

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Inhibitory cyklin-dependentních kináz
a transkripční stres**

Diplomová práce

Bc. Eva Jašková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Školící pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů PŘF UP a Ústav
experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama s použitím uvedené literatury.“

Dne 7.5. 2010

Podpis.....

Souhrn

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) zaujímají zásadní role v řadě buněčných funkcí, jako je regulace buněčného cyklu a transkripce, diferenciaci buněk či navození buněčné smrti. Představují jednu z významných skupin možných budoucích cílů moderních protinádorových léčiv, neboť jejich aktivita je v řadě onemocnění nějak narušena. V současnosti již probíhá klinické ověřování účinnosti několika preparátů inhibujících CDK, mechanismus jejich protinádorového cytotoxického působení není ale stále zcela jednoznačně objasněn. Cílem této práce je tedy přispět k objasnění některých aspektů jejich působení, a to konkrétně ve vztahu k transkripci RNA a změnám transkripčních regulátorů Rb a UBF, zejména jejich fosforylace a vzájemné interakce. Zvoleny byly roskovitin, flavopiridol a CAN508, inhibitory s odlišnými strukturami a také selektivitou. Získané výsledky dokumentují negativní vliv těchto látek na proliferaci leukemické buněčné linie K562.

Summary

Cyclin-dependent kinases (CDKs) play key roles in many cellular processes such as cell cycle regulation, transcription, differentiation and induction of cell death. Due to their frequent deregulation in many serious human diseases, they are currently suggested as potential targets of modern chemotherapeutics, including anticancer drugs. Several CDK inhibitors currently undergo evaluation in clinical trials, but still mechanisms of their anticancer cytotoxicity are not fully elucidated. This thesis explores some aspects of their antiproliferative activity, with the focus on RNA transcription and changes of transcriptional regulatory proteins Rb and UBF. Flavopiridol, roscovitine and CAN508 have been selected as model inhibitors because of differences in both their anti-kinase selectivities and their structures. Obtained results document negative effects of these inhibitors on proliferation of leukemic cell line K562.

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala především svému školiteli Doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu pomoci, které mi během zpracování diplomové práce poskytl. Dále bych ráda poděkovala za odborné rady Mgr. Radku Jordovi, a také Janě Hudcové, která mi pomohla seznámit se s laboratorními metodami. V neposlední řadě patří můj dík celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, kde jsem diplomovou práci zpracovala, za vstřícnost a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah:

1	Cíle diplomové práce.....	7
2	Úvod	8
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	Cyklin-dependentní kinázy a jejich funkce	10
3.1.1	Regulace buněčného cyklu	11
3.1.2	Koordinace buněčného cyklu s transkripcí.....	14
3.2	Inhibitory proteinkináz	17
3.2.1	Inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	18
3.2.2	Antiproliferativní působení inhibitorů CDK	20
3.2.3	Proapoptotické působení inhibitorů CDK	21
4	Materiál a metodika	27
4.1.1	Biologický materiál	27
4.1.2	Inhibitory CDK.....	27
4.1.3	Použité protilátky.....	28
4.1.4	Chemikálie.....	28
4.1.5	Použité roztoky	29
4.1.6	Přístrojové vybavení	29
4.2.1	Průtoková cytometrie.....	30
4.2.2	Radioaktivní značení DNA a RNA	30
4.2.3	Imunoprecipitace	31
4.2.4	SDS-PAGE a Western blotting.....	32
5	Výsledky.....	33
5.1	Analýza buněčného cyklu a syntézy DNA.....	33
5.2	Analýza syntézy RNA	33
5.3	Fosforylace proteinu Rb	35
5.4	Fosforylace proteinu UBF	37
5.5	Změny tvorby komplexu Rb - UBF.....	37
6	Diskuse	39
7	Závěr.....	43
8	Literatura	44
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	52

1 Cíle diplomové práce

Literární rešerše týkající se mechanismu působení inhibitorů cyklin-dependentních kináz se zaměřením na interferenci s transkripcí.

Ověření antiproliferativního působení vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz s různou selektivitou.

Studium vlivu vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz na transkripci RNA a změny transkripčních regulátorů Rb a UBF, zejména jejich fosforylace a vzájemné interakce.

2 Úvod

Současná medicínální chemie je zaměřena jak na zlepšování struktury a biologických vlastností cytostatik již známých, tak na vývoj léčiv s novým mechanismem účinku. Mezi léčiva druhé skupiny patří také inhibitory různých proteinkináz, které mají potenciál především v protinádorové léčbě, ale uplatnění mohou nalézt také u řady dalších nemocí, kde dochází k patologické změně ve funkci těchto enzymů. Jednu z významných skupin možných budoucích cílených léčiv představují syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz. Cyklin-dependentní kinázy zaujímají totiž zásadní role v řadě buněčných funkcí, jako je regulace buněčného cyklu a transkripce, diferenciacie buněk či navození buněčné smrti. Zásadní je funkce cyklin-dependentních kináz v regulaci buněčného cyklu, protože právě ta bývá v nádorových buňkách často výrazně změněna. Genetické či epigenetické změny mohou mít za následek up-regulaci CDK a cyklinů nebo naopak ztrátu funkce jejich endogenních inhibitorů, a tyto změny mohou vyústit v deregulaci buněčného dělení a vznik rakoviny.

Z tohoto důvodu představují cyklin-dependentní kinázy atraktivní cíle pro vývoj nových protinádorových léčiv. Převážná většina studovaných inhibitorů vykazuje antiproliferační aktivitu na základě inhibice cyklin-dependentních kináz regulujících cyklus, protože právě správná funkce CDK je pro postup buněčným cyklem esenciální. Tyto inhibitory indukují blok cyklu v kontrolních bodech buněčného cyklu, a to na přechodech G1/S a G2/M. Inhibitory cyklin-dependentních kináz navíc způsobují zastavení replikace, čímž se buněčný cyklus zastavuje i ve fázi S (Schutte *et al.*, 1997; Kryštof *et al.*, 2006; Paprskářová *et al.*, 2009). Méně selektivní inhibitory pak mohou působit také na cyklin-dependentní kinázy regulující transkripci, což se negativně projeví v syntéze RNA a následně také v translaci a tvorbě proteinů, přičemž proteosyntéza je základní determinantou umožňující buněčný růst. Studované látky tedy zasahují nejen cyklin-dependentní kinázy regulující cyklus ale i transkripci, případně i zcela jiné enzymy, a proto také jejich protinádorové působení vykazuje komplexní charakter. Převážná většina vývoje nových inhibitorů CDK se v současné době ubírá směrem dosažení maximální selektivity inhibitorů, ta je však obvykle nízká. Část výzkumu tedy využívá kombinovaného účinku inhibitorů, jelikož současná inhibice cyklin-dependentních kináz regulujících cyklus i

transkripci může vést k zesílení jejich protinádorového účinku. Na druhou stranu paralelní a cílená inhibice více cílů může působit řadu problémů v designu jejich společného účinku (Cai *et al.*, 2006; Kryštof *et Uldrijan*, 2010)

Mechanismus cytotoxického působení pan-specifických inhibitorů cyklin dependentních kináz, jako jsou roskovitin či flavopiridol, je sice od počátku námětem řady studií, ale stále není zcela jednoznačně objasněn. Ukazuje se, že na působení těchto inhibitorů se pravděpodobně podílí několik vzájemně nezávislých mechanismů, a to zejména díky jejich selektivitě. Roskovitin totiž přímo inhibuje aktivitu mitotické CDK1, S-fázové CDK2, aktivační CDK7 a transkripční CDK9. Flavopiridol pak vykazuje nejsilnější inhibici vůči CDK9. I přesto, že cytotoxické působení roskovitinu a flavopiridolu nebylo zatím zcela jednoznačně vysvětleno, vstoupily tyto inhibitory nedávno do druhé fáze klinických testů. Zvláště proto je důležité i nadále pracovat na dalším upřesnění mechanismů jejich účinku (McClue *et al.*, 2002; Shapiro, 2006; Węsierska-Gądek *et Kryštof*, 2009; Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

3 Současný stav řešené problematiky

V této kapitole je nastíněna problematika cyklin-dependentních kináz a jejich inhibitorů, mechanismy působení některých CDK inhibitorů, jejich antiproliferativní a proapoptotické účinky se zaměřením na interferenci s transkripcí.

3.1 Cyklin-dependentní kinázy a jejich funkce

Reverzibilní fosforylace je hlavní post-translační modifikací, která kontroluje a řídí veškeré buněčné procesy. Fosforylace hydroxyly serinových, threoninových a tyrozinových reziduí proteinů je katalyzována proteinkinázami. Lidský genom kóduje 518 proteinkináz (Manning *et al.*, 2002), hlavní zájem je však zaměřen především na ty z nich, které se nějakým způsobem podílejí na vzniku a projevech lidských nemocí. Typickým příkladem jsou cyklin-dependentní kinázy díky jejich nepostradatelné funkci v regulaci buněčného cyklu, jež se výrazně mění v nádorových buňkách (Meijer *et al.*, 2006; Yap *et al.*, 2007; Grant, 2009), proto se CDK staly cílem vývoje nových léčiv – inhibitorů CDK. Historie výzkumu nejen samotných proteinkináz, ale také jejich inhibitorů, je nesmírně bohatá a přináší řadu význačných objevů, jak popisuje Stephan K. Grant v přehledném review z roku 2009. Cestu k vývoji inhibitorů CDK odstartovala již studie E. H. Fishera a E. G. Krebse pojednávající o fosforylaci proteinů a jejím vlivu v regulaci biologických procesů (Fischer *et al.*, 1966), za niž jim byla udělena roku 1992 Nobelova cena za medicínu. V roce 1989 J. Michael Bishop a Harold Varmus popsali, že některé proteinkinázy působí jako onkogeny. Paul Nurse a Timothy Hunt byli dalšími vědci, kteří se zapsali do historie popisem role cyklinů a CDK regulujících buněčný cyklus. A Leland Hartwell rozšířil danou problematiku popisem kontrolního bodu, který vede k zastavení buněčného cyklu na základě kinázové signalizační dráhy či poškození DNA (Grant, 2009). Tato zásadní role CDK v regulaci řady buněčných funkcí a také v tumorogenezi vedla k výzkumu inhibitorů cyklin dependentních kináz, především pak inhibitorů CDK o nízké molekulové hmotnosti jakožto potenciálních terapeutik.

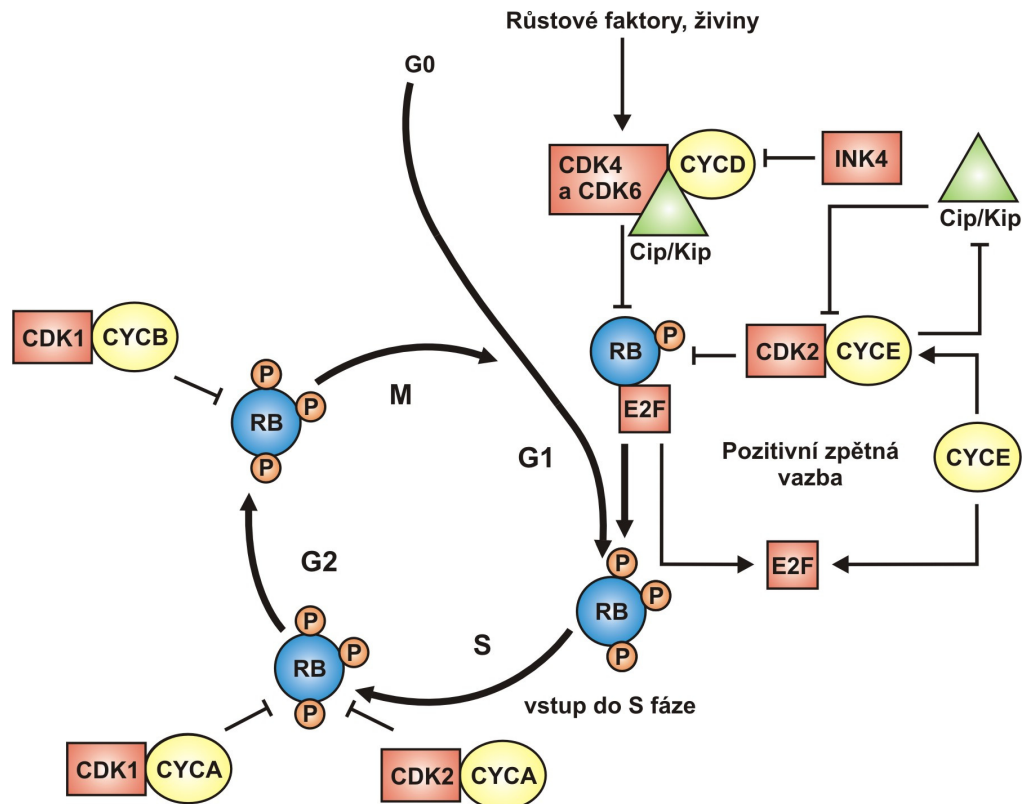
Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou Ser/Thr proteinkinázy, které jsou mezi sebou vysoce konzervované a vykazují silnou sekvenční homologii. Cyklin-dependentní kinázy

se spojují s cykliny v heterodimerické komplexy. Kinázová podjednotka komplexu zastává funkci katalytickou, zatímco cyklin má regulační funkci a díky jeho vazbě se mění konformace CDK na aktivní formu (Pavletich, 1999; Knockaert *et al.*, 2002). Přestože jsou cyklin-dependentní kinázy označovány především za regulátory buněčného cyklu, hrají významnou roli také v regulaci transkripce, a taktéž mají svůj podíl na řízení diferenciaci buněk, signalizaci bolesti, fyziologii nervových buněk či navození buněčné smrti (Meijer *et al.*, 2006; Grant, 2009).

Aktivita samotných CDK je regulována v několika krocích. Pro aktivaci CDK je nutná fosforylace CDK-aktivační kinázou (CAK) neboli CDK7/CYCH/MAT1 (Patel *et al.*, 2010) na threoninu uvnitř T-smyčky. Roli hraje také negativní fosforylace Wee1 kinázou, přičemž tento inhibiční fosfát je později odstraněn fosfatázou cdc25. Také asociace kináz nejen s příslušnými cykliny ale i endogenními Cip/Kip nebo INK4 inhibitory má vliv na aktivitu CDK (Pavletich, 1999; Sherr *et al.*, 1999; Kryštof *et al.*, 2006; Shapiro, 2006; Yap *et al.*, 2007; Węsierska-Gądek *et al.*, 2009). V neposlední řadě hraje roli v regulaci CDK i jejich intracelulární lokalizace (Meijer *et al.*, 2006).

3.1.1 Regulace buněčného cyklu

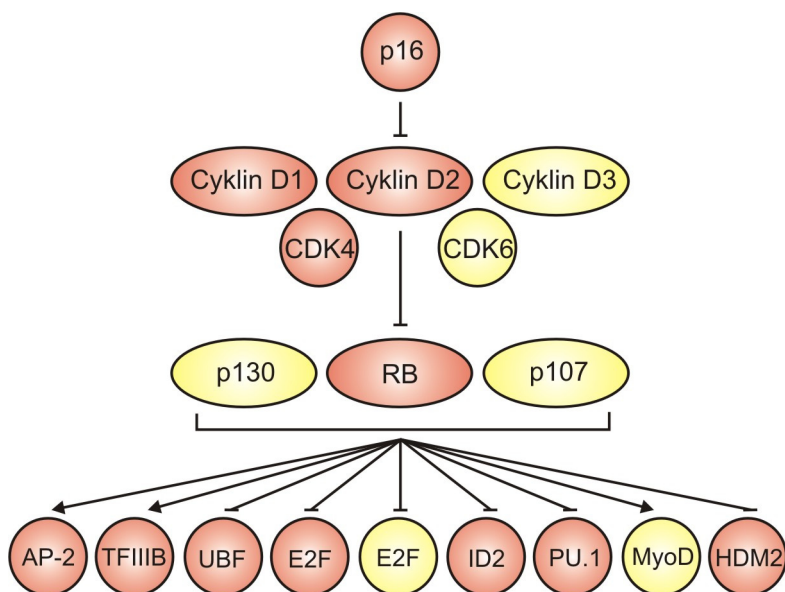
Postup buněčným cyklem je regulován řadou pozitivních a negativních faktorů, z nichž významnou roli hrají právě komplexy cyklinů s CDK. Mezi komplexy podílející se na regulaci buněčného cyklu patří jednak CDK4/CYC D, CDK6/CYC D a CDK2 v komplexu s cyklinem E, které regulují nejen průběh G1 fáze ale i přechod z G1 do S fáze. G1-fázové komplexy cyklin-CDK postupně fosforylují protein Rb, čímž zruší interakci mezi Rb a E2F. Transkripční faktory E2F následně umožňují přepis genů nutných pro přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Regulace buněčného cyklu prostřednictvím komplexů CDK/CYC ve vztahu k proteinu Rb je znázorněna na obrázku 1. Další skupinu tvoří komplex CDK2 s cyklinem A, který podporuje replikaci DNA a postup S fází, společně s komplexy cyklinů A a B s CDK1, které zajišťují následný přechod z G2 fáze do mitózy. Komplex CDK1/CYC B reguluje proces buněčného dělení (Knockaert *et al.*, 2002; Shapiro, 2006; Węsierska-Gądek *et al.*, 2009).



Obr. 1: Regule buněčného cyklu prostřednictvím CDK a proteinu Rb. Upraveno podle Lapenna et Giordano, 2009.

Cílená fosforylace zprostředkovaná CDK má zásadní vliv na buněčnou proliferaci. Jedním z významných cílů CDK fosforylace je retinoblastomový protein (Rb), který je pro své antiproliferační účinky označován jako nádorový supresor, tedy protein bránící vzniku nádorů. V případě absence mitogenních signálů totiž Rb blokuje zahájení buněčného cyklu. Rb interakcí s řadou proteinů a transkripčních faktorů (obrázek 2) reguluje expresi G1/S genů všemi třemi jadernými RNA polymerázami (White, 2005; Shapiro, 2006). Protein Rb vytváří komplex s E2F transkripčními faktory, čímž znemožňuje aktivaci genů nutných pro další postup buněčným cyklem (jako je např. cyklin E). Protein Rb přispívá k mitogenní senzitivě také cestou regulace syntézy rRNA a tRNA tím, že interaguje s transkripčními faktory UBF (upstream binding factor) a TFIIB (RNA polymerase III transcription initiation factor B), čímž reguluje aktivitu polymeráz I a III. Pokud je transkripční faktor UBF zachycen v komplexu s Rb, nemůže být připojen do pre-iniciačního komplexu RNA polymerázy I, čímž dochází k inhibici transkripce genů regulovaných UBF (Voit *et al.*, 1997; Hannan *et al.*, 2000; Grummt, 2003; White, 2005).

Podobně je skrze navázání UBF schopen regulovat transkripci rDNA také protein p130 (Hannan et al., 2000). Protein Rb se podílí také na regulaci transkripce genů polymerázou III interakcí s TFIIB. Pro rozpoznání promotoru a iniciaci transkripce genů polymerázou III je nutná asociace TFIIB a TFIIC (general transcription factor IIIC) do komplexu. Tento komplex však nemůže vzniknout, je-li TFIIB v asociaci s Rb (Chu *et al.*, 1997; Schramm *et Hernandez*, 2002; White, 2005).



Obr. 2: Interakce Rb s dalšími transkripčními regulátory. Tyto interakce mají většinou inhibiční povahu. Proteiny, které bývají v nádorových buňkách produkovány silněji nebo přímo mutovány, jsou znázorněny červenou barvou. Upraveno podle White, 2005.

Protein Rb hraje centrální roli v přechodu G1/S. V hypofosforylované formě blokuje Rb buněčný cyklus tím, že drží uvedené transkripční faktory nutné pro přepis G1/S fázových genů v komplexu. Jako odpověď na mitotickou stimulaci je v průběhu G1 fáze protein Rb postupně fosforylován činností komplexů CDK4/CYC D, CDK6/CYC D a CDK2/CYC E, čímž je rušena jeho schopnost vytvářet inhibiční komplexy s transkripčními faktory (Harbour *et Dean*, 2000; White, 2005; Shapiro, 2006; Poznic, 2009; Kryštof *et Uldrijan*, 2010). Pro aktivaci a správnou funkci komplexů CDK4/6/CYC D je nutná přítomnost Cip/Kip proteinů, ty však současně inhibují CDK2. G1 progresi reguluje také protein p16^{INK4A} z INK4 rodiny, který působí jako specifický inhibitor CDK4 a 6 během senescence buněk, kdy po jeho navázání na CDK4/6 dochází k uvolnění cyklinu D

z komplexu. Následná destabilizace cyklinu D vede k redistribuci Cip/Kip na CDK2, což má za následek zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Inaktivace p16^{INK4A} vede k úniku buněk ze senescence (Sherr *et Roberts*, 1999; Shapiro, 2006).

Protein Rb působí jako tumor supresor, je-li však jeho funkce nějakým způsobem změněna, může vést až ke vzniku rakoviny. Změny mohou být vyvolány jednak přímo mutací genu retinoblastomu, ale též inaktivací na proteinové úrovni například vazbou virových onkoproteinů jako je onkoprotein E7 lidského papillomaviru. V jiných typech rakovin může být změna funkčnosti Rb způsobena deregulací cyklin-dependetních kináz (Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

3.1.2 Koordinace buněčného cyklu s transkripcí

Základní determinantou umožňující buněčný růst je proteosyntéza. U eukaryotních organismů zajišťují transkripci jaderných genů tři RNA polymerázy, z nichž každá má esenciální funkci. Polymeráza I je složena ze 14 dílčích podjednotek, polymeráza II ze 12 a polymeráza III ze 17 podjednotek. Polymeráza I se podílí výlučně na transkripci rDNA genů, které se u člověka vyskytují přibližně ve 400 kopiích. Polymeráza II přepisuje geny kódující proteiny, ale současně i řadu genů kódujících snRNA (malé jaderné RNA). Polymeráza III transkribuje široké spektrum krátkých netranslatovaných molekul RNA jako jsou 5S rRNA, tRNA, 7SL RNA, 7SK RNA regulující transkripci, polymeráza II přepisuje MRP, U6 a H1 RNA molekuly, které jsou nutné pro post-transkripční úpravu rRNA, mRNA a tRNA. Polymeráza III přepisuje také SINES (short interspersed nuclear elements). Navzdory tomu, že polymeráza I přepisuje nejmenší počet templátů, její podíl na celkové jaderné transkripci je více než 70 %, zatímco polymerázy II a polymerázy III pouze necelých 20 % a 10 %. Téměř všechna rRNA je inkorporována do ribosomů, množství proteosyntézy tedy koreluje s obsahem rRNA a tRNA (White, 2005).

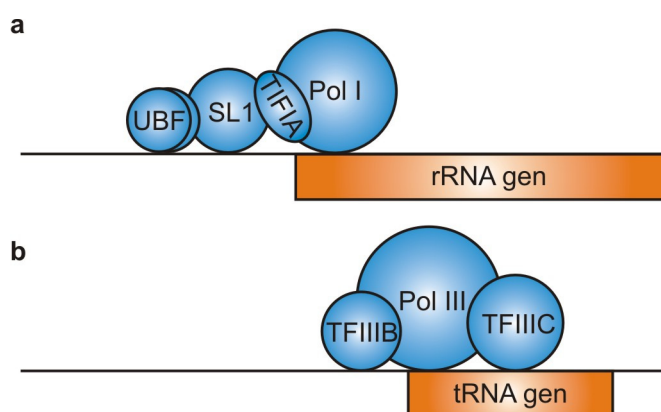
Regulace transkripce je komplexní proces, na němž se podílí také cyklin-dependentní kinázy. CDK regulující transkripci jsou CDK7 v komplexu s cyklinem H, CDK9/CYC T a CDK8/CYC C. Tyto komplexy fosforylují karboxy-terminální doménu (CTD) RNA polymerázy II, čímž umožňují transkripci DNA. Komplex CDK7/CYC H fosforyluje CTD

polymerázy II zejména na Ser5, čím umožní iniciaci transkripce. CDK9/CYC T se podílí na utváření transkripčního elongačního faktoru b (P-TEFb), který následně fosforyluje CTD na Ser2, což vede k prodlužování vznikajících transkriptů (Shapiro, 2006; Yap *et al.*, 2007; Węsierska-Gądek *et Kryštof*, 2009). Komplex CDK7/CYC H pak vytváří významnou spojnicí mezi regulací transkripce a buněčného cyklu, protože působí nejen jako součást transkripčního faktoru TFIID fosforylujícího RNA polymerázu II, ale také jako CAK (Fisher, 2005; Glover-Cutter *et al.*, 2009).

Neproliferující buňky (tedy v G0 fázi buněčného cyklu) se vyznačují útlumem transkripce prostřednictvím proteinů Rb, p53 a ARF. Inaktivace těchto nádorových supresorů v transformovaných buňkách vede k deregulaci RNA polymerázy I a III. Tato změna v regulaci může být dále stimulována onkoproteiny jako je například Myc (Koumenis *et Giaccia*, 1997). Syntéza rRNA je totiž limitujícím faktorem pro proliferaci transformovaných buněk (White, 2005), a v tumorech může být stimulována také overexpresí nucleophosminu. Nucleophosmin je multifunkční jaderný protein, který je mimo jiné zapojen také v biogenezi ribozomů. Endoribonukleázová aktivita nucleophosminu je regulována ARF (alternative reading frame product). ARF interaguje s nucleophosminem, čímž způsobuje jeho ubiquitylaci a proteasomální degradaci. Tato interakce může fungovat jako jeden z koordinátorů buněčného růstu a proliferace. Při onkogeních signálech aktivuje kontrolní bod buněčného cyklu dráhu ARF-MDM2-p53, a podobně může aktivovat kontrolní bod biogeneze dráhu ARF-nucleophosminu-ribozomy. Virem indukovaná overexprese nucleophosminu může překročit hladinu ARF indukující zastavení buněčného cyklu, což naznačuje onkogenní aktivitu nucleophosminu jeho schopností inaktivovat ARF (Itahana *et al.*, 2003).

Syntéza rRNA a biogeneze ribozomů je určujícím faktorem pro tvorbu proteinů, a tím i pro růst a dělení buněk. Syntéza lidské rRNA vyžaduje dva pomocné faktory UBF a SL1 (promoter-selectivity factor) viz obr. 3. SL1 je analog TFIID a TFIIB, které jsou zapojeny v transkripci genů RNA polymerázou II a III. Komplex SL1 se skládá z TATA-binding proteinu (TBP) a tří asociovaných faktorů (TAFs) (Comai *et al.*, 1994; White, 2005). Transkripční komplex SL1 je nutný pro přímou iniciaci transkripce rRNA, sám však pro svou aktivaci potřebuje interakci s UBF, jehož prostřednictvím je na promotor navázán. Pouze fosforylovaná forma UBF umožňuje asociaci se SL1 a jeho vazbu

na promotor, defosforylace UBF tuto interakci ruší (Tuan *et al.*, 1999). UBF se tedy jeví jako hlavní regulátor transkripce ribozomální DNA. UBF je abundantní jaderný protein z rodiny proteinů s HMG doménou. Lidský protein UBF se vyskytuje ve dvou splicing variantách UBF1 (97 kDa) a UBF2 (94 kDa), které se od sebe liší delecí 37 aminokyselin uvnitř druhého HMG boxu (O'Mahony *et al.*, 1991; Voit *et al.*, 1995). UBF je cílem řady signálních drah během diferenciacce, proliferace a buněčného růstu. UBF obsahuje na C konci mnoho fosforylačních míst, která mají zásadní vliv na jeho schopnost aktivovat transkripci (Voit *et al.*, 1995; O'Mahony *et al.*, 1992; Voit *et al.*, 2001). Modulace aktivity UBF v závislosti na fázích buněčného cyklu hraje klíčovou roli v regulaci syntézy rRNA.



Obr. 3: Transkripční komplexy polymerázy I a III. Převzato a upraveno dle White, 2005.

Oscilace syntézy rRNA se děje v závislosti na různých stavech fosforylace UBF. Nefosforylovaný UBF je inaktivní, a aby stimuloval transkripci, musí být mnohonásobně fosforylován. Jaderný faktor UBF je fosforylován jednak kasein kinázou II, která přispívá, ale sama o sobě není dostačující, k aktivaci transkripce. Kromě toho fosforylují UBF i další proteinkinázy na různých místech v závislosti na extra- i intracelulárních signálech (Voit *et al.*, 1995). Pro zahájení transkripce rDNA genů je nutná fosforylace UBF na serinu 484 pomocí G1-specifických komplexů cyklinů s CDK, konkrétně CDK4/CYC D1 a CDK2/CYC E. Aktivace transkripce rDNA po sérové stimulaci přímo koreluje s fosforylací Ser484, tento fakt byl potvrzen mimo jiné cílenou mutací Ser484, která snižuje rDNA transkripci *in vivo* a *in vitro*. V sérově deprivovaných buňkách je UBF

hypofosforylován a transkripčně inaktivní (Voit *et al.*, 1999). O'Mahony *et al.* (1992) popsali, že fosforylace UBF je důležitá také pro jeho subcelulární distribuci mezi jadérkem a cytoplazmou. Interakce UBF s CDK4/CYC D1 a CDK2/CYC E vytváří významnou spojnicí mezi progresí G1 a syntézou rRNA. Po proběhnutí G1 je UBF fosforylován na serinu 388 pomocí CDK2/CYC E a CDK2/CYC A. Fosforylace UBF na serinu 388 je nutná pro vytvoření iniciačního transkripčního komplexu a zajišťuje tak interakci s RNA polymerázou I (Voit *et Grummt*, 2001). Aktivita UBF může být také změněna interakcí s dalšími buněčnými proteiny (Voit *et al.*, 1997). Během mitotického dělení dochází k inhibici transkripce rDNA genů prostřednictvím TTF-1 (transkripční terminační faktor) (Sirri *et al.*, 1999). Heix *et al.* (1998) ukázali, že TTF-1 je během mitózy specificky fosforylován CDC2/CYC B a takto fosforylovaný TTF-1 ruší vazbu mezi SL1 a UBF, čímž inhibuje transkripci rDNA během mitózy.

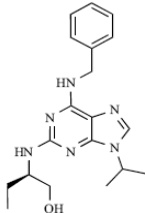
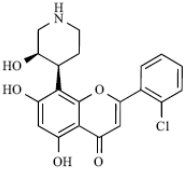
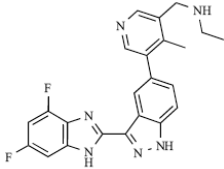
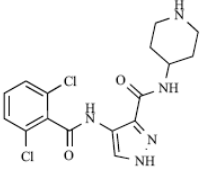
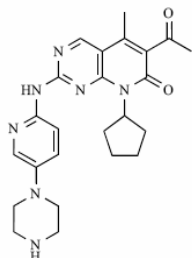
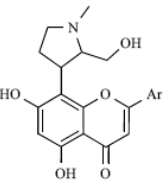
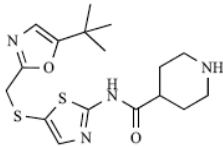
3.2 Inhibitory proteinkináz

Inhibitory proteinkináz představují významnou a stále se rozvíjející skupinu cílených léčiv. Během posledních deseti let vstoupilo přes sto různých nízkomolekulárních proteinkinázových inhibitorů do klinické fáze testů (Grant, 2009). Tyto inhibitory mají potenciál nejen v protinádorové léčbě, ale také v léčbě řady dalších nemocí, kde proteinkinázy vykazují patologickou funkci. Terapeutické inhibitory proteinkináz jsou v klinické fázi testování také proti nemocem jako je revmatická artritida, kardiovaskulární choroby a diabetické komplikace (Grant, 2009). Jedním směrem, kterým se vývoj inhibitorů ubírá, jsou terapeutické monoklonální protilátky cílené především na růstové faktory a receptory tyrosinkináz. Z těchto terapeutických protilátek v klinické fázi vývoje lze jmenovat alespoň Avastin[®] cílený proti VEGF (vascular endothelial growth factor) (Midgley *et Kerr*, 2005), Herceptin[®] užívaný k léčbě rakoviny prsu (Valabrega, *et al.*, 2007) a Pertuzumab[®] zaměřený na léčbu rakoviny plic (Johnson *et Jänne*, 2006). Další slibné terapeutické strategie jsou siRNA či antisense technologie, kdy interferencí dochází ke snížení exprese cílených genů. Na této bázi fungují například léky Sirna-027 či Vitravene[®] (Grant, 2009).

3.2.1 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Již dříve začaly být inhibitory CDK považovány za novou možnost léčby pacientů se špatnou prognózou či pokročilým stádiem rakoviny, protože CDK inhibitory jsou pacienti všeobecně lépe přijímány než klasická chemoterapie s širokým spektrem vedlejších účinků (Grant, 2009). Mechanismus účinku CDK inhibitorů je založen na bránění schopnosti proteinkináz fosforylovat příslušné substráty, ať v podobě dalších proteinů, nebo též i v autofosforylaci. Inhibitory CDK kompetují s ATP o vazbu do aktivního místa kinázy. Tato kompetice musí být vysoce efektivní, protože množství molekul ATP v buňkách se pohybuje až okolo 2 milionů a proteiny k němu vykazují vysokou afinitu. Navíc CDK mezi sebou vykazují vysokou sekvenční homologii aminokyselinových reziduí v místě vázajícím ATP, což zpočátku zrovna nepodporovalo myšlenku vývoje selektivních ATP-kompetitivních inhibitorů (Grant, 2009). Dalším hlediskem je dynamická terciární struktura proteinů. Také proteinkinázy zaujímají řadu rozdílných konformačních stavů, často závislých na fosforylaci specifických reziduí, to umožňuje CDK inhibitorům rozvinout svou potencionální selektivitu. Jednotlivé kinázy se mezi sebou liší ve způsobu regulace fosforylací. Po fosforylaci se aktivační smyčka CDK změní na produktivní konformaci, která umožní navázání ATP a proteinového substrátu (Huse *et* Kuriyan, 2002; Liao, 2007). Nízkomolekulární inhibitory CDK regulující aktivitu CDK jsou významnou a stále se rozvíjející skupinou cílených léčiv. Během posledních 20 let se dostalo minimálně 24 inhibitorů do klinické fáze testů (Kryštof *et* Uldrijan, 2010) viz tabulka č. I. První generace inhibitorů CDK představovala především přírodní produkty jako jsou flavonoid flavopiridol, alkaloid staurosporin a jeho analogy, olomoucín, UCN-01, butyrolakton, paullony a indirubiny (Yap *et al.*, 2007; Grant, 2009). Nevýhodou těchto látek však byla jejich nízká selektivita. Další generace inhibitorů navržené často díky dostupným strukturám některých CDK již vykazují vyšší selektivitu a také účinnost v modelech *in vitro*. Z nich lze jmenovat alespoň vysoce selektivní EXEL-8647 a BS-181 (Kryštof *et* Uldrijan, 2010), dále pak SNS-032 (Kim *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2004), SU9516 (Lane *et al.*, 2001), AZ703 (Anderson *et al.*, 2003; Byth *et al.*, 2004) a PD 0332991 (Shapiro, 2006). Některé z nich a řada dalších pak byly vybrány pro klinické testování účinnosti (viz tabulka I)

Tabulka I Vybrané inhibitory CDK v klinické fázi testů

Inhibitor	Strukturní vzorec	Cíle	Klinické zkoušky
Roskovitin		CDK2, CDK5, CDK7, CDK9	fáze I/II nemalobuněčný karcinom plic
Flavopiridol		CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDK9	fáze I/II hematologické malignity
AG-024322		CDK1, CDK2, CDK4	přerušeny rozvinuté solidní nádory Non-Hodgkinův lymfom
AT7519		CDK1, CDK4, CDK5, CDK6, CDK9, GSK3	fáze I Non-Hodgkinův lymfom
PD-0332991		CDK4, CDK6	fáze I lymfom z pláštěvých buněk rozvinuté solidní nádory Fáze II mnohočetný myelom Non-Hodgkinův lymfom
P-276-00		CDK1, CDK4, CDK9	fáze I/II mnohočetný myelom rozvinuté nádory hlavy a krku rakovina slinivky břišní cyklin D-pozitivní melanomy
SNS-032		CDK2, CDK7, CDK9	fáze I rozvinuté solidní nádory rozvinuté B-Lymfoidní malignity

Reference pro tabulku Shapiro (2006), Lapenna et Giordano (2009) a Kryštof et Uldrijan (2010).

3.2.2 Antiproliferativní působení inhibitorů CDK

Většinu změn spojených se zvýšenou aktivitou CDK a vznikem nádorů má za následek hyperaktivace CDK vlivem jejich regulátorů, ať je to overexprese cyklinů nebo naopak inaktivace endogenních inhibitorů CDK p16^{INK4A} a p27^{Kip1}. Jiné genetické změny, jako amplifikace, overexprese či mutace samotných CDK se vyskytují pouze sporadicky. V některých typech rakovin jsou CDK deregulovány také fosfatázou cdc25. Všechny tyto změny vedou ke konstitutivní aktivitě CDK, které následně hyperfosforylují své substráty a umožňují tak buňkám postupovat buněčným cyklem bez ohledu na vnější nebo intracelulární podmínky, jako je poškození jaderné DNA (Yap *et al.*, 2007; Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

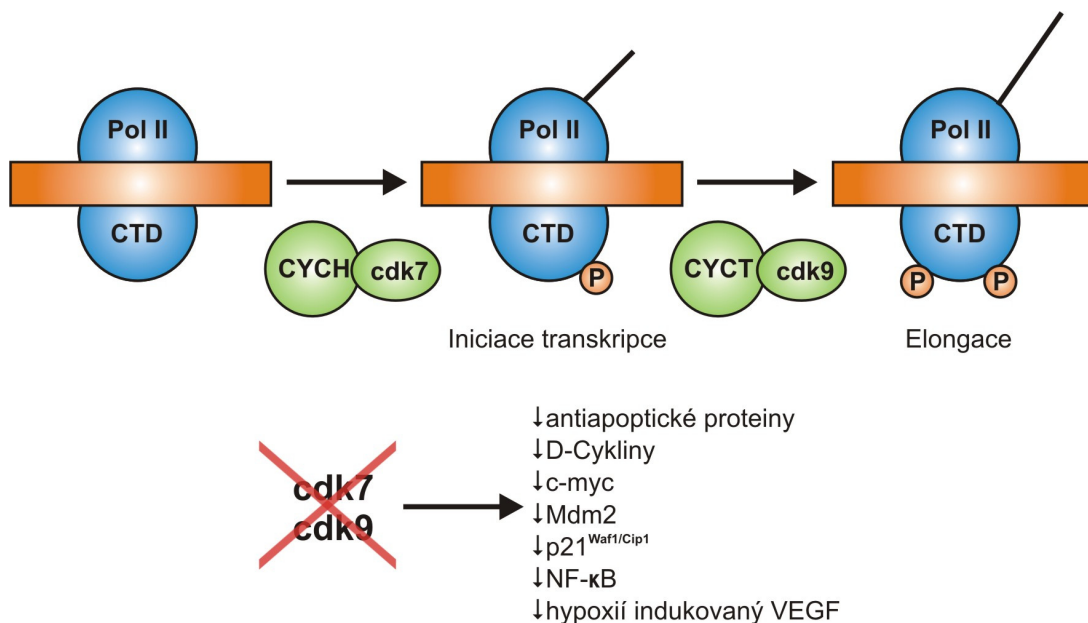
Většina studovaných inhibitorů CDK vykazuje antiproliferační aktivitu na základě inhibice CDK regulujících cyklus, tedy CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6. Tyto inhibitory indukují blok cyklu v G1/S a G2/M. Méně selektivní inhibitory CDK působí také na CDK7 a především na CDK9, což má negativní vliv zejména na syntézu mRNA. Ačkoli se většina vývoje nových CDK inhibitorů ubírá především směrem jejich maximální selektivity část výzkumu jde cestou využívající kombinovaného účinku CDK inhibitorů, protože současná inhibice různých kináz může zvýšit protinádorový účinek. Současná inaktivace CDK regulujících cyklus a CDK regulujících transkripci může vést nejen k zastavení buněčného cyklu, ale může vyvolat i apoptózu (Cai *et al.*, 2006). Podobný účinek vykazují také pan-specifické inhibitory CDK, jako jsou flavopiridol, roskovotin a aminothiazolový derivát SNS-032 (Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

Dráha CDK4/6/CYCD-INK4-Rb je v lidských nádorových buňkách často narušena. To může být způsobeno jak ztrátou funkce proteinu Rb, tak zvýšenou aktivitou CDK, a to jak přímo či v závislosti na zvýšené expresi cyklinů. Vývoj inhibitorů CDK4/6 se snaží docílit selektivity k takto transformovaným buňkám. V nádorových buňkách, u nichž je zachována funkčnost Rb, mohou inhibitory CDK4/6 snížit fosforylaci Rb a tak indukovat zastavení v G1. Naopak v tumorech, kde Rb ztratil svou funkci a kde je vysoká hladina p16^{INK4A} je použití těchto inhibitorů neefektivní (Shapiro, 2006). Jako selektivní vůči CDK4/6 se jeví látka PD ze třídy derivátů pyridopyrimidinů, která je v první fázi klinických testů (Shapiro, 2006). PD 0332991 je vysoce specifický inhibitor CDK4 (IC₅₀,

0.011 $\mu\text{mol/l}$) a CDK6 (IC_{50} , 0.016 $\mu\text{mol/l}$), přičemž nevykazuje žádnou inhibiční aktivitu vůči dalším kinázám. Vysoce účinný antiproliferativní účinek tohoto inhibitoru byl prokázán v $\text{Rb}^{+/+}$ nádorových liniích *in vitro*, kde navozuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi s průvodní defosforylací Rb proteinu na Ser780 a Ser795. Orální aplikace PD 0332991 vykazuje protidárodovou aktivitu v myším modelu lidského karcinomu tlustého střeva (buněčná linie COLO-205), provázenou snížením fosforylací Rb a také hladiny proteinu Ki-67 v nádorové tkáni a down-regulací genů pod transkripční kontrolou E2F. Tyto výsledky signalizují, že inhibice CDK4/6 je sama o sobě dostačující, aby způsobila regresi nádoru (Fry *et al.*, 2004). PD 0332991 je schopen navodit také zastavení buněčného cyklu v G1 v primárních buňkách myelomu kostní dřeně *ex vivo* a zastavuje růst nádoru v lidských myeloidních štěpech. PD 0332991 inhibuje CDK4/6 úměrně fázi buněčného cyklu nezávisle na buněčné transformaci a účinkuje v souladu s endogenním inhibitorem $\text{p18}^{\text{INK4C}}$. Inhibice CDK4/6 vlivem PD 0332991 není doprovázena indukcí apoptózy. Tyto výsledky naznačují, že PD 0332991 by se mohl stát prvním specifickým inhibitorem zacíleným proti CDK4/6 v léčbě mnohočetného myelomu a dalších leukémií B-lymfocytů (Baughn *et al.*, 2006). Finn *et al.* (2009) demonstrovali také účinek PD 0332991 na inhibici CDK4/6 *in vitro* na buněčných liniích odvozených od lidského karcinomu prsu.

3.2.3 Proapoptické působení inhibitorů CDK

Komplexy CDK7/CYC H a CDK9/CYC T se podílí na regulaci transkripce genů fosforylací CTD polymerázy II (viz kapitola 3.1.2). Jejich inhibice také skýtá jistý protinádorový potenciál, protože regulace transkripce hraje roli v syntéze proteinů esenciálních pro proliferaci a přežití. Transkripty, které jsou nejvíce citlivé na inhibici CDK9 a 7 jsou ty s krátkou životností (obr. 4). Rychlá degradace těchto mRNA způsobuje snížení jejich hladin již během několika hodin působení CDK inhibitorů a činí tak buňky náchylné k apoptóze. Některé genové třídy jsou typické svou nestabilní mRNA, mezi ně patří přímé transkripční faktory a geny cytokinů, dále transkripty pro regulátory apoptózy jako jsou antiapoptické proteiny Bcl-2, Mcl-1, a XIAP a v neposlední řadě regulátory buněčného cyklu cyklin D1, c-myc a mitotické regulační kinázy, stejně jako NF- κ B geny a proteiny p53 dráhy (Lam *et al.*, 2001; Shapiro, 2006; Kryštof *et al.*, 2010).



Obr. 4: Transkripty citlivé na inhibici CDK 9 a 7 (upraveno dle Shapiro, 2006).

Dva nejvíce rozšířené pan-specifické inhibitory CDK flavopiridol a roskovitin inhibují P-TEFb, a tím i transkripci genů polymerázou II (Chao *et* Price, 2001; Ljungman *et* Paulsen, 2001) a jejich antiproliferativní účinky na některé typy rakovin jsou způsobeny nejspíš jejich schopností snižovat expresi antiapoptotických proteinů jako jsou Bcl-2, Mcl-1, cIAP-1, survivin a XIAP. Specifickou citlivost na snížení antiapoptických proteinů v důsledku inhibice transkripce flavopiridolem nebo roskovitinem vykazují některé hematologické malignity a solidní nádory, což nabízí nové možnosti léčby například u chronické lymfoidní leukémie, Ewingova sarkomu a mnohočetného myelomu (Shapiro, 2006; Kryštof *et* Uldrijan, 2010).

Vysoce selektivní je také nový inhibitor EXEL-8647, který vykazuje více než 100 násobnou specifitu vůči CDK9 oproti CDK1, CDK2, CDK4 a CDK7. Tato inhibice CDK9 byla prokázána jak *in vitro* tak i *in vivo*. Sloučenina EXEL-8647 vykazovala také vliv na buněčný cyklus v souladu s CDK9 inhibicí, tedy inhibici proliferace a indukcii apoptotických efektů, jako jsou štěpení prokaspázy 3, prokaspázy 9 a PARP-1 *in vitro* i *in vivo*. Značnou selektivitu vykazuje také látka BS-181, která inhibuje aktivitu CDK7 s 35 násobnou účinností a CDK2 dokonce se 100 násobně vyšší selektivitou než ostatní CDK. Jde o molekulu pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu odvozenou od struktury roskovitinu, kde

postranní řetězec vykazuje selektivní vazbu na CDK7. Tato BS-181 zprostředkovaná inhibice fosforylace substrátů CDK7 má za následek zastavení buněčného cyklu a indukcii apoptózy v nádorových buněčných liniích a byly prokázány také její protinádorové účinky *in vivo* (Kryštof *et al.*, 2010).

Další mechanismus indukce apoptózy inhibitory CDK může být přímo spojen s jejich schopností blokovat aktivitu CDK2. Během G1 fáze buněčného cyklu dochází vlivem CDK-zprostředkované fosforylace proteinu Rb k uvolnění transkripčních faktorů E2F, ty interagují s DP1 a řídí transkripci genů nutných pro přechod do S fáze. Transkripce těchto genů je však aktivována pouze přechodně, pozdější postup S fází naopak vyžaduje opětovné snížení aktivity E2F vlivem fosforylací CDK (Xu *et al.*, 1994). Inhibice CDK během S fáze vede k trvalé aktivitě E2F, která má za následek zdržení S fáze a apoptózu. E2F indukovaná apoptóza může být dvojí: p53 zprostředkovaná nebo na p53 nezávislá. E2F indukovaná p53 nezávislá iniciace apoptózy je způsobena aktivací E2F transkripčních cílů jako je p73, Apaf-1 nebo kaspázy, či represí Mcl-1 nebo interakcí E2F s receptory smrti a NF- κ B dráhou (Shapiro, 2006).

Později během cyklu CDK2/CYC A fosforyluje E2F/DP1, čímž snižuje jejich schopnost vázat se na DNA a fosforylace CDK1/CYC A na Ser375 zprostředkovává formování komplexu Rb-E2F, tím dochází k inhibici aktivity E2F. Změny v aktivitě CDK1 mají za následek zvýšenou přítomnost volného E2F. CDK7/CYCH/MAT-1 fosforyluje E2F-1 na Ser408 a Thr433, což vede k jeho ubiquitylaci a proteosomální degradaci. Mutace těchto aminokyselin za alanin zvyšuje stabilitu E2F-1 (Vandel *et al.*, 1999). Středem zájmu výzkumu selektivních inhibitorů ve vztahu k E2F je také CDK2. Inhibice CDK2 snižuje fosforylací E2F-1 a indukuje selektivní S a G2 zastavení buněčného cyklu a apoptózu transformovaných buněk, ne však buněk normálních. To je dáno tím, že nádorové buňky s narušenou CDK4/6/CYCD-INK4-Rb dráhou produkují vysokou hladinu aktivního E2F, proto u nich i malé snížení aktivity CDK během S fáze vede k perzistentní aktivitě E2F, což v normálních buňkách má jen malý vliv, a toto další zvýšení hladiny E2F může vést až k překonání prahu nutného k navození apoptózy (Chen *et al.*, 1999; Shapiro, 2006).

Zatím však bohužel většina přístupů zaměřených na selektivní inhibici CDK1/2 bez průvodní inhibice CDK4/6 vedla pouze k slabému zastavení buněčného cyklu. Řešení nabízí inhibitory CDK malých molekul. Bylo popsáno několik sloučenin, které vykazují již v nanomolárních či nízkých mikromolárních koncentracích potenciál pro inhibici CDK2 i 1, s výrazně nižší aktivitou proti CDK4/6. Z nich lze jmenovat například Seliciclib/R-roskovitin (Meijer, *et al.*, 1997; McClue *et al.*, 2002), BMS-387032 (Kim *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2004), SU9516 (Lane *et al.*, 2001), AZ703 (Anderson *et al.*, 2003; Byth *et al.*, 2004) a amino-imidazopyridin 1d (Hamdouchi *et al.*, 2004). Tyto sloučeniny jsou schopny navodit zastavení buněčného cyklu v S a G2 fázi následované apoptózou. Také pan-specifický tumor supresor flavopiridol je schopen navodit E2F-1 dependentní buněčnou smrt. Flavopiridol inhibuje více kináz: CDK1, 2, 4, 6, 7 a 9, proto navozuje zastavení v G1 a G2 v mnoha typech exponenciálně rostoucích nádorů. Pokud však jsou buňky před ovlivněním flavopiridolem již v S fázi, například vliem synchronizace či chemoterapie, vykazuje flavopiridol cytotoxické účinky. Navozená buněčná smrt je E2F-1 závislá, v E2F-1^{-/-} buňkách byla potlačena, a je také selektivní jen pro transformované buňky (Matranga *et Shapiro*, 2002; Jiang *et al.*, 2003). Tyto výsledky vedly k použití kombinace gemcitabinu a flavopiridolu klinických testech. Změna aktivity CDK během S a G2 fáze může navodit buněčnou smrt ještě i jinými mechanismy než je E2F-1, například interferencí se signálními drahami poškození DNA, což naznačuje synergické použití cytotoxické chemoterapie a inhibitorů CDK (Shapiro, 2006).

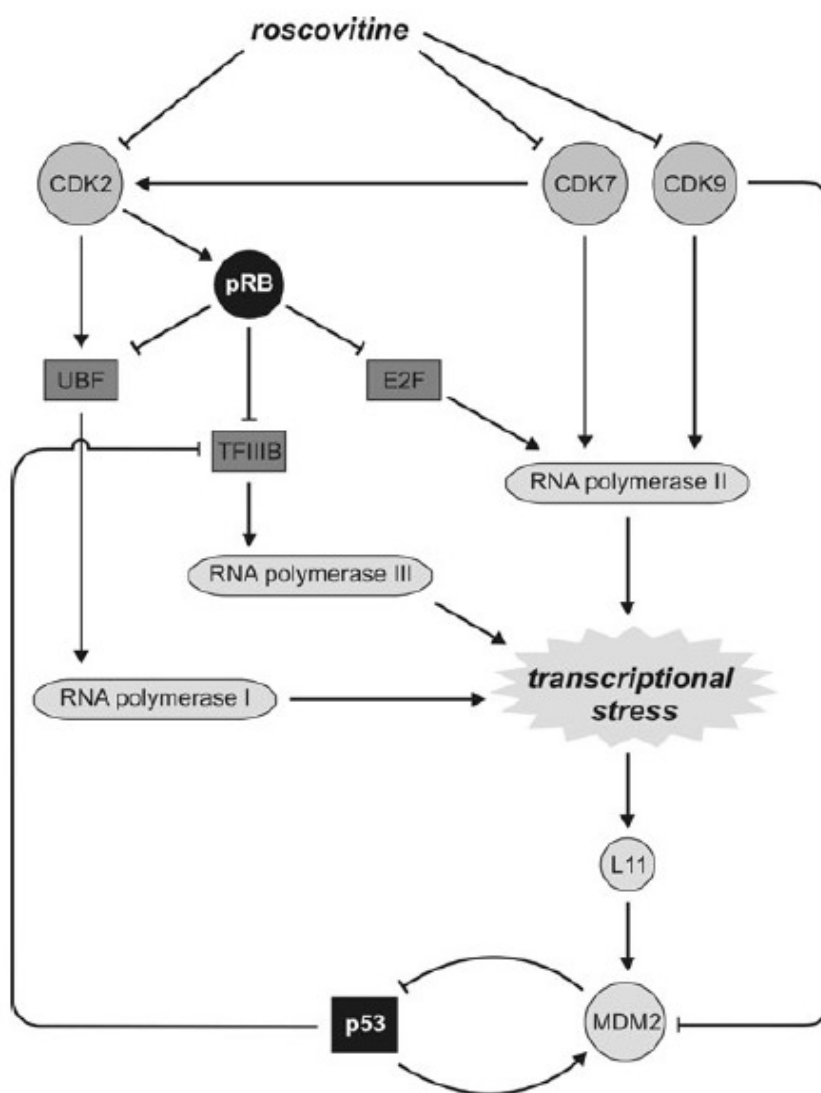
Komplex CDK1/CYC B je zapojen nejen v regulaci přechodu G2/M, ale hraje roli také v aktivaci buněčného přežití během mitotického kontrolního bodu (též nazývaného kontrolním bodem mitotického vřeténka). Regulace M kontrolního bodu je spojena s proteinem survivinem. Survivin je člen IAP (inhibitor of apoptosis) rodiny proteinů, který inhibuje aktivaci kaspázy, což vede k negativní regulaci apoptózy. Survivin je exprimován v závislosti na buněčném cyklu. Jako odpověď na mikrotubulární stabilizaci dochází v M kontrolním bodě k fosforylaci survivinu na Thr34 zprostředkované CDK1/CYC B, tato fosforylace vede k stabilizaci a zvýšené expresi survivinu (O'Connor *et al.*, 2002; Shapiro, 2006). Redukce aktivity CDK1/CYC B po proběhnutí M kontrolního bodu je nutná pro ukončení mitózy. Inhibitory CDK, konkrétně purvalanol A, flavopiridol, NU6140 a roskovitin, způsobují u buněk zastavených v mitóze apoptózu vlivem úbytku survivinu

inhibicí fosforylace Thr34 cyklin-dependentní kinázou 1 (O'Connor *et al.*, 2002; Wall *et al.*, 2003; Pennati *et al.*, 2005).

Roskovitin je reverzibilní inhibitor CDK1, 2, 5, 7 a 9 působící jako kompetitor ATP (Ljungman *et Paulsen*, 2001; Savio *et al.*, 2006; Kryštof *et Uldrijan*, 2010). Roskovitin zastavuje nejen buněčný cyklus v G1 a G2/M fázi, ale také způsobuje inhibici syntézy DNA (Schang *et al.*, 2000), indukci a akumulaci p53, jadernou fragmentaci (David-Pfeuty, 1999) a také indukci apoptózy (Mgbonyebi *et al.*, 1999; Ljungman *et Paulsen*, 2001). Zajímavé je, že buňky ovlivněné roskovitinem podstupují apoptózu ve všech fázích buněčného cyklu (David-Pfeuty, 1999). Bylo prokázáno, že roskovitin indukuje stabilizaci a akumulaci tumor supresorového proteinu p53, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 a G2/M fázi a navození apoptózy. Roskovitin inhibuje CDK2 i CDK1, které obě fosforylují p53 na serinu 315. Fosforylace serinu 315 snižuje tetramerizaci p53. Tetramerizace je ochranou p53 před nukleárním exportním signálem a vede k akumulaci p53 v jádře. Snižování tetramerizace p53 fosforylací serinu 315 vede k exportu p53 z jádra a činí jej více náchylným k proteozomální degradaci. Blok fosforylace Ser315 může roskovitin navíc dále podporovat jeho defosforylací cdc14 fosfatázou, což vede k další akumulaci p53 v jádře (David-Pfeuty, 1999; Ljungman *et Paulsen*, 2001; Savio *et al.*, 2006). Tento buněčný efekt byl připisován přímému účinku roskovitinu na inhibici CDK, je však pravděpodobné, že na tomto účinku mají podíl i další mechanismy, jako například inhibice transkripce (obr. 5). Blok transkripce je spouštěcím mechanismem pro indukci p53 a apoptózu (Ljungman *et Paulsen*, 2001). Alternativním mechanismem indukce p53 roskovitinem může být inhibiční efekt roskovitinu na transkripci inhibicí CDK7 a CDK9. Inhibice těchto aktivátorů RNA polymerázy II indukuje jak p53 tak i apoptózu (Ljungman *et Paulsen*, 2001; Węsierska-Gądek *et Kryštof*, 2009), mimo jiné také inhibicí transkripce MDM2 (Savio *et al.*, 2006).

Nedávno bylo také popsáno, že chemická inhibice CDK2 nebo též exprese neaktivní CDK2 může aktivovat S fázový kontrolní bod, který vede k ATM nebo ATR závislé stabilizaci p53 a k modifikacím v hladinách na chromatin se vázajících proteinů MCM v prereplikačním komplexu. Tyto změny následně navodí inhibici syntézy DNA zastavením replikační vidličky. Bohužel není stále jasné, zda je aktivace S kontrolního

bodu způsobená přímým účinkem CDK inhibitorů, nebo je naopak spouštěna inhibicí syntézy DNA, či jsou zde zapojeny ještě další mechanismy, zejména protože akumulace p53 v jádře může být způsobena mnoha odlišnými dráhami. Roscovitin spouští buněčnou odpověď, která se jeví pouze částečně odpovědná za p53 akumulaci, protože zvýšení p53 bylo pozorováno ve všech fázích buněčného cyklu (Savio *et al.*, 2006).



Obr. 5. Roscovitin blokuje transkripci prostřednictvím inhibice CDK2, CDK7 a CDK9 (převzato z Węsierska-Gądek et Kryštof, 2009).

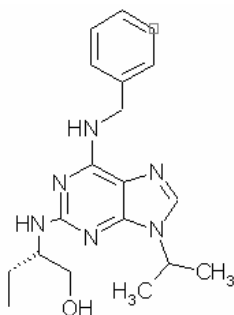
4 Materiál a metodika

4.1.1 Biologický materiál

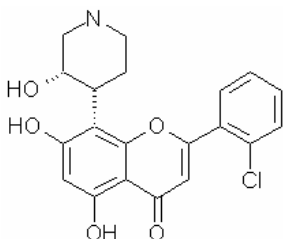
Experimenty byly provedeny na buněčné linii K562. Tato linie je odvozena od lidské chronické myeloidní leukémie. Buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ a k jejich kultivaci bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) médium s přidávanými aditivy: 10% (v/v) fetální bovinní sérum, streptomycin (0,1 mg/ml), penicilin (0,1 mg/ml) a L-glutamin (0,3 g/l).

4.1.2 Inhibitory CDK

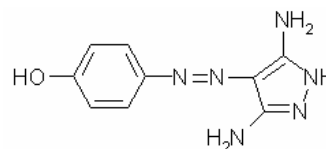
V experimentální části práce byly použity následující tři inhibitory CDK: roskovitin (6-benzylamino-2-(R)-[(1-ethyl)-2-hydroxyethylamino]-9-isopropylpurin), flavopiridol (2-(2-chlorofenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3R,4S)-3-hydroxy-1-methylpiperidin-4-yl]chromen-4-on) a CAN508 4-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl]fenol. Zásobní roztoky roskovitinu a CAN508 byly připraveny jako 100 mM a zásobní roztok flavopiridolu jako 10 mM v DMSO, které byly dále rozředěny na požadované koncentrace v DMSO a kultivačním DMEM médiu.



roskovitin



flavopiridol



CAN 508

Obr. 6: Struktura použitých inhibitorů CDK.

4.1.3 Použité protilátky

V praktické části diplomové práce byly použity myší monoklonální protilátky: anti Rb klon 4H1 (ředění 1:1000) od firmy Cell Signaling, anti UBF klon F9 (ředění 1:500) od Santa Cruz Biotechnology a anti α -tubulin klon DM1A (ředění 1:500) od společnosti Sigma Aldrich, a také králičí polyklonální protilátky: anti fosfo UBF S388 (ředění 1:200) a anti fosfo UBF S484 (1:50) od firmy Santa Cruz Biotechnology, anti fosfo Rb S780 (ředění 1:1000), anti fosfo Rb S807/811 (ředění 1:250) a anti fosfo Rb S795 (1:100) od Cell Signaling. Primární protilátky byly při western blottingu vizualizovány pomocí sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou RAM/Px nebo SWAR/Px obě v ředění 1:1000 od firmy Sigma Aldrich. Při reciproké imunoprecipitaci komplexu Rb – UBF byla použita myší monoklonální protilátka anti Rb, klon IF8 v ředění 1:200 od firmy Santa Cruz Biotechnology. K analýze buněk na průtokovém cytometru byla použita primární protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou anti BrdU-FITC (ředění 1:20) od firmy Roche.

4.1.4 Chemikálie

V praktické části diplomové práce byly použity uvedené chemikálie: laurylsíran sodný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, ethanol, glycerol, kyselina trichloroctová a hydroxid sodný od společnosti Lach-Ner, glycin, tris(hydroxymethyl)aminomethan a tween 20 od firmy MP Biomedicals, marker molekulové hmotnosti Dual color standard od firmy BioRad, scintilační koktejl ULTIMA GOLDTM od firmy Packard Biosciences, ³H uridin a ¹⁴C thymidin od firmy MP Biomedicals, dihydrogenfosforečnan draselný, tetraboritan sodný dekahydrát (Chemapol), chlorid sodný, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, kyselina fosforečná (Penta), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema), phenylmethanesulfonyl fluoride, dithiothreitol, 2-merkptoethanol od firmy Serva, protein G-agarosa, aprotinin, leupeptin, ribonukleasa A, nonidet P-40, penicilin/streptomycin, akrylamid, N,N-methylenbisakrylamid, glutamin tetramethylethylendiamin, peroxidisíran amonný, hovězí sérový albumin, dimethylsulfoxid, ethylendiamintetraoctová kyselina, fluorid sodný, fenylmethylylsulfonyl fluorid, propidium jodid, ponceau S,

tetramethylethylendiamin, bromfenolová modř, Triton X-100, bromdeoxyuridin od firmy Sigma Aldrich a ECL kit Hemo-FischerScientific od firmy Waltham.

4.1.5 Použité roztoky

V experimentální části práce byly použity tyto roztoky: **RIPA pufr** (pH = 7,4) 20 mM TRIS pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2 % Nonidet P-40, před použitím přidat: 1 mM DTT, 22 μ M leupeptin, 1,5 μ M aprotinin a 1 mM PMSF, **PBS** (pH = 7,4 – 7,5) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄.12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, **TBS** (pH=6,8) 137 mM NaCl, 20 mM TRIS, **5x vzorkovací pufr** 0,3 M TRIS pH = 6,8, 10 % SDS, 50 % glycerol, 0,05 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkaptoethanol, **Elektroforetický pufr** 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 3,5 mM SDS, **Blotovací pufr** 25 mM TRIS, 192 mM glycin. **Blokovací roztoky**: 5% nízkotučné sušené mléko v PBS s 0,1% Tween 20; nebo 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20, **Promývací roztoky pro cytometrické techniky**: 1% BSA v PBS; 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20; 0,5% BSA v PBS; 2 M HCl s 0,5% Triton X-100.

4.1.6 Přístrojové vybavení

V experimentální části práce byly použity tyto přístroje: průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter); centrifuga BR4i multifunction (Jouan); inverzní světelný mikroskop CK2 (Olympus); vyvolávací automat XR 24 PRO (DÜRR DENTAL AG); flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaide, Flow Laboratories); CO₂ inkubátor (Sanyo); rotátor RS24 (Biosan); stolní centrifuga (Med. Instruments); blokový termostat MBT 250-2 (Kleinfeld labortechnik); spektrofotometr Helios β (UNICAM); ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin); aparát pro elektroforézu Mini Protean (BioRad); aparatura pro western blotting (BioRad); scintilační počítač Beckman LS6500 (Beckman).

4.2.1 Průtoková cytometrie

Buňky byly inkubovány s inhibitory CDK po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Použité koncentrace inhibitorů CDK byly následující: roskovitin 10, 20 a 40 μM, flavopiridol 0,1, 1 a 10 μM a CAN508 25, 50 a 100 μM. Na poslední hodinu treatmentu byl do média přidán 10 μM BrdU (bromodeoxyuridin). Poté byly buňky 2-krát promyty 1% BSA/PBS a 30 minut fixovány 70% ethanolem (-20 °C). Následovala 30 minutová inkubace buněk s HCl/Triton X-100 a neutralizace roztokem Na₂B₄O₇.10 H₂O. Buňky byly promyty 1% BSA/PBS s 0,1% Tween a po dobu jedné hodiny inkubovány ve tmě s protilátkou anti BrdU-FITC. Poté byly buňky promyty 1% BSA/PBS s 0,1% Tween. Následovala 30 minutová inkubace buněk s koktejlem obsahujícím RNAsu a propidium jodid. Po uplynutí doby inkubace byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru.

4.2.2 Radioaktivní značení DNA a RNA

Buňky K562 byly inkubovány po dobu 24 hodin v DMEM médiu obohaceném o ¹⁴C thymidin (62,5 Bq/ml), poté bylo médium vyměněno za DMEM bez ¹⁴C thymidinu a buňky byly po dobu čtyř hodin ovlivněny CDK inhibitory. Vybrané inhibitory CDK byly aplikovány na buňky K562 v koncentracích 5, 20 a 100 μM (roskovitin), 0,1, 0,5 a 2 μM (flavopiridol) a 10, 40 a 100 μM (CAN508). Půl hodiny před koncem ovlivnění byl do média přidán ³H uridin (0,75 MBq/ml). Po ukončení kultivace byly buňky zcentrifugovány na 1000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut, 3-krát promyty roztokem PBS. Při posledním promytí byly buňky rozděleny na dva stejné díly pro stanovení poměru mRNA k celkové DNA a RNA a uskladněny při -70 °C.

Při izolaci celkové RNA a DNA byl k peletu přidán 1% SDS a inkubace probíhala nejdříve 30 minut při pokojové teplotě a následně 5 minut při 95 °C. Po ukončení inkubace byla na 10 minut přidána 10% trichloroctová kyselina. Buněčný lyzát byl nanesen na fritu a centrifugován 30 sekund při 12 500 g. Zachycený pelet byl propláchnut nejdříve 5% trichloroctovou kyselinou a poté destilovanou vodou a na závěr centrifugován naprázdno 30 sekund opět při 12 500 g. Nukleové kyseliny byly eluovány 1 M NaOH zahřátým na 70 °C a centrifugovány 30 sekund při 12 500 g. Vzorky byly analyzovány

na přítomnost radioaktivně značených nukleotidů na scintilačním přístroji Beckman LS6500 (Beckman).

Pro izolaci mRNA byl použit Oligotex direct mRNA mini kit (Qiagen, číslo kitu 72022). Analýza radioaktivně značených nukleotidů proběhla na scintilačním přístroji Beckman LS6500 (Beckman).

4.2.3 Imunoprecipitace

Lyofilizovaný Protein G–agarosa se nechal zcela nabobtnat v PBS pufru pH 7,4 a poté byl vyblokován v 1% BSA/PBS, promyt v PBS a uschován při 4 °C v PBS pufru s 0,02% NaN₃. Před použitím bylo odebráno potřebné množství proteinu G–agarosa, to bylo promyto v PBS a převedeno do RIPA pufru pH 7,4 v jehož prostředí probíhala imunoprecipitace.

Buňky K562 byly po dobu 24 hodin ovlivněny roskovitinem v koncentracích 1, 10 a 100 μM. Po ukončení kultivace byly buňky zcentrifugovány na 1000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut, 3-krát promyty PBS a následně uskladněny při -70 °C. Sklizené buňky byly lyzovány v RIPA pufru po dobu 25 minut, v průběhu lyzace byly buňky 10 sekund sonikovány. Následovala centrifugace 25 minut na 14 000 g při 4 °C. Koncentrace celkových proteinů v buněčném lyzátu byla stanovena metodou Bradfordové.

Konečná koncentrace proteinů se nastavila doředěním RIPA pufrům na 0,5 μg/μl. 400 μl buněčného lyzátu o koncentraci 0,5 μg/μl bylo inkubováno se 2 μl protilátky anti Rb (klon IF8) přes noc na rotátoru při 4 °C. Po ukončení inkubace bylo k lyzátu přidáno 20 μl 50% suspenze proteinu G-agarosa. Proběhla inkubace s proteinem G na rotátoru 4 hodiny při 4 °C. Po ukončení inkubace byl protein G–agarosa s navázaným proteinem Rb 3-krát promyt RIPA pufrům a krátce centrifugován na stolní centrifuze. Supernatant byl odsán a ke vzorkům bylo přidáno 20 μl 3-krát vzorkovacího pufru. Následovala denaturace 5 minut při teplotě 95 °C. Vzorky byly dále analyzovány pomocí SDS-PAGE, Western blottingu a imunodetekce na membráně za použití specifických protilátek a chemiluminiscenčního

kitu ECL. Pro detekci analyzovaných proteinů byly použity protilátky anti Rb (klon 4H1, ředění 1:1 000) a anti UBF (klon F-9, 1:200).

4.2.4 SDS-PAGE a Western blotting

Buňky byly inkubovány s inhibitory CDK po dobu 24 hodin. Inhibitory byly použity v koncentracích: 1, 10, 20 a 40 μM (roskovitin), 0,1, 1, a 10 μM (flavopiridol) a 25, 50 a 100 μM (CAN508). Po ukončení kultivace byly buňky zcentrifugovány na 1000 g a při teplotě 4 °C po dobu 10 minut, 3-krát promyty PBS a následně uskladněny při -70 °C. Sklizené buňky byly lyzovány v RIPA pufru pH 7,4 po dobu 25 minut, v průběhu lyzace byly buňky 10 sekund sonikovány. Následovala centrifugace 25 minut na 14 000 g při 4 °C. Koncentrace celkových proteinů v buněčném lyzátu byla stanovena metodou Bradfordové. K lyzátu byl přidán vzorkovací pufr a vzorky byly denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C. Vzorky byly naneseny na SDS-PAGE (10% separační gel pH 8,8, 5% zaostřovací gel pH 6,8). Proteiny byly zaostřeny první půl hodiny při napětí 80 V, poté se napětí zvýšilo na 150 V a proteiny byly děleny další hodinu a půl. Rozdělené proteiny byly western blottingem přeneseny z gelu na nitrocelulosovou membránu v prostředí blotovacího pufru chlazeného ledem, při stabilním proudu 270 mA po dobu dvou hodin. Membrány byly obarveny v 0,2 Ponceau S, rozděleny na oblasti s požadovanými proteiny podle markerů molekulové hmotnosti a následně opět odbarveny. Membrány byly blokovány buď v 5% mléku/PBS s 0,1% Tween nebo v 5% BSA/TBS s 0,1% Tween po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Proteiny byly detekovány pomocí specifických protilátek, kdy sekundární protilátky byly značeny peroxidásou. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 4 °C, se sekundárními jednu hodinu při laboratorní teplotě. Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL a filmu.

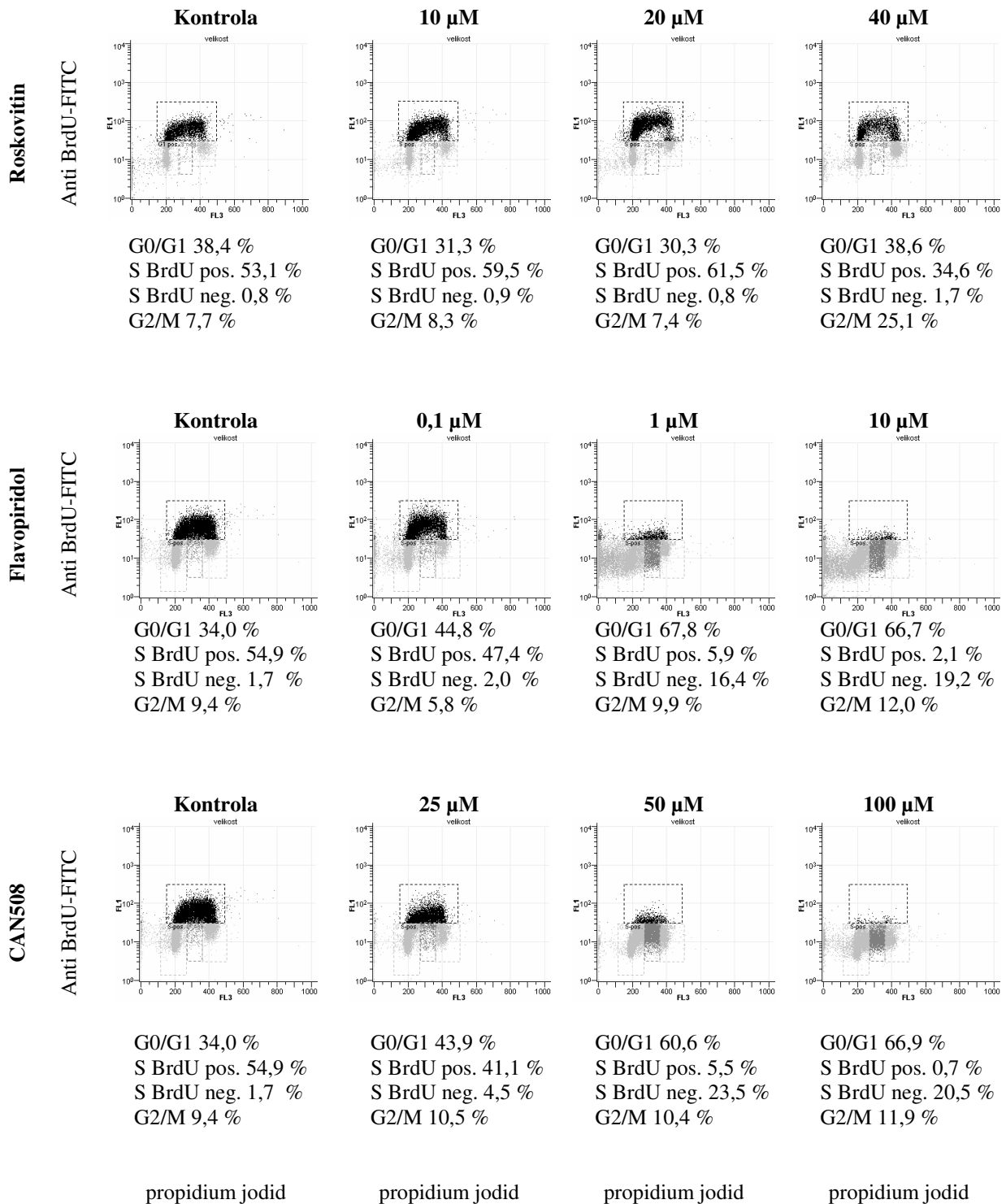
5 Výsledky

5.1 Analýza buněčného cyklu a syntézy DNA

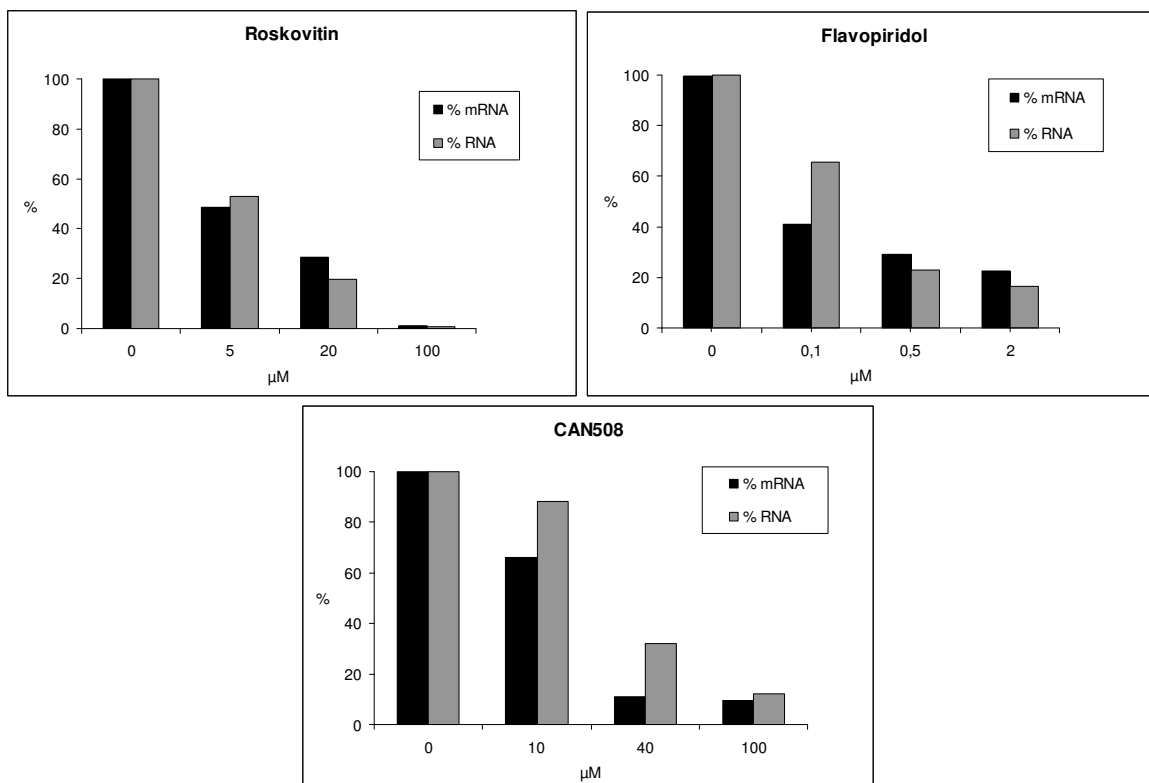
Negativní účinky inhibitorů CDK na proliferaci buněk v kultuře jsou dobře známé. Protože jsou však závislé na jejich koncentraci a době působení, a také na typu použitých buněk, byly nejprve antiproliferativní účinky vybraných inhibitorů CDK ověřeny. Kokrétně byl sledován vliv roskovitinu, flavopiridolu a CAN508 na replikaci DNA na buněčné linii K562, a to v koncentračních rozsazích, kdy dochází k účinné inhibici proliferace (Kryštof *et al.*, 2006). Průtokovým cytometrem byla analyzována inkorporace BrdU (kanál FL1) skrze fluorescenci protilátky anti BrdU-FITC kombinovaná s měřením relativního obsahu DNA pomocí značení propidium jodidem (kanál FL3). CAN508 a flavopiridol způsobovaly značnou inhibici syntézy DNA, u roskovitinu nebyl v daných koncentracích zaznamenán tak výrazný pokles replikace (obr. 7). U flavopiridolu a CAN508 klesla replikace DNA v nejvyšších koncentracích téměř na nulu. V případě inhibitoru flavopiridolu byl pozorován také jeho vliv na nárůst počtu buněk v G1 a subG1 fázi buněčného cyklu.

5.2 Analýza syntézy RNA

Vliv jednotlivých CDK inhibitorů na transkripci byl hodnocen na základě měření inkorporace radioaktivně značeného uridinu do nově syntetizované RNA. Měřena byla hladina nově syntetizované celkové RNA a mRNA. Pro normalizaci byly buňky den před pokusem inkubovány s radioaktivně značeným deoxythymidinem, který se inkorporoval do DNA. Signál DNA byl pak použit pro normalizaci hladin RNA. Všechny tři inhibitory (roskovitin, flavopiridol, CAN508) vykazovaly výrazný inhibiční vliv na hladinu nově syntetizované RNA (obr. 8). Byl pozorován postupný pokles hladin celkové RNA i mRNA se zvyšující se koncentrací aplikovaných inhibitorů.



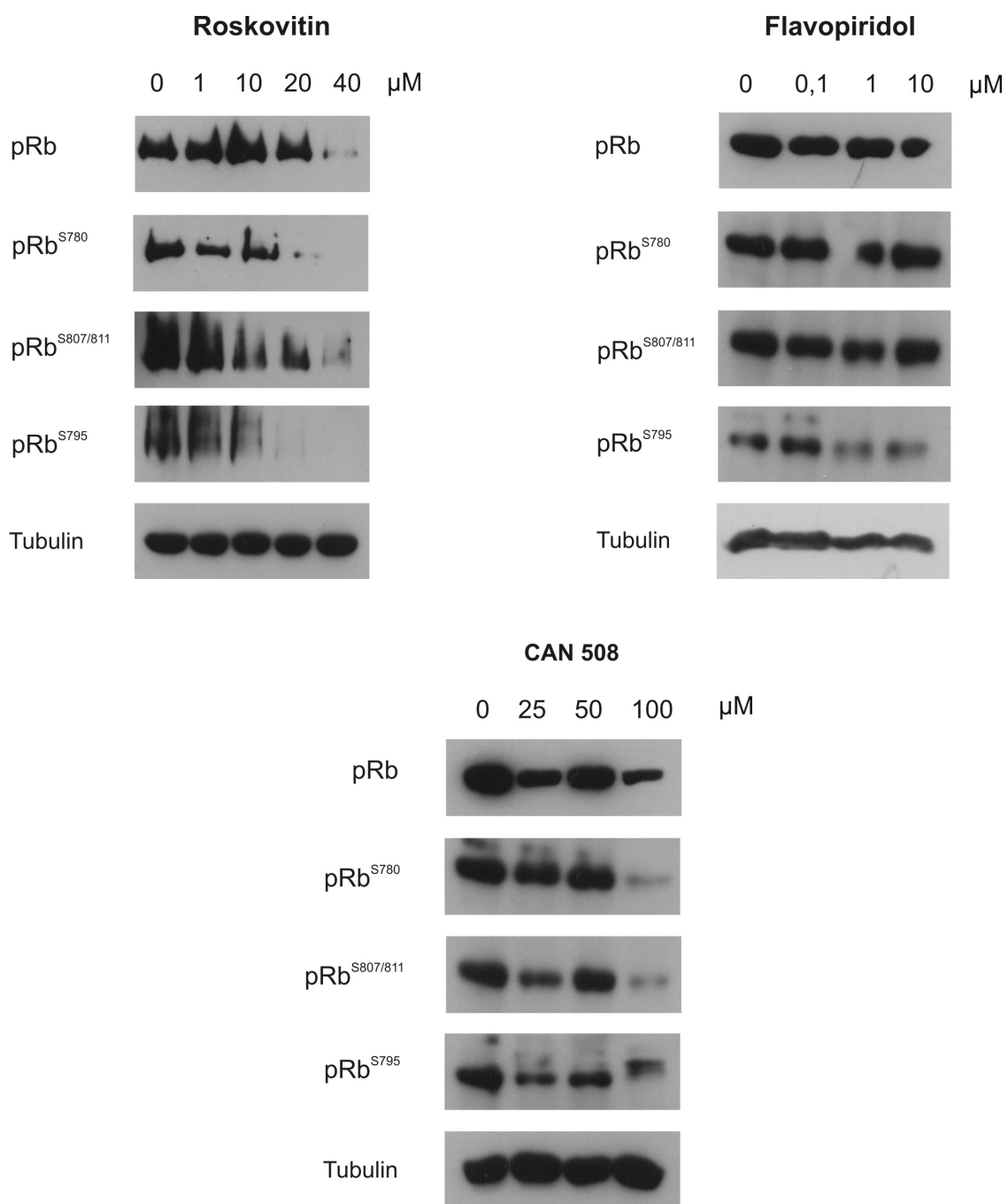
Obr. 7: Vliv 24 hodinového působení roskovitinu, flavopiridolu a CAN508 na buněčný cyklus a syntézu DNA v buněčné linii K562. Analýza BrdU inkorporace průtokovým cytometrem na buněčné linii K562 ovlivněné po dobu 24 hodin roskovitinem, flavopiridolem a CAN508. BrdU byl přidán během poslední hodiny inkubace. Dot – plots ukazují inkorporaci BrdU detekovanou imunoflourescencí protilátky anti BrdU-FITC doplněné fluorescencí propidiumjodidu, který značí relativní obsah DNA.



Obr. 8: Vliv 4 hodinového působení roscovitinu, flavopiridolu a CAN508 na syntézu RNA a mRNA v buněčné linii K562. Scintilační analýza inkorporace ^{14}C thymidinu a ^3H uridinu na buněčné linii K562 ovlivněné po dobu 4 hodin indikovanými koncentracemi inhibitorů CDK (roscovitin, flavopiridol, CAN508).

5.3 Fosforylace proteinu Rb

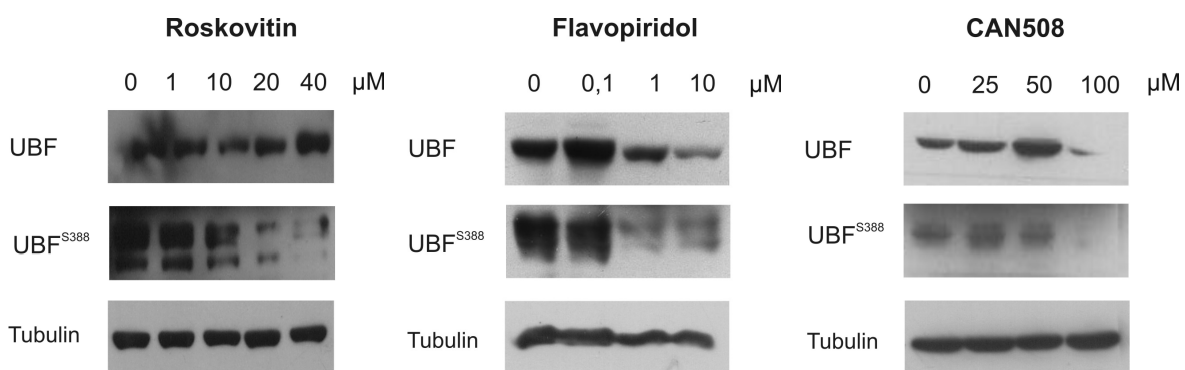
Dále byl sledován vliv použitých inhibitorů na fosforylaci proteinu Rb na serinu 780, Ser807/811 a Ser795 (obr. 9). Aplikace roscovitinu na buňky linie K562 měla za následek nejen očekávané snížení fosforylace Rb, ale také snížení celkové hladiny proteinu Rb. K postupné defosforylaci proteinu Rb na Ser780, Ser807/811 a Ser795 docházelo opět se zvyšující se koncentrací použitých inhibitorů. Defosforylaci Rb na serinu 780 je možné pozorovat již u koncentrace roscovitinu 20 μM . Pokles fosforylace Rb byl zaznamenán také na Ser795 s koncentrací roscovitinu 10 μM a byl patrný i na Ser807/811 při koncentraci inhibitoru 40 μM . Již ne tak zjevný pokles fosforylací proteinu Rb pozorujeme u buněk ovlivněných flavopiridolem, zde dochází k defosforylaci serinu 795 s koncentrací flavopiridolu 1 μM . Hladiny Ser780 a Ser807/811 zůstávají vyrovnané. U buněk ovlivněných inhibitorem CAN508 docházelo k poklesu fosforylace proteinu Rb na Ser780, Ser807/811 a Ser795 až s nejvyšší, to jest 100 μM , koncentrací inhibitoru.



Obr. 9: Vliv roskovitinu, flavopiridolu a CAN508 na hladinu a fosforylace proteinu Rb. Imunoblot analýza buněčné linie K562 ovlivněné po dobu 24 hodin indikovanými koncentracemi inhibitorů CDK (roscovitin, flavopiridol, CAN508).

5.4 Fosforylace proteinu UBF

Dále byl sledován vliv jednotlivých inhibitorů na celkovou hladinu transkripčního faktoru UBF a změny v jeho fosforylaci na serinu 388 v buněčné linii K562 (obr. 10). Aplikace roskovitinu na buňky linie K562 vyvolala snížení fosforylace UBF na Ser388, ne však pokles celkové hladiny UBF. K poklesu fosforylace serinového rezidua 388 docházelo při koncentracích 20 a 40 μM . U buněk ovlivněných flavopiridolem docházelo jak k defosforylaci proteinu UBF na Ser388, tak i k celkovému poklesu hladiny UBF. V případě látky CAN508 klesla při maximální použité koncentraci (100 μM) také hladina celkového proteinu UBF.

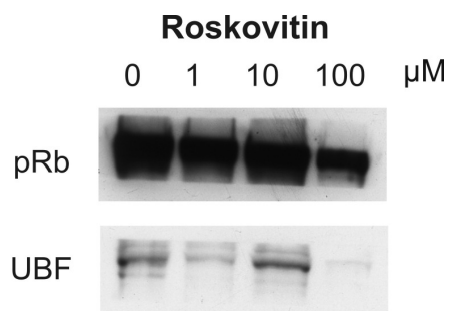


Obr. 10: Vliv roskovitinu, flavopiridolu a CAN508 na hladinu a fosforylaci proteinu UBF na Ser388. Imunoblot analýza buněčné linie K562 ovlivněné po dobu 24 hodin uvedenými koncentracemi inhibitorů cdk (roscovitin, flavopiridol, CAN508).

5.5 Změny tvorby komplexu Rb - UBF

Po ověření antiproliferativního působení testovaných inhibitorů CDK následovalo studium jejich vlivu na změny vzájemné interakce Rb a UBF. Nejprve byl studován vliv roskovitinu na komplex Rb–UBF, a to pomocí reciproké imunoprecipitace s následným imunoblotingem. Precipitován byl po sérii předběžných pokusů protein Rb, a to protilátkou IF8. Protilátka proti UBF, vhodná pro obrácenou precipitaci nebyla dostupná. Precipitát byl po důkladném promytí denaturován a analyzován imunoblotem, kdy byly detekovány pomocí specifických protilátek jak Rb tak UBF. Nebyla pozorována žádná významná

změna v poměru jednotlivých komponent komplexu Rb – UBF na základě ovlivnění buněk indikovanými koncentracemi roskovitinu (obr. 11). Vzhledem k náročnosti experimentu a negativnímu výsledku již pak nebyly provedeny experimenty s dalšími dvěma inhibitory CDK.



Obr. 11: Analýza hladin komplexu Rb – UBF po ovlivnění roskovitinem. Imunoblot analýza reciproké imunoprecipitace komplexu Rb – UBF buněčné linie K562 ovlivněné po dobu 24 hodin indikovanými koncentracemi roskovitinu zachycuje jeho vliv na stabilitu komplexu Rb – UBF.

6 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo přispět k objasnění mechanismů cytotoxického působení roskovitinu, a to jeho srovnáním s dalšími inhibitory CDK s odlišnou selektivitou – flavopiridolem a CAN508. Jedná se o látky s potenciálně protinádorovým působením, ale vzhledem k jejich selektivitě (zejména u flavopiridolu a roskovitinu) jsou jejich účinky pleiotropní a proto není zcela jasné, co je podstatné pro jejich antiproliferativní a proapoptické účinky. Ukazuje se, že se na nich podílí pravděpodobně několik nezávislých mechanismů. Roskovitin totiž přímo inhibuje aktivitu mitotické CDK1, S-fázové CDK2, aktivační CDK7 a transkripční CDK9 (McClue *et al.*, 2002; Kryštof *et Uldrijan*, 2010). Flavopiridol inhibuje CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 a nejsilnější inhibici pak vykazuje vůči CDK9 (Lapenna *et Giordano*, 2009). CAN508 vykazuje přímý a relativně specifický účinek na inhibici CDK9 (Kryštof *et al.*, 2006). Roskovitin a flavopiridol mají přímý negativní efekt na buněčný cyklus nádorových buněk, což vede k okamžitému zastavení proliferace, s největší pravděpodobností spojenou s defosforylací proteinu Rb (Whittaker *et al.*, 2004, MacCallum *et al.*, 2005). Negativní vliv těchto látek na fosforylacii Rb v buněčné linii K562 byl ověřen také v této práci (obr. 9). Zejména u flavopiridolu a CAN508 pak toto zjištění koreluje se schopností těchto dvou látek zvyšovat podíl buněk v G1 fázi buněčného cyklu (obr. 7). Roskovitin však v použité buněčné linii K562 žádnou výraznou akumulaci v G1 fázi nezpůsobil, pozorována byla až u nejvyšší koncentrace, tj. 40 μM . Mnohem výraznější však byl jeho vliv na populaci buněk ve fázích G2 a M. Důvodem může být inhibice CDK1, což je regulátor významný zejména pro přechod G2/M (Węsierska-Gądek *et Kryštof*, 2009). Inhibice CDK1 roskovitinem negativně ovlivňuje průběh mitózy. Doposud však nebylo zcela jednoznačně vysvětleno, proč by inhibice CDK1 měla mít cytotoxické účinky. Jednou z možností je zablokování homologní rekombinace (resp. kroků závislých na CDK1), které může vést k akumulaci zlomů DNA a navození buněčné smrti. Roskovitin (Crescenzi *et al.*, 2005) i flavopiridol (Ambrosini *et al.*, 2008) prokazatelně negativně ovlivňují opravy dvouvláknových zlomů v DNA pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ, non-homologous end joining), čímž podporují zastavení buněčného cyklu a navození buněčné smrti. Experimenty sice byly prováděny s buňkami vystavenými vlivu

ionizujícího záření, dá se však předpokládat, že podobně mohou inhibitory CDK působit také na spontánní poškození DNA nižšího rozsahu.

Na cytotoxickém působení roskovitinu se může podílet také nádorový supresor p53, jehož hladina v ovlivněných buňkách výrazně narůstá a mění expresi p53-podřízených genů (David-Pfeuty, 1999; Kotala *et al.*, 2001; Paprskářová *et al.*, 2009). Cytotoxicita roskovitinu však není zcela závislá na p53, neboť linie s nefunkčním (mutovaným) p53 jsou k roskovitinu také citlivé, i když přibližně 2-krát méně (Paprskářová *et al.*, 2009). Za aktivaci p53 stojí pravděpodobně přímá inhibice CDK9 roskovitinem, která snižuje expresi MDM2 (Kryštof *et al.*, 2005; Paprskářová *et al.*, 2009). Aktivita p53 však může vzrůstat také působením ionizujícího záření, které poškozuje DNA (Crescenzi *et al.*, 2005). Aktivace nádorového supresoru p53 kombinací uvedených (různých) mechanismů tak může být výhodná pro terapeutické použití inhibitorů CDK (Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

Další diskutovanou možností příčin cytotoxicity inhibitorů CDK je replikační stres, který vyvolávají. Jejich působením totiž dochází k blokování replikace, nejspíš vlivem přímé inhibice CDK2 (Schutte *et al.*, 1997; Kryštof *et al.*, 2006; Paprskářová *et al.*, 2009). Roskovitin a další CDK2 inhibitory prokazatelně blokuje replikaci (obr. 7), následný kolaps replikačních vidliček a nedoreplikovaná DNA je nejen signálem pro zastavení buněčného cyklu, ale může indukovat i buněčnou smrt (Savio *et al.*, 2006).

