantazides, B. G., Karpiuk, O., Warren, M. D., Hardy, C. W., Duong, D. M., Park, S. J., Kim, H. S., Vassilopoulos, A., Seyfried, N. T., Johnsen, S. A., Gius, D., Yu, D. S. (2013): SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(33): 13546–51

Zhang, L., Ming, L., Yu, J. (2007): BH3 mimetics to improve cancer therapy; mechanisms and examples. *Drug Resist Updat.* 10(6): 207–17

Zheng, D., Cho, Y. Y., Lau, A. T., Zhang, J., Ma, W. Y., Bode, A. M., Dong, Z. (2008): Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation. *Cancer Res* 68(18): 7650–60

Zhu, H., Doherty, J. R., Kulyev, E., Mead, P. E. (2009): CDK9/cyclin complexes modulate endoderm induction by direct interaction with Mix.3/mixer. *Dev Dyn* 238(6): 1346–57

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
Ac-LEHD-AMC	Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
AMC	7-amido-4-methylcoumarin
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia-Telanglectasia and Rad3-related
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl- W	B cell leukemia/lymphoma w
Bcl- XL	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMF	Bcl-2-modifying factor
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
BSA	Bovine serum albumin
CAK	CDK-activating kinase
Cdc37	cell division cycle 37
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKL	cyclin-dependent kinase-like
Cip/Kip	CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
CTD	C-terminal domain
c-Myc	Homolog of v-Myc myelocytomatosis viral oncogene
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DDR	DNA damage response

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRB	5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
DTT	Dithiothreitol
E2F	E2F transcription factor
ECL	Enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP	heat shock protein
HRK	protein harakiri
IC <sub>50</sub>	The half maximal inhibitory concentration
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IgH	Imunoglobulin H
IL-6	Interleukin 6
Mcl-1	Myeloid-cell leukemia 1
MDM2	Murine double minute 2
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NELF	negative elongation factor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
p35	Cyclin-dependent kinase 5 activator 1
p39	Cyclin-dependent kinase 5 activator 2
p53	Tumor supressor
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS	Phosphate buffered saline
PEST	peptide sequence of proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
P-TEFb	positive transcription elongation factor <i>b</i>
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rb	Retinoblastoma
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid
RPB1	RNA polymerase II subunit B1
RSR	Replication stress response
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFIIF	Transcription factor IIF
TFIIH	Transcription factor IIH
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis