

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cyklin-dependentní kináza 7 jako cíl
farmakologických inhibitorů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:	Bc. Ladislava Vymětalová
Vedoucí diplomové práce:	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 22.dubna 2011

„Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a také za cenné rady a komentáře. Dále děkuji Mgr. Radku Jordovi za poskytnuté konzultace a celému kolektivu pracovníků Laboratoře růstových regulátorů za vstřícný přístup, zejména pak Ditě Parobkové, Olze Hustákové a Janě Hudcové.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Ladislava Vymětalová
Název práce	Cyklin-dependentní kináza 7 jako cíl farmakologických inhibitorů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	Cyklin-dependentní kináza 7 (CDK7) je jako složka CDK-aktivačního komplexu důležitým regulátorem buněčného cyklu, neboť fosforylací threoninových reziduí v T-smyčce většiny CDK zajišťuje jejich aktivaci. Jako komponenta obecného transkripčního faktoru TFIIH ovšem reguluje také transkripční proces, jelikož fosforyluje postranní řetězce S5 a S7 v C-koncové doméně RNA polymerázy II složené z heptapeptidových repetitivních sekvencí bohatých na serin. Jejich fosforylace vede k aktivaci RNA polymerázy II a iniciaci transkripce. Pro studium účinnosti inhibitorů na enzymové úrovni byl CDK-aktivační komplex produkován bakulovirovým systémem a poté byla provedena jeho purifikace nízkotlakou kapalinovou afinitní chromatografií. Dále byl sledován vliv tří vybraných sloučenin jako potenciálních inhibitorů CDK7 na proliferaci a viabilitu buněčné linie MCF-7. Experimenty zahrnovaly také pozitivní kontroly na bázi siRNA.
Klíčová slova	Cyklin-dependentní kináza, cyklin, inhibitor, exprese, purifikace
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Ladislava Vymětalová
Title	Cyclin-dependent kinase 7 as a target for pharmacological inhibitors
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacky University & Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>Cyclin-dependent kinase 7 (CDK7) is as a part of CDK-activating complex an important regulator of the cell cycle, because it activates most of CDKs by phosphorylation of threonine residues in their T-loops. In addition, as a component of general transcription factor TFIIF it regulates transcription, since it phosphorylates side chains of S5 and S7 in the C-terminal domain of RNA polymerase II composed of serine-rich heptapeptide repeats. Phosphorylations of these residues lead to activation of RNA polymerase II and initiation of transcription. For biochemical studies with potential inhibitors the CDK-activating complex was produced using baculoviral system and purified by means of low pressure liquid affinity chromatography. Antiproliferative and cytotoxic activities of three selected potential inhibitors of CDK7 were evaluated in MCF-7 cell line. Experiments included also positive controls based on siRNA silencing.</p>
Keywords	Cyclin-dependent kinase, cyclin, inhibitor, expression, purification
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 8 -
TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
1. Úvod	- 10 -
2. Funkce, vlastnosti a struktura CDK-aktivačního komplexu a jeho komponent...-	11 -
2.1. Substrátová specifita CDK-aktivačního komplexu	- 13 -
2.2. Regulace aktivity CDK7	- 14 -
2.3. Organizmy s více enzymy plnícími funkci CDK7	- 14 -
2.4. Struktura CDK7	- 15 -
2.5. Struktura cyklinu H	- 17 -
2.6. Struktura MAT1	- 18 -
3. Farmakologická inhibice cyklin-dependentních kináz	- 20 -
3.1. Skupinově selektivní nízkomolekulární inhibitory regulátorů transkripce....-	21 -
3.2. Nízkomolekulární inhibitory s vysokou selektivitou pro CDK9 nebo CDK7...-	23 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 25 -
4. Materiál	- 26 -
4.1. Přístrojové vybavení	- 26 -
4.2. Použité chemikálie	- 26 -
4.3. Použité roztoky	- 27 -
4.4. Použité protilátky	- 27 -
4.5. Testované sloučeniny	- 28 -
4.6. Buněčné linie	- 28 -
4.7. Rekombinantní bakuloviry	- 29 -
5. Metody	- 30 -
5.1. Analýza buněčného cyklu	- 30 -
5.2. Stanovení titru bakulovirálních roztoků	- 30 -
5.3. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí nízkotlaké kapalinové afinitní chromatografie	- 31 -
5.4. Měření aktivity CDK7	- 31 -
5.5. Transfekce buněk	- 31 -
5.6. SDS-PAGE elektroforéza a imunoblotting	- 32 -
6. Výsledky	- 33 -
6.1. Stanovení titru bakulovirů a produkce rekombinantních proteinů	- 33 -
6.2. Purifikace rekombinantních proteinů cyklin H, MAT1 a CDK7	- 34 -
6.3. Vliv látek BA-09, LGR490 a LGR2629 na nádorovou buněčnou linii MCF-7 -	39 -
6.4. Vliv umlčení exprese CDK7 v nádorové linii MCF-7 pomocí siRNA	- 43 -

7. Diskuze.....	- 46 -
8. Závěr	- 50 -
9. Použitá literatura.....	- 51 -
10. Seznam použitých zkratek	- 60 -

Cíle práce

Cílem předkládané práce v teoretické rovině je (I) charakterizace CDK-aktivačního komplexu, a to jak z funkčního, tak i ze strukturního hlediska, (II) podání přehledu vývoje inhibitorů CDK jako sloučenin s terapeutickým potenciálem pro léčbu nádorových onemocnění a (III) popis antiproliferačních účinků inhibitorů transkripčních CDK. Cílem praktické části této práce je pak posoudit, zda (IV) nízkomolekulární inhibitory CDK ovlivňují aktivitu CDK7 a (V) nakolik se inhibice CDK7 projeví na jejich antiproliferačním vlivu. Mezi dílčí praktické úkoly proto patří purifikace CDK-aktivačního komplexu (složeného z rekombinantní CDK7, cyklinu H a MAT1) a studium vlivu vybraných potenciálních inhibitorů CDK7 na aktivační status RNA polymerázy II a hladinu proteinu p53 v buněčné linii MCF-7.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

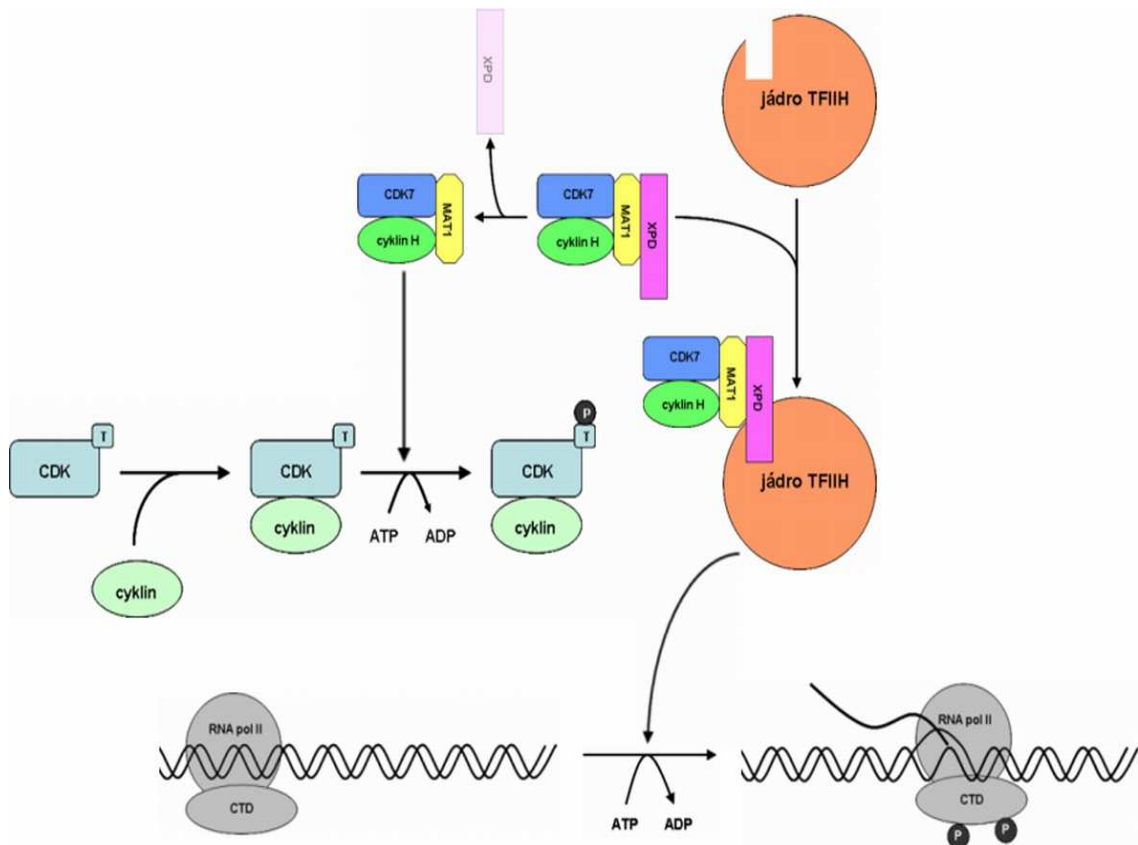
Geny kódující cyklin-dependentní kinázy (CDK) a příbuzné enzymy tvoří u člověka jen malý podíl kinomu (20 z 518), který sám o sobě představuje přibližně 2 % všech lidských genů (Malumbres & Barbacid, 2005; Manning, 2005). Stejně jako ostatní kinázy jsou CDK enzymy katalyzující přenos γ fosfátu z ATP na postranní řetězce Y, T nebo S cílového proteinu. Takový zásah potom vede ke změnám jeho konformace, lokalizace nebo asociace s jinými molekulami, a navíc souvisí fosforylace také se změnou aktivity daného proteinu. Už z názvu vyplývá, že aktivita CDK závisí na vazbě regulačních podjednotek, které jsou pravidelně syntetizovány a degradovány v určitých fázích cyklu, a proto získaly název cykliny. CDK hrají důležitou úlohu regulátorů buněčného dělení, kde kontrolují inaktivaci restričního bodu v G1 fázi, iniciaci DNA syntézy, vstup do mitotické fáze (Morgan, 1997), ale jsou i nedílnou složkou transkripčního aparátu RNA polymerázy II (Oelgeschläger, 2002). U mnohobuněčných organismů zastávají úlohu nejvýznamnějších regulátorů buněčného cyklu CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6 (Malumbres & Barbacid, 2005). CDK5 je důležitá pro správnou funkci nervového systému, zatímco CDK8 a CDK9 jsou zahrnuty v procesu transkripce (Malumbres & Barbacid, 2005). Zvláštní postavení zaujímá CDK7. Tato kináza totiž fosforyluje CDK, které kontrolují buněčný cyklus, ovšem jako komponenta obecného transkripčního faktoru TFIIH dokáže fosforylovat, a tím aktivovat RNA polymerázu II (Malumbres & Barbacid, 2005). Z naznačených faktů je tedy zřejmé, že pro správný průběh buněčného cyklu musí být zajištěna správná souslednost aktivit daných CDK. Jde o celou škálu regulačních mechanismů, jako jsou protein-proteinové interakce (asociace s cykliny, inhibitory a jinými faktory), buněčná lokalizace, transkripční kontrola, selektivní proteolýza a v neposlední řadě aktivační i inhibiční fosforylace (Kaldis, 1999).

Deregulace buněčného cyklu je charakteristickým znakem většiny nádorových onemocnění. Jedná se především o nežádoucí zvýšení aktivity CDK, které může být způsobeno bodovými mutacemi, delecemi nebo umlčením genů kódujících přirozené inhibitory CDK (Kryštof & Uldrijan, 2010). U některých typů nádorů byla pozorována i amplifikace určitých CDK a zřídka také mutace v jejich genech vedoucích k rezistenci na přirozené inhibitory CDK, a následně tudíž i ke konstitutivní aktivaci (Kryštof & Uldrijan, 2010). Dále může docházet ke zvýšené expresi cyklínů nebo CDK-aktivačních fosfatáz, což opět v důsledku zvyšuje aktivitu CDK, které poté nadměrně fosforylují své substráty, a umožňují tak buňkám proliferovat i v nevhodných podmínkách (Kryštof & Uldrijan, 2010). V současné době jsou CDK zkoumány z pohledu molekulární onkologie, neboť jejich inhibice prostřednictvím specifických

nízkomolekulárních inhibitorů může mít výrazný protinádorový efekt. Během posledních 20 let bylo navrženo a nasyntetizováno mnoho takových sloučenin s užší či širší specifitou pro určité CDK, a některé dokonce postoupily až do klinického testování (McInnes, 2008). CDK7 se pro svou duální funkci jako aktivátor ostatních CDK a zároveň transkripce jeví velmi slibným cílem nových terapeutik, jelikož by její inhibice mohla simultánně zastavit buněčný růst a zablokovat dělení nádorové buňky.

2. Funkce, vlastnosti a struktura CDK-aktivačního komplexu a jeho komponent

První zmínky o regulaci aktivity CDK pochází z počátku 90. let 20. století, kdy byla objevena fosforylovaná rezidua v aktivační smyčce (T-smyčce) CDK u obratlovců (Krek & Nigg, 1991). O rok později se podařilo *in vitro* zdetekovat v buněčných extraktech mnohobuněčných organismů aktivitu CDK-aktivační kinázy (CAK) (Desai et al., 1992). Purifikací CAK z extraktů živočišných buněk byl následně identifikován komplex CDK7/cyklin H (Fesquet et al., 1993). CDK7 (p40^{MO15}) byla ovšem původně popsána jako negativní regulátor zrání oocytů *Xenopus laevis* (Shuttleworth et al., 1990). Teprve v dalších studiích se prokázalo, že je CDK7 podjednotkou CDK-aktivačního komplexu u *Xenopus laevis* (Poon et al., 1993), *Marthasterias glacialis* (Fesquet et al., 1993), *Mus musculus* (Matsuoka et al., 1994), *Homo sapiens* (Darbon et al., 1994), *Saccharomyces pombe* (Buck et al., 1995) a *Drosophila melanogaster* (Larochelle et al., 1998). Imunoprecipitací lidské formy CDK7 pomocí monoklonální protilátky bylo objeveno stechiometrické množství dalších dvou proteinů o velikosti 37 a 32 kDa navázaných na enzym (Tassan et al., 1994), které byly identifikované jako cyklin H a MAT1 (ménage à trois 1) (Kaldis, 1999). Předpokládaná funkce CDK7 jako enzymu aktivujícího fosforylací jiné CDK byla potvrzena dvěma nezávislými experimenty. Inaktivace CDK7 u *Drosophila melanogaster* měla za následek pokles fosforylace T-smyčky CDK1, což způsobilo zablokování mitózy u zárodečné linie a také embryonální a larvální letalitu (Larochelle et al., 1998). U *Caenorhabditis elegans* způsobila teplotně podmíněná mutace v *cdk7* redukci transkripce a vyřazení funkce CDK7 prostřednictvím RNA interference zastavení buněčného cyklu (Wallenfang & Seydoux, 2002). Zapojení CDK7 do transkripčního procesu bylo objasněno už v roce 1994, kdy byla popsána její asociace s obecným transkripčním faktorem TFIIF a následná fosforylace C-koncové domény (CTD, C-terminal domain) RNA polymerázy II (Roy et al., 1994). Interakce mezi komplexem CDK7/cyklin H/MAT1 a TFIIF



Obrázek 1: Funkce CDK7 při aktivaci CDK a transkripci genů (přepřacováno podle Fisher, 2005 a Węsierska-Gądek & Kryštof, 2009).

je zprostředkována vazbou MAT1 na protein ERCC2 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2), známý také jako helikáza XPD (xeroderma pigmentosum D), která následně asociuje s dalšími podjednotkami TFIIH (Obr.1) (Busso et al., 2000). Pomocí imunofluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že je CDK7 u interfázních buněk lokalizována v jádře (Kaldis, 1999), což souvisí pravděpodobně právě s vazbou komplexu k helikáze XPD, přičemž po její degradaci mezi profází a metafází je komplex uvolněn a může aktivovat CDK potřebné pro průchod mitózou (Obr.1) (Fisher, 2005).

Doposud byly provedeny analýzy funkcí cyklinu H a MAT1 pouze na myších modelech. U MAT1-deficientních embryí došlo k poklesu hladin CDK7 a cyklinu H, přičemž byla tato mutace pro embrya letální (Rossi et al., 2001). Postnatální delece MAT1 v myokardu vedla k dysfunkci mitochondrií a následnému selhání srdce (Sano et al., 2007) a ablaci MAT1 ve varlatech zase ke ztrátě spermatogoniálních kmenových buněk (Korsisaari et al., 2002). Ztráta MAT1 u embryonálních kmenových buněk ovšem nepostihla jejich viabilitu či pluripotenci a nedošlo ani k poklesu hladin CDK7 a cyklinu H (Patel & Simon, 2010). Tato pozorování vedou k závěrům, že MAT1 může být důležitou komponentou v raném embryonálním i postnatálním vývoji, zatímco

jeho přítomnost není nezbytná pro viabilitu embryonálních kmenových buněk. MAT1 tudíž pravděpodobně moduluje substrátovou specifitu CDK-aktivačního komplexu a transkripční programy vyžadované daným typem buňky (Patel & Simon, 2010). Delece cyklinu H u myších embryonálních kmenových buněk indukuje jejich diferenciaci a pokles CDK7 i MAT1 (Patel & Simon, 2010). Jelikož hladiny *mat1* a *cdk7* transkriptů nebyly výrazně snižené, lze předpokládat, že pokles zmíněných proteinů bude způsoben jejich posttranslační degradací (Patel & Simon, 2010). Tyto molekuly, které spolu netvoří komplex, mohou být totiž jako monomery nestabilní, a cyklin H se tak zdá být klíčový pro stabilitu CDK-aktivačního komplexu (Patel & Simon, 2010). Překvapivě ovšem nedošlo ke změnám v buněčném cyklu. Většina buněk zůstala v S fázi, což je pro embryonální kmenové buňky typické, a nebyly pozorovány ani změny ve fosforylaci CDK1 a CDK2, které jsou substráty CDK7 (Patel & Simon, 2010). Možným vysvětlením může být fakt, že i reziduální aktivita CDK7 je dostačující pro plnění funkcí CDK-aktivačního komplexu. Teprve po delším časovém intervalu byl pozorován vzestup frakcí buněk v G1 a G2 fázích, což je nespíš způsobeno diferenciací buněk (Patel & Simon, 2010).

2.1. Substrátová specifita CDK-aktivačního komplexu

CDK7 je schopná fosforylovat celou řadu substrátů. Jedná se o regulátory buněčného cyklu CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 (Kaldis, 1999), ale také o komponenty transkripčního aparátu CTD RNA polymerázy II (Feaver et al., 1994), TFIIE, TFIIIF (Yankulov & Bentley, 1997), receptor retinoové kyseliny RAR α (retinoic acid receptor α) (Rochette-Egly et al., 1997), oktamerární transkripční faktor Oct-1 (organic cation transporter 1) (Inamoto et al., 1997), estrogenový receptor ER (Chen et al., 2000), Ets1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)) (Drané et al., 2004), transkripční faktor E2F-1 (Vandel & Kouzarides, 1999) a také nádorový supresor p53 (Lu et al., 1997). CDK7 je selektivní pro S5 a S7 uvnitř repetitivní sekvence YSPTSPS, která je základním motivem CTD tvořené jejími 52 opakováními (Lolli et al., 2004). Fosforylace S5 byla primárně detekována v promotorových oblastech genů a je důležitá pro interakci transkripčního aparátu s enzymy modifikujícími 5' konec nascentní mRNA navázáním N⁷-methylguaninu (Komarnitsky et al., 2000). Fosforylace S7 byla identifikována poměrně nedávno a je důležitá pro expresi snRNA (Egloff et al., 2007). CDK7 fosforyluje S5 efektivně v samotném heptapeptidu, který lze tedy považovat za dostačující sekvenci pro přímou fosforylaci (Fisher, 2005). Naopak při rozpoznávání substrátů regulujících buněčných cyklus není klíčovým prvkem sekvence T-smyčky. Tento fakt byl potvrzen experimentem, ve kterém byla sekvence

aktivační smyčky CDK2 zaměněna za sekvenci T-smyčky CDK7. CDK7 byla nadále schopná fosforylovat chimerní protein, i když u ní nebyla prokázána autofosforylace (Garrett et al., 2001). Rozpoznávací sekvence bude tedy pravděpodobně umístěna v jiné oblasti proteinů. Substrátová specifita CDK-aktivačního komplexu je také ovlivněna asociací substrátů s některými proteiny. Bylo prokázáno, že CDK7 fosforyluje velmi slabě monomerní CDK2, zatímco po vazbě cyklinu A dochází k rapidnímu nárůstu fosforylace (Kaldis et al., 1998).

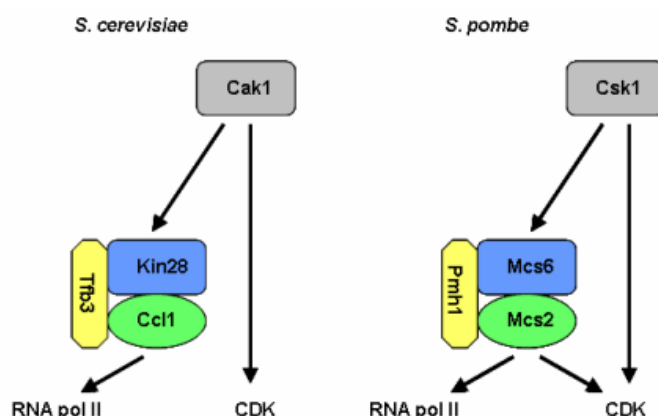
2.2. Regulace aktivity CDK7

Maximální aktivita CDK7 vyžaduje její asociaci s cyklinem H a MAT1 a fosforylaci aktivačních reziduí T170 a S164 (Lolli et al., 2004). Tvorba stabilního aktivního komplexu CDK7/cyklin H je podmíněna fosforylací CDK7 na aktivačním reziduu T170 (Fisher et al., 1995). Trimerní komplex CDK7/cyklin H/MAT1 je aktivní i bez této fosforylace, ovšem pokud je fosforylován, dochází k jeho stabilizaci a zároveň stimulaci kinázové aktivity vůči CTD RNA polymerázy II bez ztráty CDK aktivační funkce (Laroche et al., 2001). Kromě T170 existuje v T-smyčce CDK7 další aktivační místo S164, jehož fosforylace opět stabilizuje trimerní komplex CDK7/cyklin H/MAT1, a navíc zvyšuje jeho aktivitu (Martinez et al., 1997). Vzhledem k faktu, že fosforylace T-smyčky zůstává během buněčného cyklu stejná, lze CDK7 považovat spíše za konstitutivní aktivátor než regulátor CDK. U CDK7 byla vyvrácena možnost autofosforylace (Lolli et al., 2004), ale může být aktivována svými substráty CDK1 a CDK2 (Garrett et al., 2001). Kromě zmíněných aktivujících fosforylací byla *in vitro* pozorována fosforylace cyklinu H komplexem CDK8/cyklin C (Akoulitchev et al., 2000) a CDK7/cyklin H (Lolli et al., 2004), což způsobilo pokles kinázové aktivity CDK7 vůči CTD a v případě fosforylace komplexem CDK7/cyklin H i redukci fosforylace CDK2 (Lolli et al., 2004). Fosforylovaný cyklin H je pravděpodobně degradován proteazomem, a monomerní CDK7 tak ztratí své funkce.

2.3. Organismy s více enzymy plnícími funkci CDK7

U některých organismů byla prokázána existence dvou typů enzymů, které jsou schopné zastávat role CDK7. U *Saccharomyces pombe* byly nalezeny orthology CDK7 (Mcs6) a cyklinu H (Mcs2) regulující přechod z G2 do M fáze aktivací CDK1/cyklin B komplexu (Molz et al., 1989; Lee et al., 1999). Mutace v genech *mcs6*, *mcs2* a *pmh1* (kódující ortholog MAT1) ovšem nezpůsobily žádné defekty v aktivaci CDK a nedošlo ani k zablokování buněčného cyklu (Fisher, 2005). Lee et al. (1999) ukázali, že úlohu

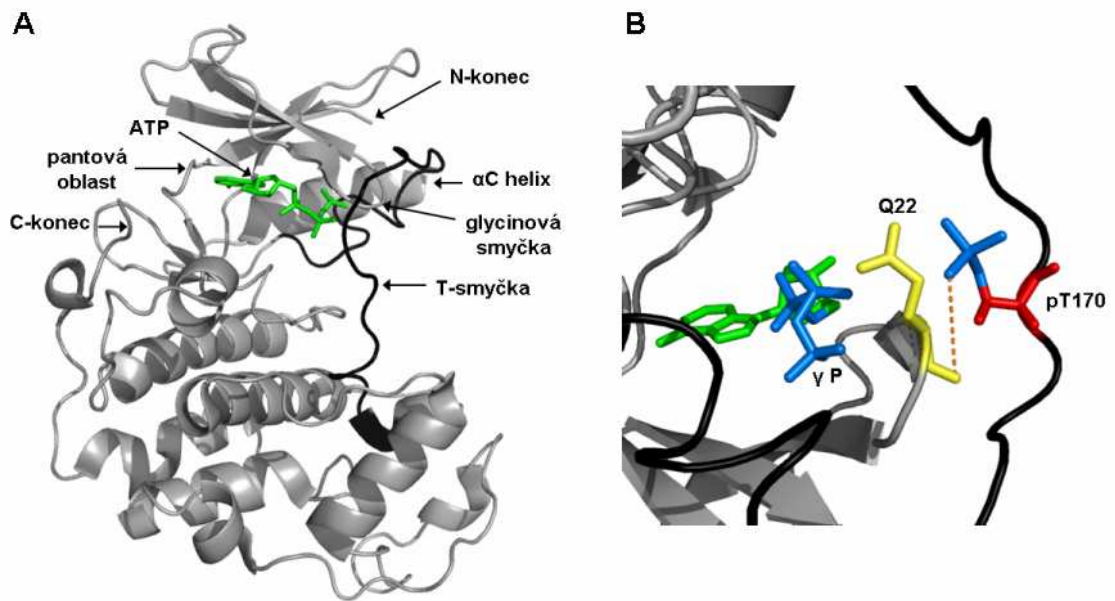
CDK7 kromě Mcs6 plní i jiná kináza, a to Csk1, která kromě aktivace CDK1/cyklin B komplexu fosforyluje také samotný komplex Mcs6/Mcs2. Teprve po inaktivaci Csk1 a Mcs6 dochází k poklesu fosforylace T-smyčky CDK1 a zastavení cyklu (Saiz & Fisher, 2002). Csk1 je evolučně příbuzná kináze Cak1 identifikované u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která stejně jako *Saccharomyces pombe* obsahuje i druhou CAK Kin28 s tím rozdílem, že se funkce kináz nepřekrývají a nemohou se vzájemně zastupovat (Fisher, 2005). Kin28 totiž ve spojení s Ccl1 (ortholog cyklinu H) a Tfb3 (ortholog MAT1) zajišťuje fosforylaci CTD RNA polymerázy II, zatímco Cak1 aktivuje jednak komplex Kin28/Ccl1/Tfb3, ale také ostatní kinázy regulující buněčný cyklus (Fisher, 2005). Jako důkaz tohoto faktu lze uvést experiment provedený Cismowskim et al. (1995), kde mutantní formy *Saccharomyces cerevisiae* s inaktivovanou Kin28 nejevily specifické defekty v buněčném dělení, a navíc samotný enzym nevykazoval v testech *in vitro* žádnou CAK aktivitu. Podmíněné mutace *cak1* naopak způsobily při restriční teplotě zablokování cyklu v G2 fázi u 65 % buněk, přičemž byla u těchto mutantních forem patrná snížená CAK aktivita (Kaldis et al., 1996).



Obrázek 2: Porovnání funkcí enzymů plnících roli CDK7 u *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pombe* (přepřacováno podle Fisher, 2005).

2.4. Struktura CDK7

Struktura CDK7 byla doposud studována pouze u proteinu v inaktivní konformaci s fosforylací na T170 v aktivační smyčce a s ATP ve vazebném místě. Stejně jako ostatní CDK obsahuje i CDK7 menší N-koncový lalok, který je tvořen 83 aminokyselinami a skládá se převážně z β -skládaných listů (Lolli et al., 2004). Obsahuje pouze jediný α -helix nazývaný jako α C helix, přičemž část jeho sekvence NRTALRE (rezidua 56-62) se velmi podobá sekvenčnímu motivu PSTAIRE u CDK2 (Lolli et al., 2004). Postranní řetězce polárních aminokyselin těchto sekvencí jsou



Obrázek 3: Struktura inaktivní formy CDK7 s fosforylací na T170 a ATP ve vazebném místě. **A)** Zobrazení základních strukturních elementů CDK7, kde je ATP vyznačeno zeleně a T-smyčka černě. **B)** Detail interakce fosfátu pT170 (modrý) s Q22 (žlutý), jehož postranní řetězec zasahuje mezi fosfát pT170 a γ fosfát ATP (modrý). Obrázky byly připraveny v programu PyMOL s využitím volně dostupné 3D struktury CDK7 v Protein Data Bank (1UA2).

vystaveny na povrchu helixu, což souvisí jednak s rozpustností proteinu v polárním prostředí, ale je tím také umožněna interakce s jinými aminokyselinami (Lolli et al., 2004). Jedná se především o interakci s cyklinovým boxem, tj. oblast sto aminokyselin, která je v rámci cyklinů vysoce zachovaná (Lolli et al., 2004). Větší C-koncový lalok, tvořený 214 aminokyselinami, se naopak skládá hlavně z α -helixů (Lolli et al., 2004). N-koncová rezidua 1-12 a C-koncová rezidua 312-346 obsahují pravděpodobně jadernou lokalizační sekvenci, ovšem ve struktuře proteinu nejsou z důvodu flexibility zřetelná (Lolli et al., 2004).

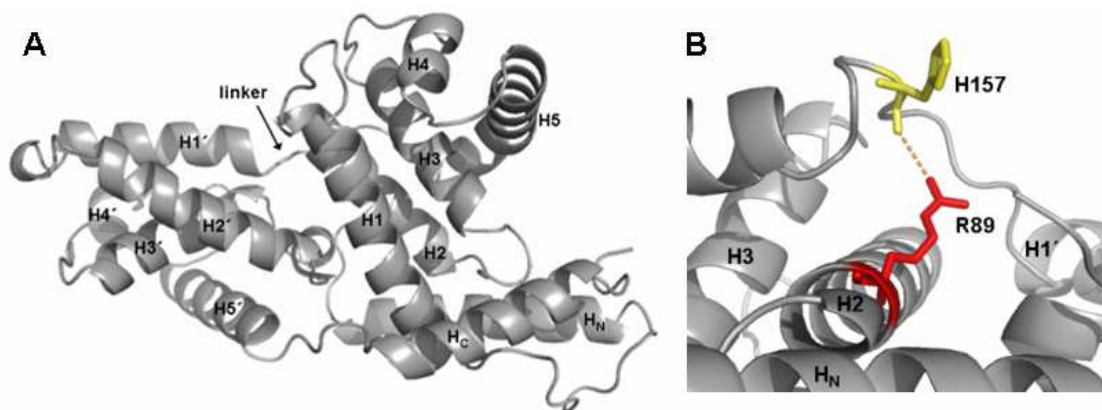
Laloky jsou mezi sebou propojeny pantovou oblastí a nachází se mezi nimi aktivní místo, do kterého vstupuje kromě ATP rovněž druhý substrát. Stejně jako u jiných kináz vytváří adenin adenosintrifosfátu dvě vodíkové vazby s pantovou oblastí, a navíc dochází ke kontaktu s M94 (Lolli et al., 2004). K další stabilizaci dochází díky tvorbě vodíkových vazeb mezi kyslíky γ fosfátu s F23, A24 a K41 (Lolli et al., 2004). Absence Mg^{2+} ve struktuře CDK7 má za následek tvorbu vodíkových vazeb mezi γ fosfátem a dusíky hlavních řetězců reziduí v glycinové smyčce spíše než s katalyckými aminokyselinami (Lolli et al., 2004). Další důležitou částí struktury je aktivační smyčka, nazývaná též jako T-smyčka, která blokuje vazbu substrátu k inaktivní kináze. Fosfát pT170 uvnitř této smyčky vytváří jednu vodíkovou vazbu s dusíkem hlavního řetězce Q22 z glycinové smyčky (Obr.3) (Lolli et al., 2004). Postranní řetězec tohoto rezidua navíc zasahuje mezi fosfát pT170 a γ fosfát ATP,

přičemž je mezi fosforem pT170 a γ fosforem ATP vzdálenost 6,7 Å, z čehož lze usoudit, že CDK7 nemůže být autofosforylována (Obr.3) (Lolli et al., 2004). Součástí aktivační smyčky je též druhé fosforylační místo S164, který je vystaven na povrchu proteinu (Lolli et al., 2004).

Detailní popis struktury CDK7 je důležitý nejen pro pochopení biochemických vlastností a regulovatelnosti tohoto enzymu, ale také rozdílů v citlivosti na různé inhibitory proteinkináz. Dokonalá znalost struktury CDK7 je navíc nutná pro případný design a vývoj jejích specifických inhibitorů.

2.5. Struktura cyklinu H

Lidská forma cyklinu H je protein tvořený 323 aminokyselinami s molekulovou hmotností 38 kDa, jehož krystalová struktura byla vyřešena Andersenem et al. již roku 1997. Stejně jako další typy cyklinů obsahuje i cyklin H dvě charakteristické α -helikální domény, přičemž každou tvoří pět helixů (H1-H5, H1'-H5') (Obr.4) (Andersen et al., 1997). Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že se v jedné doméně nachází tzv. cyklinový box, což je vysoce zachovaná sekvence u mnoha organismů (Andersen et al., 1997). Kontakt mezi doménami je zprostředkován H1, H2, H1', H2' helixy a spojovacím peptidem, který je stabilizovaný interakcemi s okolním polárním prostředím a jehož délka je zachovaná jak mezidruhově, tak mezi různými typy cyklinů (Andersen et al., 1997). Důkazem interakce mezi oběma doménami je přítomnost nabitých reziduí R77 (H2), E168 (H1'), R188 (H1'), D192 (H2'), které se pravděpodobně účastní stabilizace typické cyklinové konformace stejně jako R89 (H2), což je klíčová aminokyselina kotvící H2 ke spojovacímu peptidu prostřednictvím interakce s karbonylem hlavního

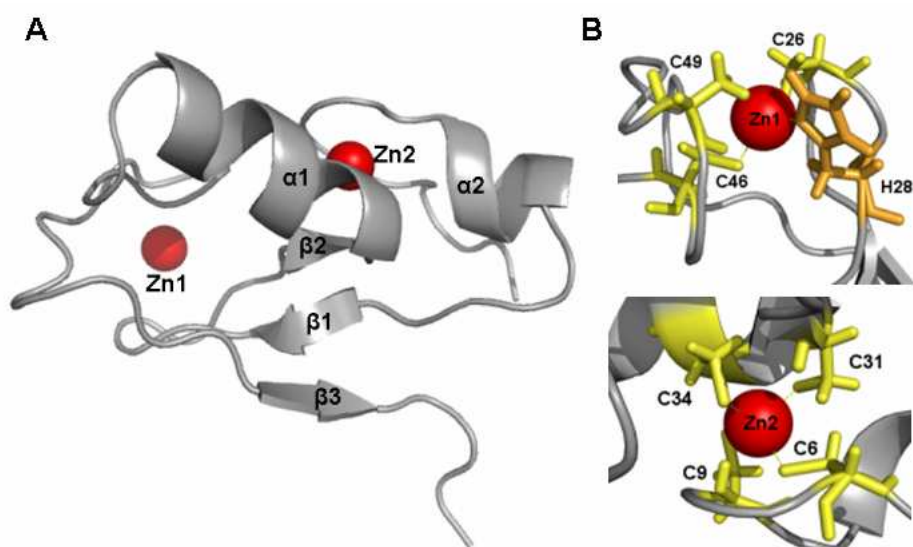


Obrázek 4: Struktura cyklinu H. **A)** Zobrazení podjednotek tvořících strukturu cyklinu H. **B)** Detail stabilizační interakce mezi R89 (červený) a hlavním řetězcem H157 (žlutý). Obrázky byly připraveny v programu PyMOL s využitím volně dostupné 3D struktury cyklinu H v Protein Data Bank (1JKW).

řetězce H157 (Obr.4) (Andersen et al., 1997). Tento stabilizační prvek lze pozorovat nejen ve struktuře cyklinu H, ale také u jiných typů cyklinů. Specifita proteinu je dána především dvěma dlouhými helixy (H_N a H_C) umístěnými na N- a C-konci molekuly. Z experimentů provedených Andersenem et al. vyplývá, že jsou tyto segmenty esenciální pro fosforylační aktivitu CDK7 vůči CTD. Proteiny, u kterých byly dané helixy deletovány, se sice k CDK7 vázaly, nicméně nedocházelo k fosforylaci CTD RNA polymerázy II (Andersen et al., 1997). Důležitost koncových helixů spočívá také ve stabilizaci konformace molekuly. Delece těchto komponent vedla totiž ke ztrátě četných kontaktů s H1 a smyčkou H2-H3, čímž došlo k vystavení mnohých hydrofóbních reziduí na povrch proteinu (Andersen et al., 1997). H_N a H_C mohou ovlivňovat i výběr substrátu, který má být fosforylován, ovšem rozpoznání třetího partnera CDK-aktivačního komplexu MAT1 koncovými helixy bylo nepublikovanými experimenty Andersena et al. vyloučeno. Ačkoli nebyla doposud studována struktura cyklinu H v komplexu s CDK7, lze na základě srovnání se strukturou komplexu CDK2/cyklin A předpokládat, že se hlavní kontaktní rezidua nachází na C-konci H3 a v segmentu H5-H1' cyklinu H (Andersen et al., 1997). Jedná se především o K114 a E147, přičemž kladný náboj v pozici 114 je zachován u celé rodiny cyklinů (Andersen et al., 1997).

2.6. Struktura MAT1

Protein byl poprvé identifikován jako 36 kDa molekula, která hraje roli chaperonu při tvorbě komplexu mezi CDK7 a cyklinem H, ovšem zůstává nadále s proteinem spojena (Tassan et al., 1995). Na základě tohoto pozorování byl zvolen pro nově identifikovaný třetí protein komplexu název MAT1 (ménage à trois 1). Kombinace sekvenční analýzy a biochemických dat ukázaly, že je MAT1 složen ze tří funkčních domén, a to N-koncové domény obsahující klasický C3HC4 RING (Really Interesting New Gene) finger motiv (aminokyseliny 1-66), centrální coiled-coil domény (aminokyseliny 114-175) a C-koncové domény bohaté na hydrofobní rezidua (aminokyseliny 229-309) (Busso et al., 2000). C-koncová doména interaguje s komplexem CDK7/cyklin H, a navíc stimuluje kinázovou aktivitu CDK7 (Busso et al., 2000). Centrální doména je naopak důležitá při ukotvení CDK-aktivačního komplexu k TFIIH prostřednictvím interakcí s XPD helikázou (Busso et al., 2000). Neméně podstatnou roli hraje také N-koncová doména. Její RING finger motiv totiž umožňuje interakci s jinými biomolekulami. Na rozdíl od proteinů se stejným motivem nedochází k interakci MAT1 s DNA (Tassan et al., 1995). Bodové mutace v této oblasti měly za následek zeslabení transkripční aktivity, zatímco pokles kinázové aktivity CDK7



Obrázek 5: Struktura N-koncové (RING finger) domény MAT1. **A)** Zobrazení strukturních podjednotek N-koncové domény MAT1 s atomy zinku vyznačenými červeně. **B)** Detail vazebných míst pro oba atomy zinku, kde jsou cysteinová rezidua zobrazena žlutě a histidinové reziduum oranžově. Obrázky byly připraveny v programu PyMOL s využitím volně dostupné 3D struktury N-koncové domény MAT1 v Protein Data Bank (1G25).

nebyl téměř zaznamenán (Busso et al., 2000). Z tohoto faktu lze usoudit, že RING finger MAT1 interakcí s jinými transkripčními faktory zajišťuje jejich správné umístění kolem promotoru, a umožňuje tak optimální fosforylaci CTD RNA polymerázy II (Busso et al., 2000).

V současné době je známa pouze struktura N-koncové domény, kterou tvoří aminokyseliny M1-D65, přičemž molekulová hmotnost celého segmentu činí 7 kDa (Gervais et al., 2001). Stejně jako jiné RING finger domény přijímá i tento fragment $\beta\beta\alpha\beta$ -uspořádání, ovšem obsahuje navíc ještě jeden α -helix (Gervais et al., 2001). β 1 list je tvořen aminokyselinami L21-V23, β 2 T29-C31, β 3 R59-Q61 a všechny tři listy jsou v antiparalelní orientaci (Obr.5) (Gervais et al., 2001). α -helix (α 1) umístěný mezi β 2 a β 3 se skládá z aminokyselin E32-V40, zatímco druhý helix α 2, typický pouze pro MAT1, tvoří aminokyseliny T12-R15 (Gervais et al., 2001). Fragment je stabilizovaný dvěma atomy zinku, které jsou od sebe vzdálené 14 Å (Gervais et al., 2001). První vazebné místo pro zinek tvoří C6, C9, C31 a C34 (C4) a druhé vazebné místo C26, C46, C49 a H28 (C3H) (Obr.5) (Gervais et al., 2001). Struktura je dále pravděpodobně stabilizována množstvím hydrofóbních interakcí, ovšem neobvyklým jevem u RING finger domén je přítomnost hydrofóbních reziduí (L21, V23) také na povrchu proteinu, což může hrát nemalou roli v regulaci aktivity MAT1 (Gervais et al., 2001). Dalším potenciálním mechanismem, kterým je možná regulována aktivita proteinu, je fosforylace Y14 v α 1 helixu (Gervais et al., 2001). Toto reziduum je mezi všemi MAT1 sekvencemi vysoce zachované, navíc je vystavené na povrchu proteinu

a může být zahrnuté i v interakci s jiným partnerem (Gervais et al., 2001). Povrch celého fragmentu, stejně jako povrch jiných RING finger domén, je díky přítomnosti velkého počtu R a K kladně nabitý, což umožňuje tvorbu elektrostatických interakcí s komponentami preiniciačního transkripčního komplexu (Gervais et al., 2001).

3. Farmakologická inhibice cyklin-dependentních kináz

Zvýšená aktivita CDK je charakteristickým znakem četných nádorových onemocnění, a proto je cílem biochemiků a medicánálních chemiků nalézt způsob, kterým by mohla být tato nežádoucí aktivita zredukována na minimum.

Existují dvě základní strategie sloužící k modulaci aktivity CDK. Buď lze přímo zablokovat CDK prostřednictvím nízkomolekulárních inhibitorů nebo nepřímo manipulovat regulačními drahami, které ovlivňují aktivitu CDK. V druhém případě může jít o změnu exprese a syntézy cyklinů, popřípadě přirozených inhibitorů CDK, modulaci fosforylačního stavu CDK ovlivněním proteinkináz nebo fosfatáz odpovědných za tyto posttranslační modifikace, ale také o regulaci proteolytického aparátu, který degraduje cykliny nebo regulátory CDK (Senderowicz, 2000). V posledních letech ovšem došlo k výraznému pokroku ve vývoji nízkomolekulárních inhibitorů CDK, které kompetují s ATP o vazebné místo enzymu. Díky četným krystalovým strukturám komplexů CDK s ATP nebo inhibitory bylo zjištěno, že většina inhibitorů interaguje s aktivním místem prostřednictvím donor-akceptorových vazeb podobně jako ATP. Na základě tohoto poznatku bylo navrženo a nasyntetizováno mnoho látek, převážně polycyklického heteroaromatického charakteru, selektivních pro rodinu CDK, jejichž modifikacemi byly získány sloučeniny specificky inhibující některé CDK. Vzhledem k velké podobnosti

Tabulka 1: Srovnání primárních sekvencí aktivních míst některých lidských forem CDK, kde barvy značí fyzikálně-chemické vlastnosti aminokyselin: modrá - hydrofobní, červená - kyselé, zelená - bazické, oranžová - jiné polární.

CDK1	64 V	80 F	81 E	82 F	83 L	84 S	86 D	89 K	132 Q	135 L	145 A	146 D
CDK2	64 V	80 F	81 E	82 F	83 L	84 H	86 D	89 K	131 Q	134 L	144 A	145 D
CDK4	77 V	93 F	94 E	95 H	96 V	97 D	99 D	102 T	144 E	147 L	157 A	158 D
CDK6	77 V	98 F	99 E	100 H	101 V	102 D	104 D	107 T	149 Q	152 L	162 A	163 D
CDK7	75 I	91 F	92 D	93 F	94 M	95 E	97 D	100 V	141 N	144 L	154 A	155 D
CDK9	79 V	103 F	104 D	105 F	106 C	107 E	109 D	112 G	153 A	156 L	166 A	167 D

aktivních míst CDK je ovšem komplikovanější vyvinout sloučeninu, která by byla vysoce selektivní pouze pro jednu kinázu (Tab.1). Do klinického testování se tak doposud dostaly především inhibitory selektivní pro více CDK (McInnes, 2008).

Iniciačním momentem ve vývoji inhibitorů CDK se stal objev olomoucínu, derivátu benzylaminopurinu, který je selektivním inhibitorem CDK1, CDK2 a CDK5 (Veselý et al., 1994). Strukturními modifikacemi byly získány další 2,6,9-trisubstituované puriny se zvýšenou inhibiční aktivitou i selektivitou vůči zmíněným kinázám. Jde například o purvalanol A, H717, olomoucín II, ovšem největšího věhlasu dosáhl roskovitin, který je v současné době v druhé fázi klinického testování při léčbě nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu nosohltanu (Aldoss et al., 2009). Staurosporin, původně identifikovaný jako silný inhibitor proteinkinázy C (IC_{50} 1 nM), vykazuje inhibiční vlastnosti vůči celé škále proteinkináz včetně CDK2 s IC_{50} 3,2 nM (Sridhar et al., 2006). Tento fakt vedl k vývoji jeho derivátů UCN-01, K252C a CGP41251 s poměrně dobrou protinádorovou aktivitou, ovšem při klinickém testování se záhy projeví vedlejší účinky, které byly pravděpodobně způsobeny nespecifitou sloučenin (Sridhar et al., 2006). Mezi další inhibitory CDK lze zařadit i látky pyrimidinového charakteru, jakými jsou například CINK4 inhibující CDK4, CDK6 a CDK5 nebo CGP60474 se specifitou pro CDK1 a CDK2 a dále také substituované oxindoly SU9516 selektivní pro CDK1 a CDK2, popřípadě indirubin sulfát, který je účinným inhibitorem CDK1, CDK2 a CDK5 (Sridhar et al., 2006).

3.1. Skupinově selektivní nízkomolekulární inhibitory regulátorů transkripce

Jelikož byly CDK původně objeveny jako regulátory buněčného cyklu, byly jejich inhibitory studovány právě jako blokátory buněčného dělení. Teprve identifikace nových cílů CDK a jejich zapojení do procesu transkripce poskytly možnost dalšího využití inhibitorů CDK. Inhibice regulátorů transkripce může být totiž klíčová pro transkripty s krátkým poločasem rozpadu, mezi které se řadí například transkripty kódující cyklin D, Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), MDM2 (murine double minute 2), survivin, ale i jiné antiapoptotické proteiny a molekuly důležité pro progresi buněčným cyklem. Hladiny těchto proteinů mohou být během léčby rapidně sníženy, a nádorová buňka se tak stane mnohem citlivější k indukci apoptózy. Především některá maligní hematologická onemocnění jsou k takové inhibici poměrně senzitivní, což lze využít například při léčbě chronické lymfoidní leukémie, lymfomu z plášťových buněk nebo mnohočetného

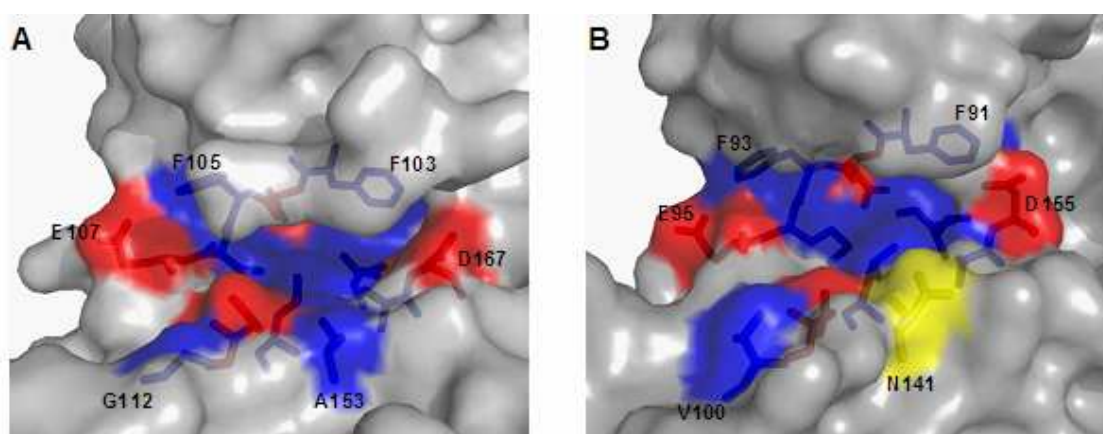
myelomu (Kryštof & Uldrijan, 2010). Důkazem jsou experimenty provedené Chenem et al. (2005), kde flavopiridol jako silný inhibitor CDK9 způsobil ve 3 μM koncentraci pokles fosforylace S2 v CTD RNA polymerázy II, a navíc redukoval expresi *mcl-1* u nádorové buněčné linie odvozené od chronické lymfoidní leukémie. Podobný efekt vykázal i meriolin 3, rovněž silný inhibitor CDK9, protože snížil expresi *mcl-1* u nádorové linie SH-SY5Y odvozené od neuroblastomu, následně došlo k uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií a aktivaci kaspáz (Bettayeb et al., 2007). Další panselektivní inhibitor AT7519 inhiboval fosforylaci RNA polymerázy II u buněčné linie odvozené od mnohočetného myelomu (Santo et al., 2010), a navíc interagoval s GSK3- β (glycogen synthase kinase 3 beta), což mohlo zesílit jeho protinádorový efekt (Squires et al., 2009). Mezi účinné inhibitory CDK9 patří dále také variolin B, ZK 304709, AG-012986 nebo RGB-286638. Roskovitin, který inhibuje s podobnou selektivitou oba regulátory transkripce, indukoval u mnoha nádorových buněčných linií akumulaci nádorového supresoru p53 v aktivní formě (Kryštof et al., 2005). Hladina p53 je u normálních netransformovaných buněk nízká kvůli interakci s MDM2, který ubiquitinyluje p53 a ten je následně degradován 26S proteazomem. Ve stresových situacích, jako je například poškození DNA, dochází k posttranslačním modifikacím p53 i MDM2 a stabilizuje se hladina p53, což vede k expresi genů, jejichž produkty zodpovídají za zablokování buněčného cyklu, navození senescence nebo indukují apoptózu buňky. Příkladem může být zvýšená exprese a akumulace p21^{Waf1/Cip1}, přirozeného inhibitoru CDK, důsledkem čehož dochází k zablokování buněčného dělení, nebo může jít o zesílenou expresi genů kódujících proapoptotické proteiny BAX (Bcl-2-associated X protein) a PUMA (Bcl-2 binding component 3), které navozují programovanou buněčnou smrt, a tím i eliminaci abnormálních buněk (Kryštof & Uldrijan, 2010).

Kromě léčby nádorových onemocnění budou možná využity inhibitory regulátorů transkripce též při antivirální terapii nebo léčbě srdeční hypertrofie. Například indirubin-3'-monoxim, který účinně inhibuje CDK9, brání replikaci HIV-1, jelikož je promotor HIV-1 více citlivý k takové inhibici než promotery jiných genů (Heredia et al., 2005). Co se týče léčby hypertrofie srdce, byl na buněčných modelech doposud testován pouze roskovitin, který ale vykázal poměrně dobré účinky. Po třídní inkubaci kardiomyocytů stimulovaných 5% živným sérem s 10 μM roskovitem došlo k poklesu syntézy proteinů a podobně jednodenní inkubace s 10 μM roskovitem vedla ke snížené syntéze DNA (Hinrichsen et al., 2008). Lze tedy předpokládat, že by i jiné inhibitory transkripce mohly mít podobný efekt, ale bude nutné provést mnoho dalších studií, než bude možné začít testovat tyto látky i v klinické léčbě.

3.2. Nízkomolekulární inhibitory s vysokou selektivitou pro CDK9 nebo CDK7

Kromě popsaných látek existuje mnoho dalších sloučenin specifických pro oba transkripční regulátory CDK7 a CDK9. Je faktem, že prakticky všechny inhibitory, které jsou v klinickém testování, vykazují velmi podobnou aktivitu vůči oběma enzymům, což je dáno příbuzností jejich aktivních míst (Obr.6). Přesto se podařilo vyvinout i sloučeniny s vysokou selektivitou pro CDK9 nebo CDK7.

Nedávno byly identifikovány dva inhibitory EXEL-3700 a EXEL-8647 specifické pro CDK9, EXEL-3700 s IC_{50} (the half maximal inhibitory concentration) 10,2 nM a EXEL-8647 s IC_{50} 29 nM, přičemž je tato selektivita stokrát vyšší než pro ostatní CDK (Heuer, 2008). Dle očekávání došlo k poklesu fosforylace S2 v CTD RNA polymerázy II a snížené expresi genů kódujících c-Myc, Mcl-1 a cyklin D u nádorové linie HL-60, odvozené od akutní myeloidní leukémie (Heuer, 2008). U buněčných linií HL-60 a MDA-MB-231T, odvozené od adenokarcinomu prsu, způsobila inhibice CDK9 prostřednictvím těchto látek sníženou proliferaci buněk a indukci apoptózy (Heuer, 2008). Podobně vysokou specifitu vůči CDK9 vykázal i CAN508, který je zároveň i nejsilnějším inhibitorem CDK9 z testovaných 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazolů (Kryštof et al., 2006). Kromě vysoce selektivních inhibitorů CDK9 se podařilo nedávno vyvinout také sloučeninu specifickou pouze pro CDK7. Jedná se o derivát pyrazolo[1,5-a]pyrimidinu BS-181, který inhiboval CAK aktivitu s IC_{50} 21 nM (Ali et al., 2009). Strukturální analýzou interakce BS-181 s aktivním místem CDK7 bylo zjištěno, že dochází k tvorbě vodíkových vazeb mezi N1 a N6 atomy BS-181 a atomy hlavního řetězce M94, který se nachází v pantové oblasti kinázy (Ali et al., 2009). Vazba



Obrázek 6: Srovnání terciárních struktur aktivních míst lidských forem **A)** CDK9 a **B)** CDK7, kde barvy značí fyzikálně-chemické vlastnosti aminokyselin: modrá - hydrofóbní, červená - kyselé a žlutá – jiné polární. Obrázky byly připraveny v programu PyMOL s využitím volně dostupných 3D struktur CDK9 a CDK7 v Protein Data Bank (3MY1, 1UA2).

inhibitoru k enzymu je dále stabilizována elektrostatickými interakcemi aminoskupiny postranního šestiuhlíkatého řetězce pyrazolopyrimidinu s fosfátem T170 a karbonylem hlavního řetězce E20 (Ali et al., 2009). Šestiuhlíkový linker navíc interaguje prostřednictvím van der Waalsových kontaktů s hydrofóbními rezidui aktivního místa, což lze považovat za další stabilizační prvek (Ali et al., 2009). U MCF-7 buněčné linie odvozené od adenokarcinomu prsu došlo po 4 hodinové inkubaci s 25 μM BS-181 k výraznému poklesu fosforylace S5 v CTD RNA polymerázy II a zároveň S795 a S821 Rb (retinoblastoma) proteinu (Ali et al., 2009). Navíc se snížila hladina CDK4, jejího vazebného partnera cyklinu D1 a XIAP (Ali et al., 2009). Po 24 hodinové inkubaci MCF-7 s 1 a 10 μM BS-181 vzrostl počet buněk v G1 fázi, zatímco ve vyšších koncentracích (25, 50 μM) došlo k výrazné akumulaci buněk v sub-G1 fázi, což indikuje apoptózu buněk (Ali et al., 2009). Účinnost BS-181 byla sledována kromě MCF-7 také u několika dalších nádorových buněčných linií, přičemž IC_{50} nepřekročila 37 μM (Ali et al., 2009). Na základě těchto dat se BS-181 jeví jako účinný inhibitor CDK7, který má terapeutický potenciál pro léčbu nádorových onemocnění.

Vývoj BS-181 jako prvního vysoce selektivního a zároveň účinného inhibitoru CDK7 motivoval snahy pracovníků Laboratoře růstových regulátorů PŘF UP o navržení a charakterizaci sloučenin podobného typu. Zachováním stejných substituentů a obměnou pyrazolopyrimidinu za purin byla získána látka LGR2629 (Obr.7B). Abychom zjistili, jaký význam má hydrofobicita postranního šestiuhlíkatého lineárního řetězce, byla pro srovnání účinků LGR2629 použita látka LGR490, která má na rozdíl od LGR2629 o dva atomy delší postranní řetězec, a navíc jsou C3 a C6 tohoto řetězce substituovány za dva atomy kyslíku (Obr.7C). Pro porovnání účinků těchto sloučenin na nádorovou buněčnou linii MCF-7 byl zvolen jako pozitivní kontrola purinový inhibitor BA-09, derivát olomoucínu II, který vykazuje silný inhibiční efekt vůči většině CDK (Jorda et al., 2011). Účinky LGR2629, LGR490 a BA-09 budou srovnány s vlivem transfekce MCF-7 linie pomocí CDK7 siRNA. Náplní praktické části této práce je rovněž purifikace rekombinantních proteinů CDK7, cyklinu H a MAT1 samotných, resp. jejich komplexů, přičemž purifikovaný komplex CDK7/cyklin H/MAT1 bude ideálním a zároveň nejjednodušším modelem pro posouzení účinnosti inhibitorů na enzymové úrovni.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Materiál

4.1. Přístrojové vybavení

Při experimentech byly využity následující přístroje: nízkotlaký kapalinový chromatograf BioLogic LP (Bio-Rad); centrifuga BR4I (Jouan); průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC - MPL (Beckman Coulter); mikroskop CKX41 (Olympus); CO₂ inkubátor (Sanyo); spektrofotometr Helios β (Spectronic Unicam); flowbox HF 36 (Gelaide); zobrazovací systém LAS-4000 (Fujifilm); aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad); blotovací zařízení Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad); ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin); termostat na mikrotitrační destičky Thermomixer Comfort (Eppendorf) a laserový scanner FLA 7000 (Fujifilm).

4.2. Použité chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie od Sigmy Aldrich: aprotinin, amonium persulfát (APS), adenzin trifosfát (ATP), bromfenolová modř, hovězí sérový albumin (BSA), coomassie brilliant blue G-250, dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA), fluorid sodný, L-glutamin, 2-glycerolfosfát, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová (HEPES), His-Select Nickel Affinity Gel, Histone Type III-S, imidazol, leupeptin, neutrální červeň, N,N'-metylenbisakrylamid, Nonidet P-40, octan sodný, penicilin, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Ponceau S, propidium jodid, ribonukleáza A, streptomycin, tetramethylethyldiamin (TEMED) a trypsin. Od firmy MP Biomedicals byly použity sloučeniny: akrylamid, [γ -³³P]ATP, glycin, kyselina piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová) (PIPES), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Tween 20; od firmy Lach-Ner: glycerol, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, kyselina chlorovodíková, kyselina octová a laurylsíran sodný (SDS). Experimenty byly dále provedeny za využití sloučenin zakoupených od firmy Penta: dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, ethanol, chlorid sodný, kyselina trihydrogenfosforečná, methanol; od firmy Serva: 2-merkptoethanol; od firmy Chemapol: dihydrogenfosforečnan draselný; od firmy Invitrogen: 4% agarózový gel, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetální telecí sérum, lipofectamine, 1x IPL-41 Insect medium a 1,3x Sf-900 Medium; od firmy Thermo Scientific Dharmacon: CDK7 siRNA a od firmy Amersham Pharmacia: kit ECL.

4.3. Použité roztoky

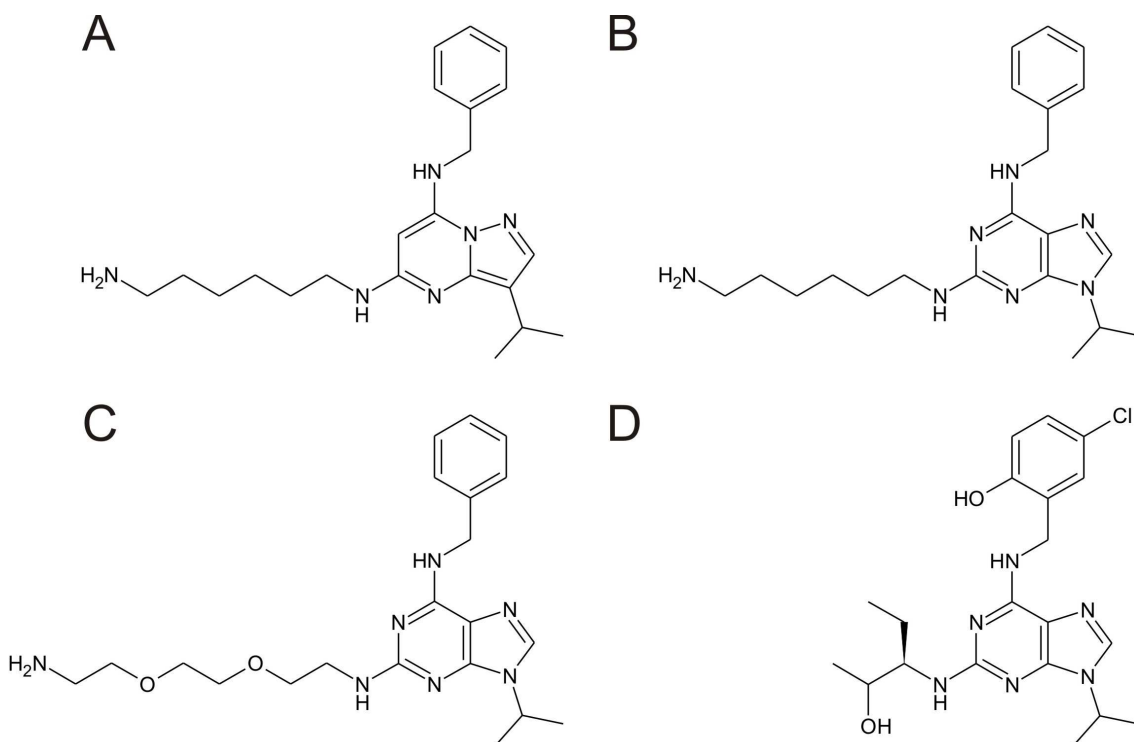
Při provedení experimentů byly použity následující roztoky: PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4), TBS (20 mM TRIS; 137 mM NaCl; pH 7,4), RIPA pufr (20 mM TRIS; 100 mM NaCl; 2 mM EGTA; 5 mM EDTA; 2 mM NaF; 0,2% Nonidet P-40; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 µg/ml leupeptin a 10 µg/ml aprotinin; pH 7,4), činidlo Bradfordové (0,12 mM coomassie brilliant blue G-250; 0,86 M ethanol a 1,86 M kyselina fosforečná); 5x vzorkovací pufr (0,3 M TRIS o pH 6,8; 10% SDS; 5% 2-merkapt ethanol; 0,05% bromfenolová modř; 50% glycerol), elektroforetický pufr (25 mM TRIS; 192 mM glycin; 0,1% SDS), blotovací pufr (25 mM TRIS; 192 mM glycin), blokovací roztoky (5% sušené mléko resp. 3% BSA v PBS resp. TBS s 0,1% Tweenem 20), 2x kinázový pufr pro kinázový test (100 mM HEPES o pH 7,4; 20 mM MgCl₂; 5 mM EGTA; 20 mM 2-glycerolfosfát; 2 mM NaF; pH 7,4), 2x reakční pufr pro kinázový test (2x kinázový pufr; 30 µM ATP; [γ-³³P]ATP), plakovací médium (75 % kompletního růstového média IPL-41, 25 % 4% agarózového gelu), vizualizační médium (68,75 % kompletního růstového média IPL-41, 25 % 4% agarózového gelu a 6,25 % 3,46 µM roztoku neutrální červeně v kompletním růstovém médiu IPL41), lyzační roztok pro Sf9 (50 mM TRIS; 100 mM KCl; 1% Nonidet P-40; 5 mM 2-merkapt ethanol; 1 mM PMSF; 10 µg/ml leupeptin a 10 µg/ml aprotinin; pH 7,4), purifikační roztok A (20 mM TRIS; 100 mM KCl; 10% glycerol; pH 7,4), purifikační roztok B (20 mM TRIS; 100 mM KCl; 5 mM imidazol; 10% glycerol; pH 7,4); purifikační roztok C (20 mM TRIS; 500 mM KCl; 5 mM imidazol; 10% glycerol; pH 7,4), purifikační roztok D (20 mM TRIS; 100 mM KCl; 500 mM imidazol; 10% glycerol; pH 7,4).

4.4. Použité protilátky

Při experimentech byly použity myší monoklonální protilátky rozlišující α-tubulin (ředění 1:500; klon DM1A) a CDK7 (ředění 1:50000; klon MO-1,1) od firmy Sigma Aldrich, králíčí polyklonální protilátka fosfo-S5 RNA polymerázy II (ředění 1:1000) od firmy Bethyl Laboratories, myší monoklonální protilátka interagující s celkovou RNA polymerázou II (ředění 1:1000; klon ARNA-3) od firmy Chemicon, myší monoklonální protilátka rozlišující p53 (ředění 1:500; klon DO-1) od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně a králíčí polyklonální protilátky rozpoznávající cyklin H (ředění 1:1000) a MAT1 (ředění 1:1000) od firmy Santa Cruz Biotechnology. Tyto primární protilátky byly po imunoblottingu vizualizovány prostřednictvím sekundárních protilátek RAM/Px (rabbit anti-mouse; ředění 1:1000) a SwAR/Px (swine anti-rabbit; ředění 1:1000) od firmy Sigma Aldrich.

4.5. Testované sloučeniny

V experimentální části této práce byl testován biologický účinek látky purinového typu s označením LGR2629, která byla syntetizována Mgr. V. Mikem (Obr.7B). Pro srovnání účinků byly testovány další dva purinové inhibitory, LGR490 syntetizovaný doc. L. Havlíčkem (Obr.7C) a BA-09 Dr. M. Zatloukalem (Obr.7D). Zásobní roztoky inhibitorů v DMSO byly dále ředěny v kultivačním médiu tak, aby koncentrace DMSO v médiu nepřesáhla 0,1 %.



Obrázek 7: Struktura **A)** BS-181, **B)** LGR2629, **C)** LGR490 a **D)** BA-09.

4.6. Buněčné linie

Pro testování účinnosti sloučenin byla vybrána adherentní nádorová buněčná linie MCF-7 odvozená od adenokarcinomu prsu, která byla kultivována v médiu DMEM doplněném o 10% fetální telecí sérum, streptomycin (0,1 g/l), penicilin (0,1 g/l) a L-glutamin (0,3 g/l), přičemž inkubace probíhala při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého.

Hmyzí buněčná linie Sf9 odvozená z tkáně vaječníků motýla *Spodoptera frugiperda* ve stavu kukly byla kultivována při teplotě 27 °C v IPL41 médiu, které obsahovalo 10% fetální telecí sérum, streptomycin (0,1 g/l), penicilin (0,1 g/l) a L-glutamin (0,3 g/l).

4.7. Rekombinantní bakuloviry

Sf9 buňky byly infikovány třemi typy bakulovirů obsahující sekvence genů kódujících lidskou formu CDK7 s hemagglutininovou značkou a cyklinu H a MAT1 se značkou složenou z šesti histidinů (6×H), které byly získány od společnosti Orbigen.

5. Metody

5.1. Analýza buněčného cyklu

MCF-7 buňky inkubované 24 hodin s danými inhibitory byly sklizeny trypsinizací. Kultivační médium bylo přeneseno do zkumavky, buňky byly opláchnuty roztokem EGTA, který byl odpipetován a přenesen do stejné zkumavky. Buňky byly následně inkubovány 10 minut při 37 °C s roztokem trypsinu a po jejich uvolnění ze dna kultivačních misek byl trypsin inaktivován přidávkem čerstvého média, přičemž byla takto získaná suspenze opět přenesena do zkumavky. Vzorky byly poté 10 minut centrifugovány při otáčkách 1000 g a teplotě 4 °C. Dále byly dvakrát promyty filtrovaným roztokem PBS a zafixovány vychlazeným 70% ethanolem. Po 30 minutové inkubaci na ledu byly vzorky opět 10 minut centrifugovány při otáčkách 1000 g a teplotě 4 °C, promyty filtrovaným PBS a po opakované centrifugaci za stejných podmínek byly resuspendovány ve filtrovaném roztoku PBS obsahujícím RNázu (200 µg/ml) a propidium jodid (10 µg/ml). Vzorky byly poté inkubovány 30 minut ve tmě při pokojové teplotě a následně byl na průtokovém cytometru analyzován obsah DNA.

5.2. Stanovení titru bakulovirálních roztoků

Do 6-jamkového panelu bylo napipetováno 8×10^5 buněk Sf9 ve 2 ml kompletního růstového média na jamku, které byly následně kvůli dosažení úplné adheze ke dnu hodinu inkubovány při 27 °C. Poté bylo růstové médium odstraněno a buňky byly jednu hodinu infikovány koncentrační řadou příslušného bakulovirálního roztoku s ředícím faktorem 10. Následně bylo médium odpipetováno, buňky byly zality 2 ml plakovacího média a inkubovány 4 dny při 27 °C ve vlhké komůrce. Do jamek bylo napipetováno po 1 ml vizualizačního média a panely byly opět inkubovány při 27 °C, dokud nebyly viditelné fokální body infekce neboli tzv. plaky. Titr bakulovirálního roztoku (pfu / ml, plaque forming units per ml) byl stanoven podle následujícího vzorce.

$$\text{pfu / ml} = \text{počet plaků (pfu)} / [\text{ředící faktor} \times \text{inokulum (ml)}]$$

Sf9 buňky byly dále pro purifikační experimenty infikovány bakulovirálními roztoky s MOI (multiplicity of infection) 5, což je parametr, který je definovaný jako počet virálních částic na buňku. Objem inokula byl vypočítán podle následujícího vzorce.

$$\text{inokulum (ml)} = [\text{MOI (pfu/buňka)} \times \text{počet buněk}] / \text{titr viru (pfu/ml)}$$

5.3. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí nízkotlaké kapalinové afinitní chromatografie

Sf9 buňky byly po 4 denní infekci danými typy bakulovirů sklizeny a centrifugovány 10 minut při otáčkách 1000 g a 4 °C. Poté byly dvakrát promyty pufrům PBS a po zamražení v tekutém dusíku zlyzovány na ledu v lyzačním pufru. Vzniklá suspenze byla dále sonikována na ultrazvukovém homogenizátoru a následně 15 minut centrifugována při otáčkách 14000 rpm a 4 °C. Supernatant byl nanesen na kolonu naplněnou agarózovým nosičem derivatizovaným kyselinou nitrilotrioctovou (NTA), na kterou byly navázány Ni²⁺ ionty. Lyzát byl kvůli maximálnímu navázání 6×H značených proteinů 15 minut inkubován v koloně, poté byla sebrána frakce s nenavázanými proteiny (FT, flow-through) a kolona byla zapojena do systému nízkotlakého kapalinového chromatografu. Následně byl proveden jednokrokový purifikační proces podle programu: 10 minut promývání pufrům A, 5 minut pufrům B, 5 minut pufrům C a poté následovala eluce rostoucím spojitým gradientem imidazolu (z 5 mM na 50 mM). Tento program byl použit při všech purifikačních experimentech.

5.4. Měření aktivity CDK7

Test byl prováděn v 96-jamkovém mikrotitračním panelu s kulatým dnem. 5 µl purifikované frakce bylo smícháno s 1 µl histonu (10 mg/ml) a reakce byla nastartována přidávkem 5 µl 2x reakčního pufru. Panel byl inkubován 30 minut na třepačce při teplotě 30 °C a 500 rpm a poté byla reakce zastavena p řipipetováním 5 µl kyseliny fosforečné. 5 µl vzniklého roztoku bylo naneseno na fosfocelulózový papír P-81 (Whatman), který byl po 5 minutách 3x promyt 5% kyselinou fosforečnou, 96% ethanolem a nakonec byl usušen na vzduchu. Fosfocelulózový papír byl přes noc exponován v kazetě s citlivou deskou (MP2025 IP Fuji), která byla druhý den oskenována pomocí laserového scanneru FLA 7000.

5.5. Transfekce buněk

Transfekční experimenty byly provedeny v kultivačních miskách o průměru 50 mm. 30 minut před transfekcí MCF-7 buněk bylo vyměněno kultivační médium za 4 ml čerstvého média bez antibiotik. Dále bylo smícháno 5 µl 100 µM roztoku CDK7 siRNA s 500 µl inkompletního DMEM média a 22,5 µl roztoku lipofectaminu také s 500 µl nekompletního média, jejichž smísením byla připravena transfekční směs, která byla kvůli vytvoření komplexů 15 minut inkubována při laboratorní teplotě. Poté byla směs nakapána na kultivační misku s buňkami a ta byla 24 hodin inkubována při 37 °C.

Druhý den bylo vyměněno transfekční médium za čerstvé médium a buňky byly podle potřeby dále kultivovány.

5.6. SDS-PAGE elektroforéza a imunoblotting

Buňky byly po inkubaci sklizeny a centrifugovány po dobu 10 minut při otáčkách 1000 g a teplotě 4 °C. Následně byly dvakrát promyty pufrům PBS a po zamražení v tekutém dusíku zlyzovány na ledu v RIPA pufru. Vzniklá suspenze byla dále sonikována na ultrazvukovém homogenizátoru a centrifugována po dobu 25 minut při 14 000 rpm a teplotě 4 °C. V odebraném supernatantu byla metodou Bradfordové stanovena koncentrace proteinů (Bradford, 1976). Vzorek byl poté zředěn 5x vzorkovacím pufrům a nakonec byl denaturován 5 minut při 95 °C. V případě purifikačních experimentů byly získané frakce bez měření koncentrace proteinů naředěny 5x vzorkovacím pufrům a rovněž denaturovány po dobu 5 min při 95 °C.

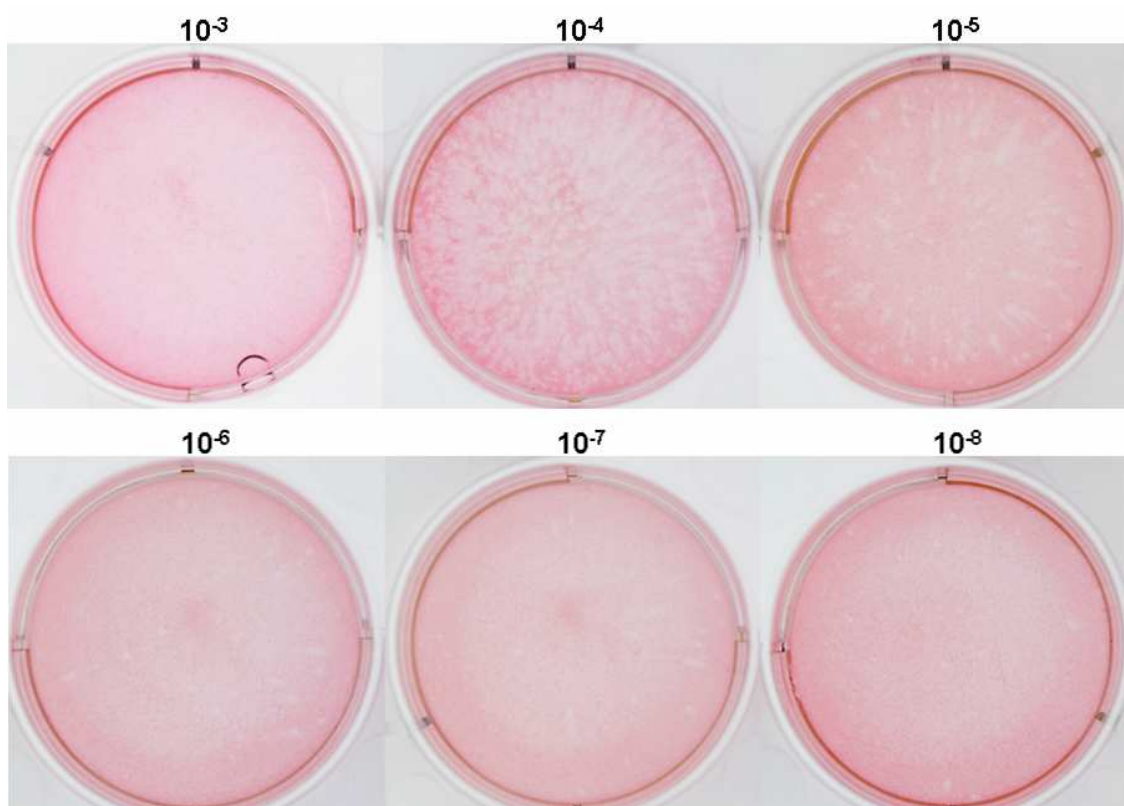
Elektroforetická separace proteinů byla provedena na přístroji Mini Protean 2 v 10%, 12,5% nebo 15% SDS-polyakrylamidovém gelu o pH 8,8 v kombinaci se zaostřovacím 5% gelem o pH 6,8. Elektroforéza probíhala po dobu 2 hodin při napětí 100 V v elektroforetickém pufru. Poté byl proveden přenos separovaných proteinů na nitrocelulóзовou membránu (0,45 μm, BioRad). Přenos proteinů probíhal 2 hodiny při proudu 250 mA v blotovacím pufru na přístroji Mini Trans-Blot Cell za stálého chlazení ledem. Membrány byly poté 1 hodinu blokovány při pokojové teplotě v roztoku 5% sušeného mléka nebo 3% BSA v PBS popř. TBS s 0,1% Tweenem 20. Následně byla provedena imunodetekce proteinů pomocí selektivních primárních protilátek a pomocí peroxidázou značených sekundárních protilátek. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 4 °C a inkubace se sekundárními protilátkami 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly membrány promyty PBS resp. TBS a PBS resp. TBS s 0,1% Tweenem 20. K vizualizaci byl použit chemiluminiscenční kit ECL.

6. Výsledky

6.1. Stanovení titru bakulovirů a produkce rekombinantních proteinů

Zásobní roztoky rekombinantních bakulovirů pro expresi proteinů CDK7, cyklin H a MAT1 byly nejprve amplifikovány v hmyzí buněčné linii Sf9 a po získání bakulovirálních roztoků s titrem větším než 10^8 pfu/ml byla provedena infekce Sf9 buněk pro purifikační účely. Pro optimalizaci míry exprese daných rekombinantních proteinů byly pomocí plakové zkoušky stanoveny titry získaných bakulovirálních roztoků. Experiment byl opakován dvakrát a výsledky byly zprůměrovány (Tab.2). Všechny tři amplifikované roztoky měly prakticky stejný titr, který byl dostačující pro infekci Sf9 buněk za účelem purifikace proteinů. Přítomnost všech tří proteinů v lyzátech infikovaných buněk byla navíc prokázána pomocí imunodetekce (Obr.9).

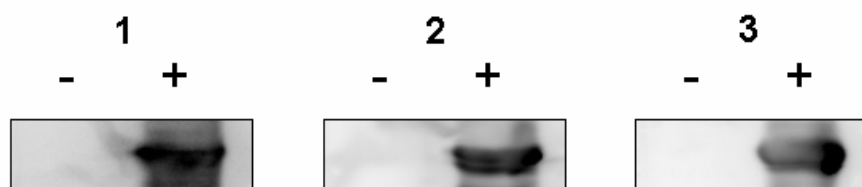
Proteiny byly produkovány jak každý zvlášť, tak byly provedeny i infekce Sf9 buněk kombinacemi bakulovirů CDK7/cyklin H, CDK7/MAT1 a CDK7/cyklin H/MAT1. K expresi bylo použito 2×10^7 buněk Sf9, které byly infikovány danými koncentracemi bakulovirů (Tab.2) s MOI 5 pro každý typ bakuloviru. Objem inokulí byl vypočítán podle vzorce uvedeného v kapitole 5.2.



Obrázek 8: Ukázka výsledku plakové zkoušky. Stanovení titru bakuloviru s kódující sekvencí pro cyklin H, kde číslo udává ředící faktor.

Tabulka 2: Stanovení titru roztoků bakulovirů se sekvencemi kódujícími rekombinantní proteiny CDK7, cyklin H a MAT1.

typ bakuloviru	ředící faktor	počet plaků ± SD (pfu)	titr bakuloviru ± SD (pfu/ml)
CDK7	10 ⁻⁵	52 ± 3	(5,2 ± 0,3) × 10 ⁶
	10 ⁻⁶	16 ± 1	(1,6 ± 0,1) × 10 ⁷
	10 ⁻⁷	11 ± 2	(1,1 ± 0,2) × 10 ⁸
	10 ⁻⁸	6 ± 1	(6,0 ± 0,1) × 10 ⁸
cyklin H	10 ⁻⁵	83 ± 9	(8,3 ± 0,9) × 10 ⁶
	10 ⁻⁶	28 ± 1	(2,8 ± 0,1) × 10 ⁷
	10 ⁻⁷	16 ± 1	(1,6 ± 0,1) × 10 ⁸
	10 ⁻⁸	9 ± 3	(9,0 ± 0,3) × 10 ⁸
MAT1	10 ⁻⁵	52 ± 3	(5,2 ± 0,3) × 10 ⁶
	10 ⁻⁶	22 ± 3	(2,2 ± 0,3) × 10 ⁷
	10 ⁻⁷	11 ± 1	(1,1 ± 0,1) × 10 ⁸
	10 ⁻⁸	7 ± 2	(7,0 ± 0,2) × 10 ⁸

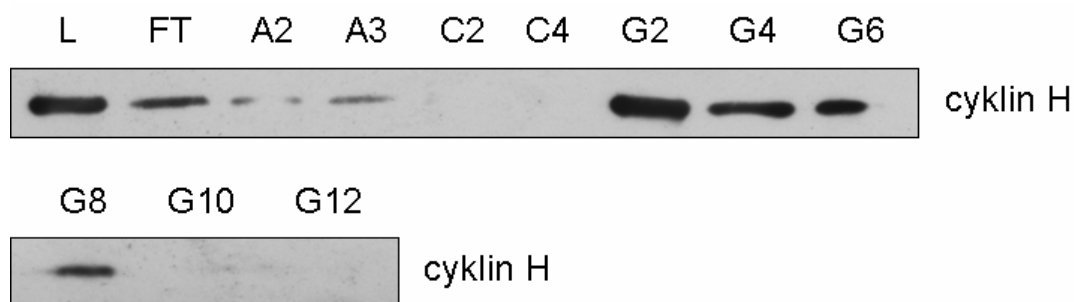


Obrázek 9: Detekce rekombinantních proteinů CDK7 (1), cyklin H (2) a MAT1 (3) v lyzátech neovlivněných buněk Sf9 (-) a buněk Sf9 infikovaných bakuloviry (+) s kódující sekvencí pro CDK7 (1), cyklin H (2) a MAT1 (3).

6.2. Purifikace rekombinantních proteinů cyklin H, MAT1 a CDK7

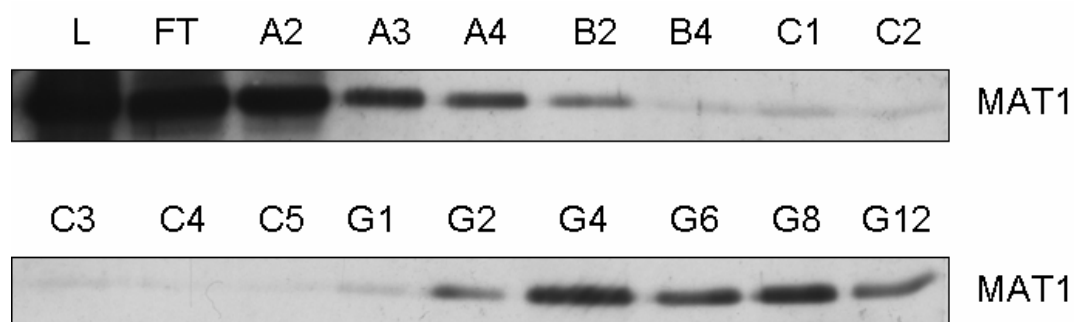
Lyzát buněk Sf9 infikovaných roztoky bakulovirů byl purifikován na nízkotlakém kapalinovém chromatografu podle programu popsaného v kapitole 5.3. Pro ověření vazby rekombinantních proteinů 6×H-cyklin H a 6×H-MAT1 na Ni²⁺-NTA kolonu byly tyto proteiny exprimovány a purifikovány nejprve jednotlivě, poté byly v Sf9 buňkách produkovány také binární komplexy CDK7/cyklin H a CDK7/MAT1 a nakonec ternární CDK7/cyklin H/MAT1. Ve vybraných frakcích byla pomocí SDS-PAGE a imunoblottingu detekována hladina purifikovaných proteinů a v případě purifikace komplexu CDK7/cyklin H/MAT1 byla ve frakcích stanovena relativní aktivita CDK7.

Jak dokládá eluční profil cyklinu H (Obr.10), tento protein se v monomerní formě na Ni²⁺-NTA kolonu vázal a při použití imidazolového pufru docházelo k jeho uvolňování. Vzhledem k objemu vzorků nanášených do jamek (lyzát - 6 µl, ostatní - 60 µl) je patrné, že došlo k takřka úplnému navázání cyklinu H na kolonu. Z důvodu relativně velkého mrtvého objemu chromatografického systému (mezi zásobníkem mobilní fáze a kolonou je rozdíl 6 ml, kolonou a sběračem frakcí 4 ml), je patrné, že k eluci cyklinu H začalo docházet už při 5 mM imidazolu a 100 mM KCl.



Obrázek 10: Detekce rekombinantního proteinu cyklin H ve vybraných frakcích po jeho purifikaci, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).

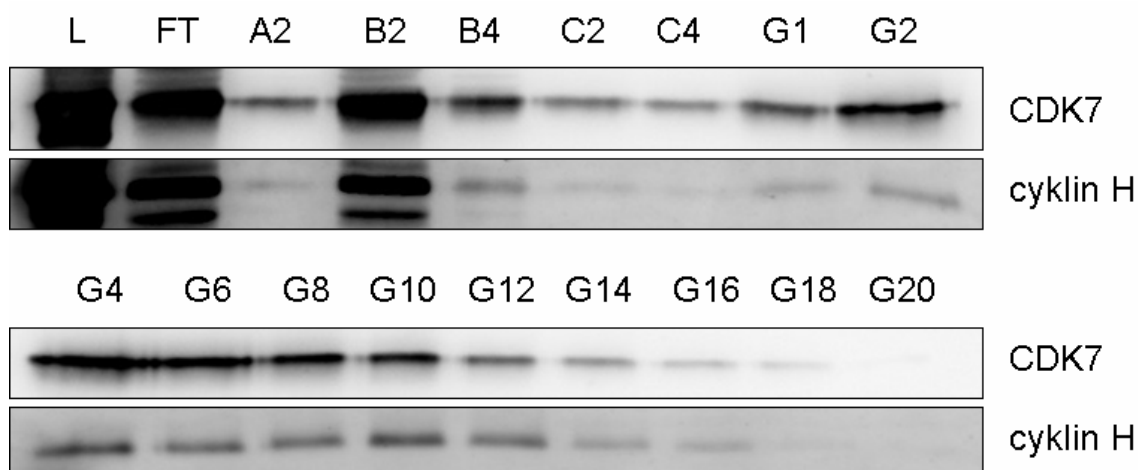
Monomerní MAT1 se na rozdíl od cyklinu H nevázal tolik silně na kolonu, jelikož se v promývacích krocích velké množství proteinu vymylo (Obr.11). K eluci navázaného MAT1 začalo docházet také při 5 mM imidazolu a 100 mM KCl, ovšem eluoval se později a také pomaleji než cyklin H.



Obrázek 11: Detekce rekombinantního proteinu MAT1 ve vybraných frakcích po jeho purifikaci, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).

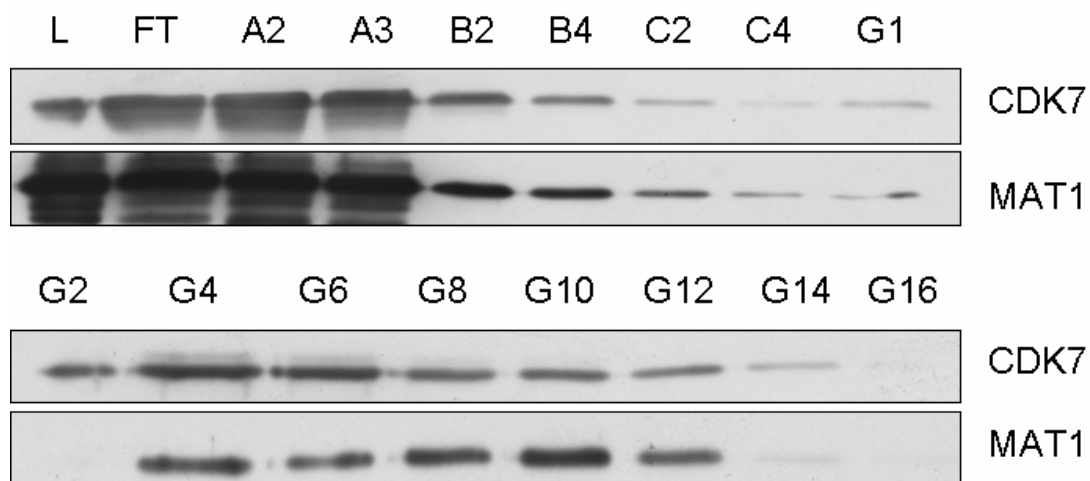
V případě purifikace binárního komplexu CDK7/cyklin H a jeho detekce ve frakcích bylo patrné, že se oba proteiny slabě vázaly na kolonu, velké množství bylo totiž vymyto v promývacích krocích B2 a B3 (Obr.12). K eluci navázaných proteinů začalo docházet také již při použití 5 mM imidazolu a 100 mM KCl. Z elučních profilů

obou proteinů je patrné, že se CDK7 pravděpodobně navázala na cyklin H a zároveň s ním se i podle předpokladu eluovala. Toto pozorování je navíc podpořeno faktem, že rekombinantní CDK7 postrádá 6×H značku, a nemůže se tudíž na Ni²⁺-NTA kolonu vázat. Eluční profil cyklinu H v komplexu s CDK7 odpovídá elučnímu profilu samotného cyklinu H.



Obrázek 12: Detekce komplexu rekombinantních proteinů CDK7 a cyklin H ve vybraných frakcích po jeho purifikaci, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).

Následně byl purifikován komplex CDK7/MAT1. Z obrázku 13 lze usoudit, že velká část proteinů se na koloně vůbec nezachytila. Zachycená CDK7 se pravděpodobně vážala na MAT1, jelikož eluční profily obou proteinů navzájem korespondovaly a k jejich eluci začalo docházet také při 5 mM imidazolu a 100 mM KCl. Kvůli absenci 6×H značky u CDK7 je opět podpořena domněnka o koeluci obou proteinů. Eluční profil MAT1 v komplexu s CDK7 opět odpovídal elučnímu profilu samotného MAT1.



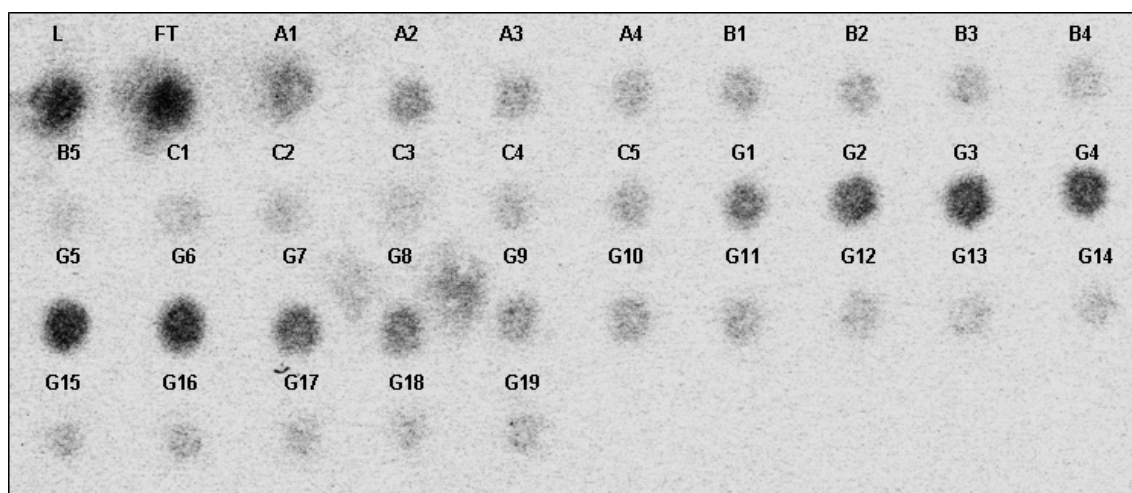
Obrázek 13: Detekce komplexu rekombinantních proteinů CDK7 a MAT1 ve vybraných frakcích po jeho purifikaci, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).

V případě purifikace komplexu CDK7/cyklin H/MAT1 se opět velké množství proteinů vymylo už promývacích krocích. K eluci všech tří proteinů začalo docházet také při 5 mM imidazolu a 100 mM KCl a vzhledem k podobnosti elučních profilů lze předpokládat, že všechny tři proteiny opravdu vytvořily komplex a společně se eluovaly (Obr.14). Ve frakcích byla poté pomocí enzymového testu detekována aktivita CDK7 (Obr.15), přičemž relativní hodnoty získané pomocí softwaru Multi Gauge (verze 2.0, Fujifilm) byly normalizovány na nejvyšší hodnotu, převedeny na procenta a vyneseny do grafu (Obr.16). Porovnáním obrázků 14 a 16 lze usoudit, že oba výsledky navzájem korespondují. Pouze ve frakci A2 byla stanovena nižší aktivita CDK7, než by se dalo předpokládat podle výsledku z imunoblottingu.

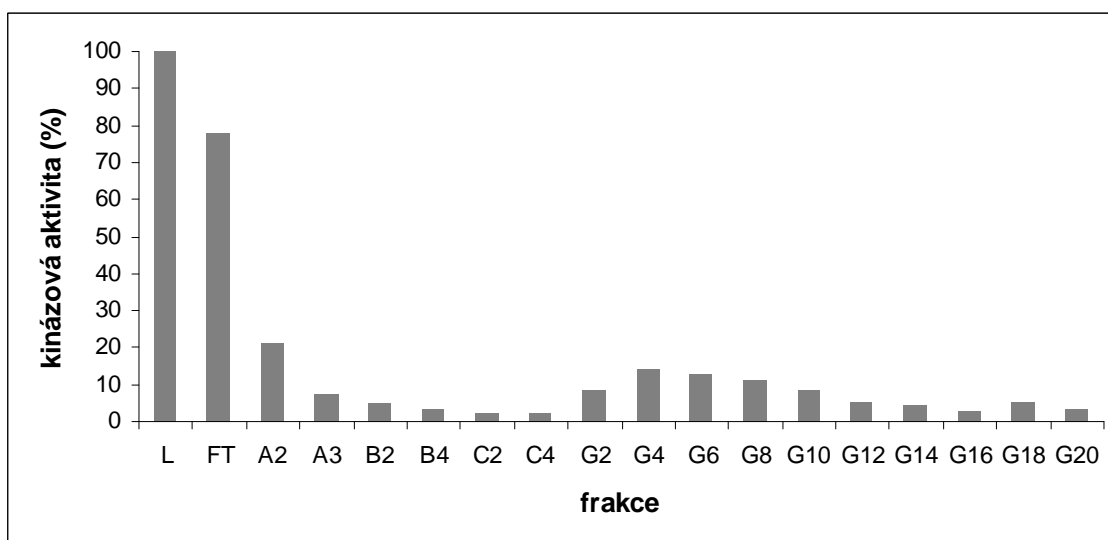
Nízká aktivita a zejména stabilita získaného preparátu CDK7/cyklin H/MAT1 však neumožnila provést kinetická měření pro zjištění inhibiční účinnosti vybraných sloučenin.



Obrázek 14: Detekce komplexu rekombinantních proteinů CDK7, cyklin H a MAT1 ve vybraných frakcích po jeho purifikaci, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).



Obrázek 15: Digitální autoradiogram fosforylace substrátu CDK7 frakcemi po purifikaci komplexu CDK7/cyklin H/MAT1, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).



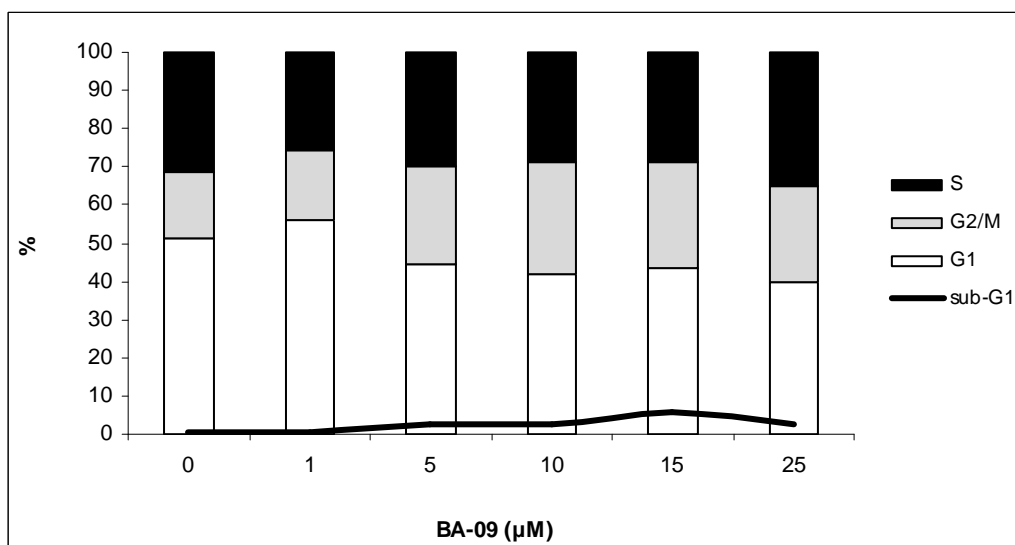
Obrázek 16: Relativní aktivita CDK7 ve vybraných frakcích po purifikaci komplexu CDK7/cyklin H/MAT1, kde L značí lyzát a FT proteiny nezachycené na koloně (flow-through frakce byla sebrána před zapojením kolony do chromatografického systému).

6.3. Vliv látek BA-09, LGR490 a LGR2629 na nádorovou buněčnou linii MCF-7

Pro zjištění podílu inhibice CDK7 na antiproliferačních účincích nízkomolekulárních inhibitorů byla provedena série experimentů s látkami LRR2629 a LRR490, což jsou purinová analoga pyrazolo[1,5-a]pyrimidinové sloučeniny BS-181, která byla nedávno popsána jako vysoce selektivní inhibitor CDK7 (Ali et al., 2009). Jelikož nebyl BS-181 během konání experimentů komerčně dostupný, byla v Laboratoři růstových regulátorů PřF UP připravena uvedená analoga. Navíc byly provedeny experimenty se sloučeninou BA-09, rovněž připravenou v Laboratoři růstových regulátorů.

Buněčná linie MCF-7 byla 24 hodin inkubována s látkou BA-09 v koncentracích 1, 5, 10, 15 a 25 μM . Od 5 μM koncentrace byla patrná stagnace růstu, zvýšené množství apoptotických buněk bylo pozorováno poprvé při 10 μM koncentraci látky a při vyšších koncentracích byla apoptóza ještě výraznější.

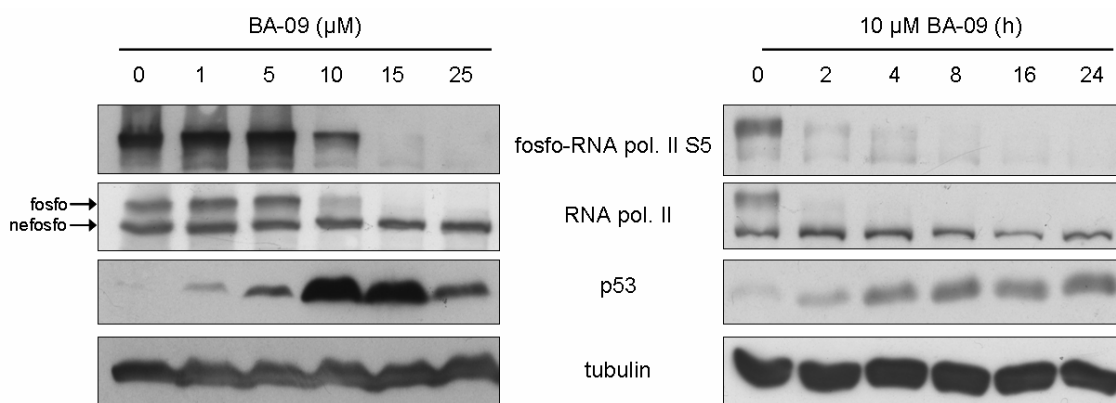
Buňky MCF-7 byly po inkubaci s látkou BA-09 sklizeny a následně u nich byly po obarvení propidium jodidem s využitím průtokové cytometrie sledovány změny v rozložení fází buněčného cyklu. Data získaná z měření na průtokovém cytometru byla analyzována pomocí programu MultiCycle AV for Windows (verze 3.00, Phoenix Flow Systems). Získané procentuální hodnoty byly poté vyneseny do grafu (Obr.17). Z výsledku je patrné, že už při 5 μM koncentraci BA-09 došlo k mírnému poklesu množství buněk v G1 fázi a nárůstu počtu buněk ve fázi G2/M. V závislosti na vzrůstající koncentraci látky také došlo k mírnému nárůstu sub-G1 populace, která odpovídá apoptotickým buňkám.



Obrázek 17: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu v linii MCF-7 po 24 hodinové inkubaci s látkou BA-09. Data byla získána analýzou pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

U buněk MCF-7 ovlivněných látkou BA-09 byla dále pomocí SDS-PAGE s následným imunoblottingem sledována hladina RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a nádorového supresoru p53. Fosforylace S5 je specificky katalyzována právě CDK7 a vzrůst hladiny proteinu p53 je považován za nepřímý důsledek bloku transkripce (Demidenko & Blagosklonny, 2004). Fosforylace S5 RNA polymerázy II začala klesat při 10 µM koncentraci a v koncentracích 15 µM a 25 µM nebyla prakticky detekována (Obr.18). Tento efekt byl pozorován i při detekci celkové RNA polymerázy II, kde pomaleji migrující pás odpovídal fosforylované formě a rychleji migrující pás formě nefosforylované. Hladina p53 začala vzrůstat při 5 µM koncentraci a maximální úroveň dosáhla při 10 µM koncentraci, přičemž v dalších koncentracích se projevil sestupný trend.

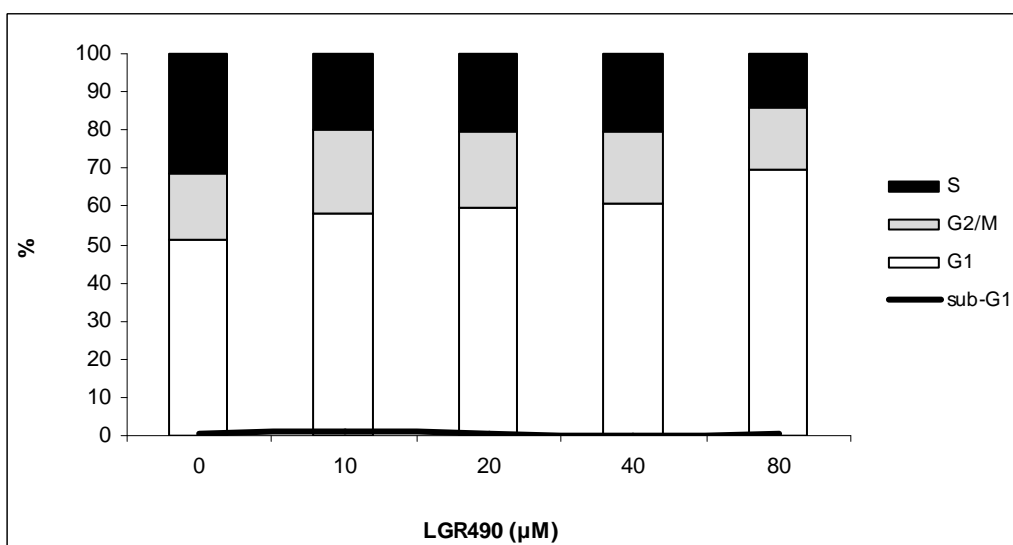
Abychom zjistili, jak rychlý je účinek této látky, byla vybrána 10 µM koncentrace BA-09, při které byly nejdříve pozorovány změny v hladinách proteinů, a její účinek na linii MCF-7 byl sledován v časových intervalech 2, 4, 8, 16 a 24 hodin. Z výsledků je patrné, že už po 2 hodinové inkubaci téměř úplně klesla fosforylace RNA polymerázy II na S5, což bylo potvrzeno i detekcí celkové RNA polymerázy II, a navíc začala vzrůstat také hladina p53.



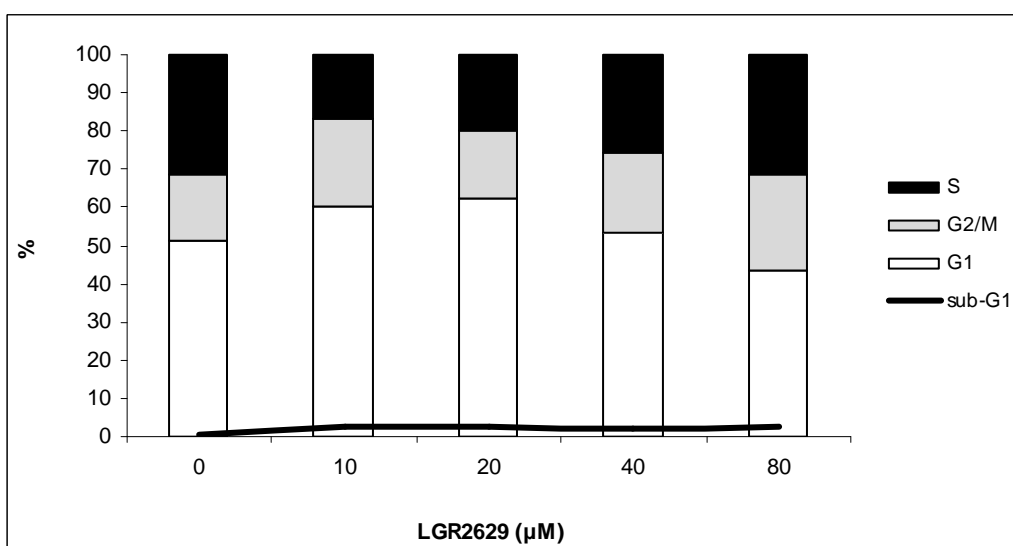
Obrázek 18: Hladina proteinů RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a p53 v buňkách MCF-7 inkubovaných 24 hodin s látkou BA-09. Jako kontrola rovnoměrného nanesení proteinů do jamek byla provedena detekce tubulinu.

MCF-7 linie byla 24 hodin inkubována také s látkami LGR490 nebo LGR2629, a to v koncentracích 10, 20, 40 a 80 μM. Buňky MCF-7 ovlivněné LGR490 nevykazovaly při žádné koncentraci známky apoptózy, pouze při 80 μM koncentraci byla patrná stagnace růstu. Zatímco po ovlivnění MCF-7 látkou LGR2629 byla pozorována stagnace růstu už při 40 μM koncentraci a přítomnost apoptotických buněk při 80 μM koncentraci látky.

Pomocí průtokové cytometrie byly u ovlivněných buněk MCF-7 opět sledovány změny v rozložení fází cyklu, přičemž data získaná po vyhodnocení programem Multicycle AV for Windows byla vynesena do grafů (Obr.19, Obr.20). Z výsledků je patrné, že při aplikaci látky LGR490 rostl počet buněk v G1 fázi v závislosti na vzrůstající koncentraci látky a zároveň klesalo množství buněk ve fázi S. Sub-G1 populace nebyla téměř zaznamenána, což svědčí o viabilitě buněk. U buněk ovlivněných LGR2629 byl nejprve při 10 μM koncentraci pozorován nárůst počtu buněk v G1 a G2/M fázích ve vztahu k neovlivněným buňkám, ovšem v dalších koncentracích docházelo spíše k nárůstu ve fázi S a poklesu ve fázi G1. Sub-G1 populace nepatrně vzrostla už při 10 μM koncentraci LGR2629 a dále zůstala nezměněna.



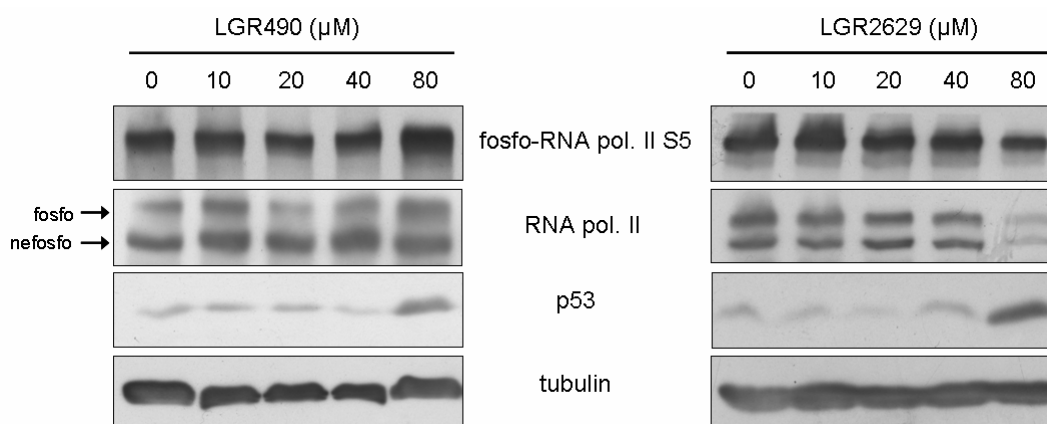
Obrázek 19: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu v linii MCF-7 po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR490. Data byla získána analýzou pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).



Obrázek 20: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu v linii MCF-7 po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR2629. Data byla získána analýzou pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

Pomocí SDS-PAGE a imunoblottingu byly u MCF-7 buněk po inkubaci s látkami LGR490 a LGR2629 sledovány hladiny proteinů RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a nádorového supresoru p53 (Obr.21). Hladina fosforylované formy RNA polymerázy II na S5 se neměnila při žádné koncentraci LGR490 a u látky LGR2629 byl pozorován její nepatrný pokles teprve při 80 µM koncentraci. Toto pozorování bylo potvrzeno i detekcí celkové RNA polymerázy II. Při 80 µM koncentraci LGR2629 byl sledován také pokles nefosforylované formy RNA

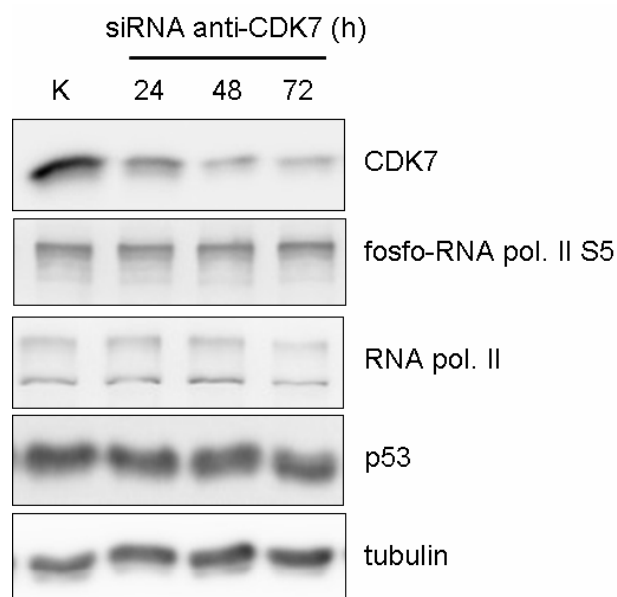
polymerázy II. Hladina p53 vzrostla rovněž při 80 μM koncentraci, a to po aplikaci obou sloučenin.



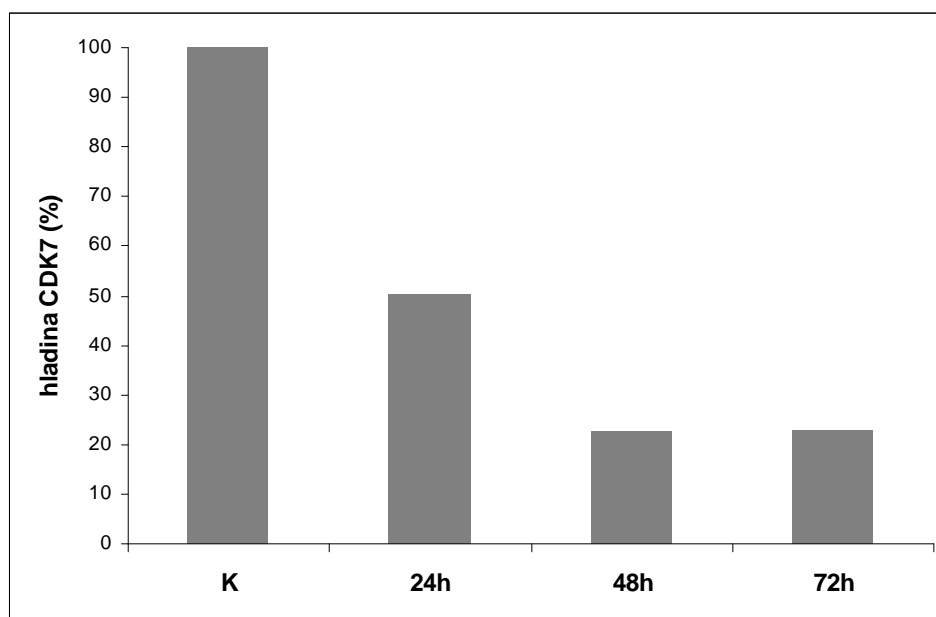
Obrázek 21: Hladina proteinů RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a p53 v buňkách MCF-7 inkubovaných 24 hodin s látkami LGR490 a LGR2629. Jako kontrola rovnoměrného nanesení proteinů do jamek byla provedena detekce tubulinu.

6.4. Vliv umlčení exprese CDK7 v nádorové linii MCF-7 pomocí siRNA

U buněk MCF-7 transfekovaných CDK7 siRNA sklizených v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin byla metodou SDS-PAGE s následným imunoblottingem sledována hladina CDK7, RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a nádorového supresoru p53. Hladina CDK7 klesla výrazně již po 24 hodinách, po 48 hodinách od transfekce klesla dále, ale poté se již neměnila. Kvantifikací hladin proteinu CDK7 (Obr.22) pomocí softwaru Multi Gauge byla získána data, která byla vyjádřena v relativních hodnotách, převedena na procenta a následně vynesena do grafu (Obr.23). Po 24 hodinové inkubaci tedy hladina CDK7 klesla asi na 50 %, po 48 hodinách přibližně na 22 % a po 72 hodinách zůstala přibližně na 22 %. Dále byla sledována hladina substrátu CDK7 RNA polymerázy II a její fosforylované formy na S5, které zůstaly ve všech časových intervalech nezměněné stejně jako bazální hladina nádorového supresoru p53.



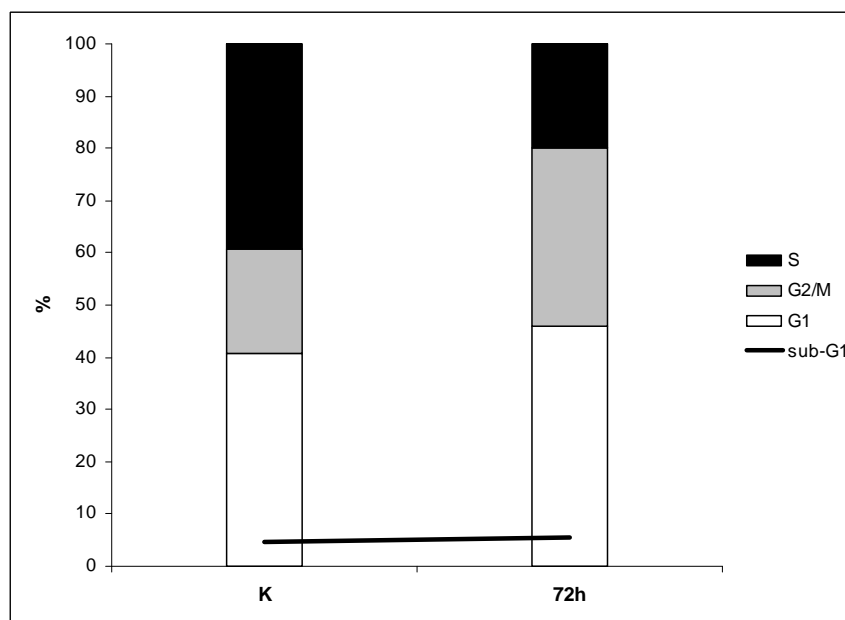
Obrázek 22: Hladina proteinů CDK7, RNA polymerázy II fosforylované na S5, celkové RNA polymerázy II a p53 v buňkách MCF-7 transfekovaných CDK7 siRNA a v kontrolních buňkách, které nebyly ovlivněny. Pás p53 je záměrně přexponován pro ověření bazální hladiny tohoto proteinu. Jako kontrola rovnoměrného nanesení proteinů do jamek byla provedena detekce tubulinu.



Obrázek 23: Hladina CDK7 po umlčování její exprese pomocí siRNA v nádorové linii MCF-7, kde K značí kontrolní neovlivněné buňky. Buňky byly sklizeny v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po transfekci siRNA. Hladina CDK7 byla kvantifikována pomocí programu MultiGauge (verze 2.0) z digitálního záznamu imunoblottingu.

U transfekovaných buněk MCF-7 byly po 72 hodinové inkubaci pomocí průtokové cytometrie sledovány také změny v rozložení fází buněčného cyklu a data získaná po vyhodnocení programem Multicycle AV for Windows byla vynesena do grafu (Obr.24). Z výsledku je patrné, že došlo k výraznému nárůstu počtu buněk v G2/M fázi

a poklesu množství buněk ve fázi S, přičemž sub-G1 populace zůstala prakticky nezměněna. Výsledek odpovídá mikroskopickému pozorování, jelikož u transfekovaných buněk byla už po 48 hodinové inkubaci pozorována stagnace růstu, známky apoptózy ovšem sledovány nebyly.



Obrázek 24: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu v linii MCF-7 po její transfekci CDK7 siRNA a následné 72 hodinové inkubaci, kde K značí kontrolní neovlivněné buňky. Data byla získána analýzou pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

7. Diskuze

Inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou v současnosti studovány pro své antiproliferační a protinádorové vlastnosti. Jejich praktické využití v léčbě rakoviny je však zatím stále nejisté, přestože řada z nich prochází klinickými experimenty (Kryštof & Uldrijan, 2010; McInnes, 2008). Problematická je především selekce vhodných skupin pacientů a jednoznačně zatím není vyřešena ani otázka, zda se v léčbě uplatní inhibitory skupinově selektivní pro většinu CDK nebo spíše inhibitory přísně monospecifické. Možné využití monospecifických inhibitorů CDK bylo zpochybněno zjištěním, že inhibice některých CDK může vést ke kompenzaci jejich funkce jinými typy CDK. Například knockout *cdk2* u myšičího modelu neměl dopad na viabilitu (Berthet et al., 2003) a myšičí embryonální fibroblasty s touto mutací proliferovaly také relativně normálně (Sherr & Roberts, 2004). Možným vysvětlením může být právě kompenzace funkcí CDK2 prostřednictvím CDK1 (Cai et al., 2006). V podobných experimentech byla vyřazena také funkce buď CDK4 nebo CDK6, přičemž oba typy mutovaných modelů byly životaschopné, ačkoli tyto inaktivace postihly proliferaci specifických typů buněk (Malumbres & Barbacid, 2005). Ztráta CDK4 aktivity narušila postnatální proliferaci pankreatických β -buněk a laktotrofů hypofýzy, ovšem neměla výrazný dopad na neogenezi těchto typů buněk z embryonálních prekurzorů (Malumbres & Barbacid, 2005). Díky daným defektům se projevila u mutovaných modelů sterilita, a navíc u nich došlo k vývoji diabetu (Sherr & Roberts, 2004). Inaktivace CDK6 zase vedla k mírným defektům v hematopoéze, a to především ve vývoji erytrocytů (Malumbres & Barbacid, 2005). Vyřazení obou enzymů najednou sice způsobilo pozdní embryonální letalitu kvůli vzniku megaloblastické anémie, mnoho embryonálních buněčných populací však bez problémů proliferovalo (Malumbres et al., 2004, Tsutsui et al., 1999). Na základě těchto pozorování lze tedy předpokládat, že CDK4 může u prekurzorů erytrocytů částečně kompenzovat ztrátu CDK6, a navíc může být ztráta CDK4 a CDK6 u dvojitých mutovaných forem v raném embryonálním vývoji zastoupena CDK2 (Malumbres & Barbacid, 2005).

Při aplikaci vysoce selektivních inhibitorů CDK7 by ovšem nemělo docházet ke kompenzaci její funkce prostřednictvím jiných CDK, jelikož by byla díky inhibici CDK7 snížena i jejich samotná aktivita, s výjimkou CDK9. CDK9 se nezdá být substrátem pro CDK7 (Chen et al., 2004), přičemž biochemické experimenty dokonce svědčí o aktivující autofosforylaci CDK9 (Baumli et al., 2008). Proto by mohlo potenciálně docházet ke kompenzaci funkce CDK7 právě prostřednictvím CDK9. Zatím

ovšem nebyly provedeny experimenty, které by tento jev potvrdily, a jedná se tudíž pouze o spekulaci.

Na druhou stranu je pozoruhodné, že některé některé typy nádorů jsou přímo závislé na přítomnosti určité CDK. Bylo například potvrzeno, že k indukci tvorby adenokarcinomu prsní žlázy je nezbytná přítomnost CDK4 (Reddy et al., 2005). Zůstává otázkou, zda je také pro vývoj některých nádorových onemocnění nepostradatelná funkce CDK7, popřípadě CDK9.

Příklad využití vysoce selektivních inhibitorů CDK7 v klinické praxi nastínil Malumbres et al. (2008). Specifická inhibice CDK7 brání tvorbě komplexu CDK1/cyklin B (Larochelle et al., 2007), a lze tedy předpokládat, že bude mít tato inhibice podobný efekt jako inhibice samotné CDK1 (Malumbres et al., 2008). Bylo prokázáno, že některá nádorová onemocnění vyznačující se zvýšenou expresí *c-myc* onkogenu jsou velmi citlivá právě k inhibici CDK1 (Goga et al., 2007), a mohla by být tudíž senzitivní i k inhibici CDK7. Navíc by mohly mít vysoce selektivní inhibitory CDK7 dvojí antiproliferační účinek, a to z hlediska inhibice buněčného cyklu a zároveň transkripce.

Pro posouzení účinnosti nízkomolekulárních inhibitorů na enzymové úrovni bylo jedním z cílů praktické části této práce purifikovat CDK7/cyklin H/MAT1 komplex, jehož exprese proběhla v hmyzím systému buněk Sf9 po jejich infekci třemi typy bakulovirů s kódujícími sekvencemi pro CDK7 s hemagglutininovou značkou a cyklin H a MAT1 s 6×H značkou. Detekcí hladin těchto proteinů ve frakcích po purifikaci CDK7/cyklin H/MAT1 komplexu byl pozorován počátek eluce všech tří proteinů při 5 mM imidazolu a 100 mM KCl (Obr.14). Lze tedy předpokládat, že došlo opravdu k vytvoření komplexu mezi danými proteiny. Velké množství proteinů se ovšem vymylo už v promývacích krocích, což svědčí o nízké vazebné afinitě komplexu. Navíc eluce vázaného enzymu proběhla již při velmi nízké koncentraci imidazolu. Ke zjištění aktivity CDK7/cyklin H/MAT1 komplexu v jednotlivých frakcích byl proveden enzymový test, jehož vyhodnocení potvrdilo výsledek imunoblottingu, neboť hodnoty aktivit ve frakcích korelovaly s hladinami CDK7 (Obr.16). Pouze ve frakci A2 byla změřena nižší aktivita, než by se dalo předpokládat podle výsledku imunodetekce.

Relativně nízký výtěžek purifikace může být způsoben mnoha faktory. Jednou z možností je kompetice monomerů, binárních komplexů a ternárního komplexu rekombinantních proteinů s 6×H značkami o vazebná místa na koloně. Mohlo dojít ovšem i k částečnému maskování 6×H značek v případě CDK7/cyklin H/MAT1 komplexu, nebo mohla mít některá afinitní značka na rekombinantních proteinech negativní vliv na strukturu a stabilitu celého ternárního komplexu.

Dalším problémem pro úspěšné využití produkovaného enzymu byla velmi nízká stabilita jeho aktivity, která již během jednoho dne výrazně klesla a vzhledem k časové náročnosti kvantifikace aktivity bylo nemožné provést optimalizaci měření aktivity, případně studovat inhibiční schopnosti testovaných sloučenin.

Inhibice aktivity CDK7 však byla sledována přímo v buňkách MCF-7 ovlivněných některými nízkomolekulárními inhibitory CDK. Vybrány byly trisubstituované puriny BA-09, LGR490 a LGR2629 připravené v Laboratoři růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

BA-09, derivát olomoucínu II (Kryštof et al., 2002), je poměrně účinným skupinově selektivním inhibitorem, neboť v enzymových testech inhiboval CDK2, CDK5 a CDK9 s hodnotami IC_{50} 4x nižšími než olomoucín II, a dokonce 15x nižšími než roskovitín (Jorda et al., 2011). IC_{50} pro CDK7 byla stanovena na 97 nM (nepublikované experimenty Jorda et al.), přičemž u nádorových linií K562 a HCT-116 byl pozorován také pokles fosforylace S5 RNA polymerázy II po 24 hodinové inkubaci s 5 μ M BA-09, což rovněž svědčí o inhibici CDK7 (Jorda et al., 2011). V této práci byl sledován vliv BA-09 na linii MCF-7. Po 24 hodinové inkubaci začala při 10 μ M BA-09 klesat fosforylace S5 RNA polymerázy II a zároveň vzrostla hladina nádorového supresoru p53, a lze tedy předpokládat, že došlo k inhibici CDK7 (Obr.18). Tento efekt byl poměrně rychlý, neboť pokles fosforylace S5 a nárůst hladiny p53 byly pozorovány už po 2 hodinové inkubaci MCF-7 linie s 10 μ M BA-09 (Obr.18). Výsledky analýzy buněčného cyklu ukázaly, že při 5 μ M BA-09 vzrostl počet buněk v G2/M fázi a došlo také k mírnému nárůstu sub-G1 populace, která reprezentuje apoptotické buňky (Obr.17). Na základě popsaných výsledků lze tedy předpokládat, že antiproliferační účinek BA-09 je minimálně z části způsoben inhibicí CDK7.

V literatuře byl nedávno popsán údajně vysoce selektivní inhibitor CDK7, a to sloučenina BS-181 (Ali et al., 2009). V enzymových testech s rekombinantními proteiny je inhibice CDK7 přibližně 200x silnější než CDK9. Dle teoretického modelu je vysoká afinita k CDK7 způsobena elektrostatickými interakcemi aminohexylaminového postranního řetězce BS-181 s fosfátem T170 a karbonylem hlavního řetězce E20, které se interakcí s ostatními inhibitory CDK spíše neúčastní. Navíc dochází k tvorbě četných van der Waalsových kontaktů mezi uhlíky aminohexylaminového řetězce a vazebnou kapsou, které také přispívají k afinitě BS-181 k CDK7. Na druhou stranu popsané buněčné experimenty však žádný rozdíl v inhibici CDK7 a CDK9 nedokládají, neboť pokles fosforylace S2 a S5 RNA polymerázy II u MCF-7 linie probíhá víceméně současně (Ali et al., 2009). Jelikož BS-181 nebyl během konání experimentů komerčně dostupný, byl v Laboratoři růstových regulátorů připraven jeho purinový analog LGR2629 (Obr.7B).

Po 24 hodinové inkubaci MCF-7 linie s LGR2629 byl sledován nepatrný pokles fosforylace S5 RNA polymerázy II a výrazný vzestup hladiny p53 teprve při 80 μ M koncentraci látky (Obr.21). Při téže koncentraci prokázala analýza buněčného cyklu pokles buněk v G1 fázi, nárůst množství buněk ve fázích G2/M a S a mírný vzestup sub-G1 populace. Tato pozorování sice potvrzují inhibici CDK7 látkou LGR2629, ale vzhledem k vysoké koncentraci látky se LGR2629 jeví jako velmi slabý inhibitor.

Abychom zjistili, jaký význam má hydrofobicita postranního šestiuhlíkatého lineárního řetězce, byla pro srovnání účinků LGR2629 použita látka LGR490 (Obr.7C), která má na rozdíl od LGR2629 o dva atomy delší postranní řetězec, přičemž C3 a C6 tohoto řetězce jsou substituovány za dva atomy kyslíku. Po 24 hodinové inkubaci MCF-7 linie s LGR490 byla pozorována stagnace růstu až při 80 μ M koncentraci látky, imunodetekce ovšem neprokázala žádný pokles fosforylace S5 RNA polymerázy II. Při dané koncentraci byla pouze detekována zvýšená hladina p53. Výsledky analýzy buněčného cyklu neukázaly žádné významné rozdíly ve změnách rozložení fází cyklu, jen při nejvyšší koncentraci byl sledován mírný nárůst počtu buněk v G1 fázi. Na základě těchto faktů je tedy pravděpodobné, že hydrofobicita jakožto i délka postranního aminohexylaminového řetězce LGR2629 je důležitá pro interakci inhibitoru s vazebnou kapsou CDK7, a navíc může hrát také jistou roli při transportu sloučeniny do buňky.

Pro porovnání účinků testovaných sloučenin na linii MCF-7 bylo provedeno umlčení exprese CDK7 pomocí siRNA. Imunodetekce prokázala pokles hladiny CDK7 na 22 % po 48 hodinách od transfekce, fosforylace S5 a hladina p53 však zůstaly nezměněné (Obr.23). Výsledky analýzy buněčného cyklu ale ukazují nárůst počtu buněk v G2/M fázi po 72 hodinách od transfekce (Obr.24). Možnou příčinou tohoto jevu je snížená aktivační fosforylace CDK1 prostřednictvím CDK7, která je vyžadována pro zahájení mitózy. Jde ovšem pouze o domněnku a vzhledem k nezměněným markerům zablokování transkripce se umlčení exprese CDK7 pomocí siRNA nejeví jako zcela vhodná technologie, protože protein má relativně vysokou stabilitu a změny fenotypu je nutné sledovat v delších časových intervalech po transfekci. Naproti tomu odezvy na působení nízkomolekulárního inhibitoru na aktivitu enzymu jsou patrné v řádu desítek minut nebo jednotek hodin. Protože umlčení CDK7 nebylo ani po 72 hodinách od transfekce úplné, byl experiment zopakován i pro delší časové intervaly (5 a 7 dní), ovšem nebyl technicky úspěšný.

Na základě výsledků této práce je zřejmé, že inhibice CDK7 může přispívat k protinádorovému působení inhibitorů CDK, protože BA-09 evidentně snižuje aktivitu CDK7 v buňkách MCF-7, což se jistě projevuje na expresi méně stabilních proteinů, jako jsou cykliny, a také na aktivitě CDK regulujících buněčný cyklus (CDK1, 2 a 4).

8. Závěr

Tato práce shrnuje strukturní a funkční vlastnosti CDK-aktivačního komplexu a podává přehled inhibitorů CDK se zaměřením na transkripční CDK. Po praktické stránce práce přináší charakterizaci působení skupinově selektivního purinového derivátu BA-09 a dalších dvou purinových sloučenin LGR490 a LGR2629, které jsou strukturně blízké selektivnímu inhibitoru CDK7 BS-181, na nádorovou buněčnou linii MCF-7. U sloučenin BA-09 a LGR2629 byl pozorován vliv na pokles fosforylace S5 RNA polymerázy II v buňkách MCF7, což svědčí o inhibici CDK7. Utláčení exprese CDK7 pomocí siRNA však bylo pouze částečné (na 50% hladinu po 24 hodinách a na 22% po 48 hodinách). Protože buňky vystavené vlivu CDK7 siRNA nevykazovaly změny v markerech zablokování transkripce, dá se předpokládat, že je CDK7 v buňkách ve velkém nadbytku, a navíc může být i reziduální hladina proteinu dostačující pro plnění svých funkcí. Relativně vysoká stabilita CDK7 tak znemožňuje zjistit jednoduše její nezbytnost pro proliferaci a viabilitu buněk.

9. Použitá literatura

- Akoulitchev S., Chuikov S., Reinberg D. (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-106.
- Aldoss I.T., Tashi T., Ganti A.K. (2009) Seliciclib in malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 1957-1965.
- Ali S., Heathcote D.A., Kroll S.H., Jogalekar A.S., Scheiper B., Patel H., Brackow J., Siwicka A., Fuchter M.J., Periyasamy M., Tolhurst R.S., Kanneganti S.K., Snyder J.P., Liotta D.C., Aboagye E.O., Barrett A.G., Coombes R.C. (2009) The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Res* **69**, 6208-6215.
- Andersen G., Busso D., Poterszman A., Hwang J.R., Wurtz J.M., Ripp R., Thierry J.C., Egly J.M., Moras D. (1997) The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *EMBO J* **16**, 958-967.
- 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**, 1907-1918.
- Berthet C., Aleem E., Coppola V., Tessarollo L., Kaldis P. (2003) Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* **13**, 1775-1785.
- Bettayeb K., Tirado O.M., Marionneau-Lambot S., Ferandin Y., Lozach O., Morris J.C., Mateo-Lozano S., Drueckes P., Schächtele C., Kubbutat M.H., Liger F., Marquet B., Joseph B., Echalié A., Endicott J.A., Notario V., Meijer L. (2007) Meriolins, a new class of cell death inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* **67**, 8325-8334.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Buck V., Russell P., Millar J.B.A. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *EMBO J* **14**, 6173-6183.

- Busso D., Keriel A., Sandrock B., Poterszman A., Gileadi O., Egly J.M. (2000) Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIH transcription activities. *J Biol Chem* **275**, 22815-22823.
- Cai D., Latham V.M. Jr, Zhang X., Shapiro G.I. (2006) Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* **66**, 9270-9280.
- Chen D., Riedl T., Washbrook E., Pace P.E., Coombes R.C., Egly J.M., Ali S. (2000) Activation of estrogen receptor α by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol Cell* **6**, 127-137.
- Chen R., Yang Z., Zhou Q. (2004) Phosphorylated positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is tagged for inhibition through association with 7SK snRNA. *J Biol Chem* **279**, 4153-4160.
- Chen R., Keating M.J., Gandhi V., Plunkett W. (2005) Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* **106**, 2513-2519.
- Cismowski M.J., Laff G.M., Solomon M.J., Reed S.I. (1995) *KIN28* encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol* **15**, 2983-2992.
- Darbon J.M., Devault A., Taviaux S., Fesquet D., Martinez A.M., Galas S., Cavadore J.C., Dorée M., Blanchard J.M. (1994) Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase. *Oncogene* **9**, 3127-3138.
- Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. (2004) Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res* **64**, 3653-3660.
- Desai D., Gu Y., Morgan D.O. (1992) Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. *Mol Biol Cell* **3**, 571-582.

- Drané P., Compe E., Catez P., Chymkowitz P., Egly J.M. (2004) Selective regulation of vitamin D receptor-responsive genes by TFIIH. *Mol Cell* **16**, 187-197.
- Egloff S., O'Reilly D., Chapman R.D., Taylor A., Tanzhaus K., Pitts L., Eick D., Murphy S. (2007) Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**, 1777-1779.
- Feaver W.J., Svejstrup J.Q., Henry N.L., Kornberg R.D. (1994) Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. *Cell* **79**, 1103-1109.
- Fesquet D., Labbé J.C., Derancourt J., Capony J.P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Dorée M., Cavadore J.C. (1993) The *MO15* gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J* **12**, 3111-3121.
- Fisher R.P., Jin P., Chamberlin H.M., Morgan D.O. (1995) Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* **83**, 47-57.
- Fisher R.P. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* **118**, 5171-5180.
- Garrett S., Barton W.A., Knights R., Jin P., Morgan D.O., Fisher R.P. (2001) Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Mol Cell Biol* **21**, 88-99.
- Gervais V., Busso D., Wasielewski E., Poterszman A., Egly J.M., Thierry J.C., Kieffer B. (2001) Solution structure of the N-terminal domain of the human TFIIH MAT1 subunit: new insights into the RING finger family. *J Biol Chem* **276**, 7457-7464.
- Goga A., Yang D., Tward A.D., Morgan D.O., Bishop J.M. (2007) Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat Med* **13**, 820-827.
- Heredia A., Davis C., Bamba D., Le N., Gwarzo M.Y., Sadowska M., Gallo R.C., Redfield R.R. (2005) Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication. *AIDS* **19**, 2087-2095.

- Heuer T.S. (October 21-24, 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.
- Hinrichsen R., Hansen A.H., Haunso S., Busk P.K. (2008) Phosphorylation of pRb by cyclin D kinase is necessary for development of cardiac hypertrophy. *Cell Prolif* **41**, 813-829.
- Inamoto S., Segil N., Pan Z.Q., Kimura M., Roeder R.G. (1997) The cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, MAT1, targets and enhances CAK activity on the POU domains of octamer transcription factors. *J Biol Chem* **272**, 29852-29858.
- Jorda R., Zatloukal M., Řezníčková E., Vymětalová L., Kryštof V., Strnad M. (February 5-8, 2011) Novel derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. CCRIC Cell Cycle Regulation/Inhibitors and Cancer. Vienna, Austria.
- Kaldis P., Sutton A., Solomon M.J. (1996) The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* **86**, 553-564.
- Kaldis P., Russo A.A., Chou H.S., Pavletich N.P., Solomon M.J. (1998) Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell* **9**, 2545-2560.
- Kaldis P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55**, 284-296.
- Komarnitsky P., Cho E.J., Buratowski S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**, 2452-2460.
- Korsisaari N., Rossi D.J., Paetau A., Charnay P., Henkemeyer M., Mäkelä T.P. (2002) Conditional ablation of the Mat1 subunit of TFIIH in Schwann cells provides evidence that Mat1 is not required for general transcription. *J Cell Sci* **115**, 4275-4284.

- Krek W., Nigg E.A. (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34^{cdc2} kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J* **10**, 305-316.
- Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 3283-3286.
- Kryštof V., McNae I.W., Walkinshaw M.D., Fischer P.M., Müller P., Vojtěšek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1763-1771.
- Kryštof V., Cankař P., Fryšová I., Slouka J., Kontopidis G., Džubák P., Hajdúch M., Srovnal J., de Azevedo W.F. Jr, Orság M., Paprskářová M., Rolčík J., Látr A., Fischer P.M., Strnad M. (2006) 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J Med Chem* **49**, 6500-6509.
- Kryštof V., Uldrijan S. (2010) Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* **11**, 291-302.
- Larochelle S., Pandur J., Fisher R.P., Salz H.K., Suter B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev* **12**, 370-381.
- Larochelle S., Chen J., Knights R., Pandur J., Morcillo P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Suter B., Fisher R.P. (2001) T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex *in vivo* and regulates its CTD kinase activity. *EMBO J* **20**, 3749-3759.
- Larochelle S., Merrick K.A., Terret M.E., Wohlbold L., Barboza N.M., Zhang C., Shokat K.M., Jallepalli P.V., Fisher R.P. (2007) Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell* **25**, 839-850.

- Lee K.M., Saiz J.E., Barton W.A., Fisher R.P. (1999) Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr Biol* **9**, 441-444.
- Lolli G., Lowe E.D., Brown N.R., Johnson L.N. (2004) The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Structure* **12**, 2067-2079.
- Lu H., Fisher R.P., Bailey P., Levine A.J. (1997) The CDK₇-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* **17**, 5923-5934.
- Malumbres M., Sotillo R., Santamaría D., Galán J., Cerezo A., Ortega S., Dubus P., Barbacid M. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-641.
- Malumbres M., Pevarello P., Barbacid M., Bischoff J.R. (2008) CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol Sci* **29**, 16-21.
- Manning G. (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, 1-19.
- Martinez A.M., Afshar M., Martin F., Cavadore J.C., Labbé J.C., Dorée M. (1997) Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J* **16**, 343-354.
- Matsuoka M., Kato J.Y., Fisher R.P., Morgan D.O., Sherr C.J. (1994) Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol Cell Biol* **14**, 7265-7275.
- McInnes C. (2008) Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discov Today* **13**, 875-881.
- Molz L., Booher R., Young P., Beach D. (1989) *cdc2* and the regulation of mitosis: six interacting *mcs* genes. *Genetics* **122**, 773-782.

- Morgan D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-291.
- Oelgeschläger T. (2002) Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* **190**, 160-169.
- Patel S.A., Simon M.C. (2010) Functional analysis of the Cdk7.cyclin H.Mat1 complex in mouse embryonic stem cells and embryos. *J Biol Chem* **285**, 15587-15598.
- Poon R.Y., Yamashita K., Adamczewski J.P., Hunt T., Shuttleworth J. (1993) The cdc2-related protein p40^{MO15} is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33^{cdk2} and p34^{cdc2}. *EMBO J* **12**, 3123-3132.
- Reddy H.K., Mettus R.V., Rane S.G., Graña X., Litvin J., Reddy E.P. (2005) Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* **65**, 10174-10178.
- Rochette-Egly C., Adam S., Rossignol M., Egly J.M., Chambon P. (1997) Stimulation of RAR α activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97-107.
- Rossi D.J., Londesborough A., Korsisaari N., Pihlak A., Lehtonen E., Henkemeyer M., Mäkelä T.P. (2001) Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking *Mat1*. *EMBO J* **20**, 2844-2856.
- Roy R., Adamczewski J.P., Seroz T., Vermeulen W., Tassan J.P., Schaeffer L., Nigg E.A., Hoeijmakers J.H., Egly J.M. (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIID transcription-DNA repair factor. *Cell* **79**, 1093-1101.
- Saiz J.E., Fisher R.P. (2002) A CDK-activating kinase network is required in cell cycle control and transcription in fission yeast. *Curr Biol* **12**, 1100-1105.
- Sano M., Izumi Y., Helenius K., Asakura M., Rossi D.J., Xie M., Taffet G., Hu L., Pautler R.G., Wilson C.R., Boudina S., Abel E.D., Taegtmeier H., Scaglia F., Graham B.H., Kralli A., Shimizu N., Tanaka H., Mäkelä T.P., Schneider M.D. (2007) Ménage-à-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPAR γ coactivator 1. *Cell Metab* **5**, 129-142.

- Santo L., Vallet S., Hideshima T., Cirstea D., Ikeda H., Pozzi S., Patel K., Okawa Y., Gorgun G., Perrone G., Calabrese E., Yule M., Squires M., Ladetto M., Boccadoro M., Richardson P.G., Munshi N.C., Anderson K.C., Raje N. (2010) AT7519, A novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma via GSK-3 β activation and RNA polymerase II inhibition. *Oncogene* **29**, 2325-2336.
- Senderowicz A.M. (2000) Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene* **19**, 6600-6606.
- Sherr C.J., Roberts J.M. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**, 2699-2711.
- Shuttleworth J., Godfrey R., Colman A. (1990) p40^{MO15}, a *cdc2*-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **9**, 3233-3240.
- Squires M.S., Feltell R.E., Wallis N.G., Lewis E.J., Smith D.M., Cross D.M., Lyons J.F., Thompson N.T. (2009) Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* **8**, 324-332.
- Sridhar J., Akula N., Pattabiraman N. (2006) Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *AAPS J* **8**, E204-221.
- Tassan J.P., Schultz S.J., Bartek J., Nigg E.A. (1994) Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* **127**, 467-478.
- Tassan J.P., Jaquenoud M., Fry A.M., Frutiger S., Hughes G.J., Nigg E.A. (1995) *In vitro* assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J* **14**, 5608-5617.
- Tsutsui T., Hesabi B., Moons D.S., Pandolfi P.P., Hansel K.S., Koff A., Kiyokawa H. (1999) Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27^{Kip1} activity. *Mol Cell Biol* **19**, 7011-7019.

- Vandel L., Kouzarides T. (1999) Residues phosphorylated by TFIID are required for E2F-1 degradation during S-phase. *EMBO J* **18**, 4280-4291.
- Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224**, 771-786.
- Wallenfang M.R., Seydoux G. (2002) *cdk-7* is required for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5527-5532.
- Węsierska-Gądek 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**, 228-241.
- Yankulov K.Y., Bentley D.L. (1997) Regulation of CDK7 substrate specificity by MAT1 and TFIID. *EMBO J* **16**, 1638-1646.

10. Seznam použitých zkratek

APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSA	Bovine serum albumin
CAK	CDK-activating kinase
Cak1	CDK-activating kinase (<i>S. cerevisiae</i>)
Ccl1	Ortholog of cyclin H (<i>S. cerevisiae</i>)
CDK	Cyclin-dependent kinase
c-Myc	Homolog of v-Myc (human)
v-Myc	v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
Csk1	Cyclin-dependent kinase activating kinase (<i>S. pombe</i>)
CTD	C-terminal domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E2F-1	E2F transcription factor 1
ECL	Enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
ER	Estrogen receptor
ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
Ets1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
FT	Flow-through
GSK3- β	Glycogen synthase kinase 3 β
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
Kin28	Protein kinase, subunit of the transcription factor TFIIH (<i>S. cerevisiae</i>)
MAT1	Ménage à trois 1
Mcl-1	Myeloid-cell leukemia 1
Mcs2	Ortholog of cyclin H (<i>S. pombe</i>)
Mcs6	CDK-activating kinase (<i>S. pombe</i>)

MDM2	Murine double minute 2
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NTA	Nitrilotriacetic acid
Oct-1	Organic cation transporter 1
p21 ^{Waf1/Cip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p40 ^{MO15}	Cyclin-dependent kinase 7
p53	Tumor suppressor
PBS	Phosphate buffered saline
pfu	Plaque forming units
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
Pmh1	Ortholog of MAT1 (<i>S. pombe</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PUMA	Bcl-2 binding component 3
RAM/Px	Rabbit anti-mouse antibody
RAR α	Retinoic acid receptor α
Rb	Retinoblastoma
RING	Really Interesting New Gene
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
snRNA	Small nuclear ribonucleic acid
SwAR/Px	Swine anti-rabbit antibody
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFIIH	Transcription factor IIH
TFIIE	Transcription factor IIE
TFIIF	Transcription factor IIF
Tfb3	Ortholog of MAT1 (<i>S. cerevisiae</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XPD	Xeroderma pigmentosum D

Pro označení aminokyselin byly použity jednopísmenné zkratky podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).