Postup buněčným cyklem je regulován řadou pozitivních a negativních faktorů, z nichž významnou roli hrají právě CDK. Zejména vstup do buněčného cyklu a rozhodování o zahájení S fáze jsou kriticky závislé na aktivitách CDK4 a CDK2. Následkem je aktivace transkripce genů řízených E2F transkripčními faktory a zahájení replikace DNA. Na druhou stranu nesprávná a přetrvávající aktivita transkripčních faktorů E2F, která je nutná pouze pro přechod G1/S a zahájení replikace, může vyvolat zastavení buněčného cyklu až apoptózu. Během S fáze je totiž aktivita E2F opět inaktivována, mj. fosforylací CDK2. Pokud je CDK2 inhibována např. nízkomolekulárními inhibitory typu roskovitinu, transkripce G1/S-fázových genů řízená E2F přetrvává a může vést až k navození apoptózy (Chen *et al.*, 1999; Vandel *et Kouzarides*, 1999; Shapiro, 2006).

Inhibitory CDK potlačují ovšem nejen transkripci relativně omezené skupiny E2F-regulovaných genů, ale v podstatě transkripci globální. Je to známo jak pro flavopiridol, tak pro roskovitin (Ljungman *et* Paulsen, 2001). Za příčinu je považována přímá inhibice CDK7 a CDK9, které aktivují RNA polymerasu II. Tuto skutečnost potvrzují i výsledky této práce, kdy byl roskovitin a flavopiridol srovnáván s relativně vysoce selektivním inhibitorem CDK9, azopyrazolem CAN508. Jeho preference vůči CDK9 a vliv na expresi některých genů byla popsána v literatuře (Kryštof *et al.*, 2006). Zde je ukázán jeho negativní vliv na syntézu RNA v buňkách, který dobře koreluje s koncentracemi, které vykazují cytotoxickou aktivitu (Kryštof *et al.*, 2005; Kryštof *et al.*, 2006). Působení všech tří inhibitorů vede k útlumu transkripce zejména mRNA, což se může odrazit na schopnosti buněk přežít, protože nádorové buňky jsou velmi závislé na kontinuální expresi některých onkogenů (Koumenis *et* Giaccia, 1997). Navíc dochází k poklesu hladin některých důležitých antiapoptotických proteinů, jako jsou Mcl-1 nebo XIAP (Demidenko *et* Blagosklonny, 2004; MacCallum *et al.*, 2005, Paprskářová *et al.*, 2009).

Inhibice CDK9 a následný pokles úrovně transkripce tak snižuje viabilitu transformovaných buněk, které jsou na vyšších hladinách některých antiapoptotických proteinů a proteinů pro přežívání kriticky závislé. Pro normální buňky přitom zásah do transkripce na přechodnou dobu není výrazně nebezpečný (Koumenis *et* Giaccia, 1997). Vliv studovaných látek ovšem není negativní pouze na syntézu mRNA, ale také na transkripci celkovou, jak již bylo zjištěno dříve (Ljungman *et* Paulsen, 2001). Většina buněčné RNA přitom připadá na rRNA, jejíž syntéza je pro rychle rostoucí a dělící se buňky také velmi důležitá. Negativní vliv inhibitorů CDK9 na syntézu mRNA, ale především celkové RNA, je také doložen v této práci (viz obr. 8).

Jaký je tedy vztah mezi inhibicí CDK a transkripcí rRNA? Probíhající buněčný cyklus je pochopitelně koordinován s růstem buňky tak, aby vzniklé dceřiné buňky po rozdělení měly přibližně stejnou velikost jako buňka mateřská, pro což je samozřejmě nutný nárůst veškeré její hmoty. Tento růst je dán především proteosyntézou, závislou na intenzivní transkripci a translaci. Jedním z pojítek mezi růstem buňky a kontrolním systémem buněčného cyklu jsou transkripční regulátory interagující s např. proteinem Rb (viz obr. 2 a 5). Syntézu rRNA řídí mimo jiné transkripční faktor UBF, který je v G1 fázi cyklu

aktivován fosforylací CDK2. V neproliferující buňce, kdy je transkripce relativně tlumená, je navíc UBF držen v neaktivním komplexu s Rb, jehož fosforylace po mitogenní stimulaci vede k rozpadu tohoto komplexu a zvýšení aktivity RNA polymerasy I (White, 2005). Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda inhibitory CDK ovlivňují fosforylací UBF a jeho schopnost rozvolňovat vazbu s Rb. Všechny tři testované inhibitory způsobují snížení fosforylace UBF na Ser388. Pro roskovitin a flavopiridol, které inhibují CDK2 byl tento efekt očekáván. Vliv roskovitinu na vzájemnou interakci mezi Rb a UBF však nebyl potvrzen. Poněkud překvapivě byl ovšem pozorován negativní vliv látky CAN508 na fosforylací UBF. Preference CAN508 pro CDK9 naznačuje opět složitost regulačních mechanismů, které propojují buněčný cyklus s buněčným růstem. Jedním z možných vysvětlení je, že Ser388 faktoru UBF může být fosforylován kromě CDK2 také přímo CDK9, případně další proteinkinasou, jejíž aktivita (nebo exprese) je vlivem inhibice CDK9 také potlačena. Jednoznačným výstupem ovšem zůstává negativní vliv inhibitorů CDK (minimálně těch třech použitých v této práci) na transkripci mRNA a zejména rRNA, daný alespoň z části sníženou fosforylací UBF, což může přispívat k cytotoxickému působení studovaných sloučenin.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo přispět k objasnění vztahu mezi selektivitou nízkomolekulárních inhibitorů CDK a jejich vlivem na regulaci transkripce u buněčné linie K562 odvozené od chronické myeloidní leukémie. Zvoleny byly roskovitin, flavopiridol a CAN508, inhibitory s odlišnými strukturami a také selektivitou. Získané výsledky dokumentují negativní vliv těchto látek na proliferaci leukemické buněčné linie K562. Tento vliv je pravděpodobně způsoben inhibicí CDK v buňkách, což se projevuje změnami v buněčném cyklu, ve snížené fosforylaci proteinu Rb a poklesu úrovně syntézy RNA. Posuzován byl také nově navrhovaný mechanismus antiproliferativního působení inhibitorů CDK založený na jejich předpokládaném vlivu měnit vzájemnou interakci transkripčních regulátorů Rb a UBF. Přestože byl zjištěn negativní vliv studovaných inhibitorů na fosforylaci UBF, která je důležitá pro schopnost aktivovat transkripci rRNA, změny ve schopnosti Rb tvořit komplex s UBF nebyly pozorovány.

8 Literatura

- Ambrosini, G., Seelman, S.L., Qin, L.X., Schwartz, G.K. (2008): The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Potentiates the Effects of Topoisomerase I Poisons by Suppressing Rad51 Expression in a p53-Dependent Manner. *Cancer Res* 68: 2312 – 2320.
- Anderson, M., Beattie, J.F., Breault, G.A., Breed, J., Byth, K.F., Culshaw, J.D., Ellston, R.P.A., Green, S., Minshull, C.A., Norman, R.A., Pauptit, R.A., Stanway, J., Thomas, A.P., Jewsbury, P.J. (2003): Imidazo[1,2-a]pyridines: A potent and selective class of cyclin-dependent kinase inhibitors identified through structure-based hybridisation. *Bioorgan Med Chem Lett* 13: 3021 – 3026.
- Baughn, L.B., Di Liberto, M., Wu, K., Toogood, P.L., Louie, T., Gottschalk, R., Niesvizky, R., Cho, H., Ely, S., Moore, M.A.S., Chen-Kiang, S. (2006): A Novel Orally Active Small Molecule Potently Induces G1 Arrest in Primary Myeloma Cells and Prevents Tumor Growth by Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4/6. *Cancer Res* 66: 7661 – 7667.
- Byth, K.F., Culshaw, J.D., Green, S., Oakes, S.E., Thomas, A.P. (2004): Imidazo[1,2-a]pyridines. Part 2: SAR and optimisation of a potent and selective class of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorgan Med Chem Lett* 14: 2245 - 2248.
- 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.
- Comai, L., Zomerdijk, J.C., Beckmann, H., Zhou, S., Admon, A., Tjian, R. (1994): Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science* 23: 1966 - 1972.
- Crescenzi, E., Palumbo, G., Brady, H.J.M. (2005): Roscovitine Modulates DNA Repair and Senescence: Implications for Combination Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11: 8158 – 8171.
- David-Pfeuty, T. (1999): Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene* 18: 7409 – 7422.

- 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.
- Finn, R.S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D.J., Desai, A., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., Los, G., Slamon, D.J. (2009): PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Canc Res* 11: 3 – 13.
- Fischer E.H., Krebs, E.G. (1966): Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. *Fed. Proc.* 25: 1511 – 1520.
- Fisher, R.P. (2005): Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* 118: 5171-5180.
- Fry, D., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M.A., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X.X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., Toogood, P.L. (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3: 1427 – 1437.
- Glover-Cutter, K., Larochelle, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R.P., Bentley, D.L. (2009): TFIIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of CTD Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 29: 5455 – 5464.
- Grant, S.K. (2009): Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cel MolLife Sci* 66: 1163 – 1177.
- Grummt, I. (2003): Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* 17: 1691 – 1702.
- Hamdouchi, C., Keyser, H., Collins, E., Jaramillo, C., Diego, J.E.D., Spencer, C.D., Dempsey, J.A., Anderson, B.D., Leggett, T., Stamm, N.B., Schultz, R.M., Watkins, S.A., Cocke, K., Lemke, S., Burke, T.F., Beckmann, R.P., Dixon, J.T., Gurganus, T.M., Rankl, N.B., Houck, K.A., Zhang, F., Vieth, M., Espinosa, J., Timm, D.E., Campbell, R.M., Patel, B.K.R., Brooks, H.B. (2004): The discovery of a new structural class of cyclindependent kinase inhibitors, aminoimidazo[1,2-a]pyridines. *Mol Cancer Ther* 3: 1 - 9.

- Hannan, K.M., Hannan, R.D., Smith, S.D., Jefferson, L.S., Lun, M., Rothblum, L.I. (2000): Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* 19: 4988 – 4999.
- Harbour, J.W., Dean, D.C. (2000): The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14: 2393 – 2409.
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M., Grummt, I. (1999): Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *The EMBO Journal* 17: 7373 – 7381.
- Huse, M., Kuriyan, J. (2002): The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275 – 282.
- Chen, Y.N.P., Sharma, S.K., Ramsey, T.M., Jiang, L., Martin, M.S., Baker, K., Adams, P.D., Bair, K.W., Kaelin, W.G. Jr. (1999): Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclindependent kinase 2 antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4325-4329.
- Chu, W.M., Wang, Z., Roeder, R.G., Schmid, C.W. (1997): RNA Polymerase III Transcription Repressed by Rb through Its Interactions with TFIIB and TFIIC2. *J Biol Chem* 272: 14755 – 14761.
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jim, A., Itahana, , Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., Zhang, Y. (2003): Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12: 1151 – 1164.
- Jiang, J., Matranga, C.B., Cai, D., Latham, V.M. Jr., Zhang, X., Lowell, A.M., Martelli, F., Shapiro, G.I. (2003): Flavopiridol-induced apoptosis during S phase requires E2F-1 and inhibition of cyclin A-dependent kinase activity. *Cancer Res* 63: 7410 - 7422.
- Johnson, B.E., Jänne, P.A. (2006): Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12: 4436 - 4440.
- Kim, K.S., Kimball, S.D., Misra, R.N., Rawlins, D.B., Hunt, J.T., Xiao, H.Y., Lu, S., Qian, L., Han, W.C., Shan, W., Mitt, T., Cai, Z.W., Poss, M.A., Zhu, H., Sack, J.S., Tokarski J.S., Chang C.Y., Pavletich, N., Kamath, A., Humphreys, W.G., Marathe, P., Bursuker, I., Kellar, K.A., Roongta, R., Batorsky, R., Mulheron, J.G., Bol, D., Fairchild, C.R., Lee, F.Y., Webster, K.R. (2002): Discovery of aminothiazole

- inhibitors of cyclin-dependent kinase 2: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities. *J Med Chem* 45: 3905 – 3927.
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin - dependent kinases. *Trends Pharm Sci* 23: 417 – 425.
- Kotala, V., Uldrijan, S., Horky, M., Trbusek, M., Strnad, M., Vojtesek, B. (2001): Potent induction of wild-type p53-dependent transcription in tumour cells by a synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Cel Mol Life Sci* 58: 1333 – 1339.
- Koumenis, C., Giaccia, A. (1997): Transformed Cells Require Continuous Activity of RNA Polymerase II To Resist oncogene-Induced Apoptosis. *Mol Cel Biol* 17: 7306 – 7316.
- Kryštof, V., McNae, I.W., Walkinshaw, M.D., Fischer, P.M., Müller, P., Vojtesek, 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 Jr., W.F., 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. *Cur Drug Targets* 11: 291 – 302.
- Lam, L.T., Pickeral, O.K., Peng, A.C., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Giltneane, J.M., Averett, L.M., Zhao, H., Davis, R.E., Sathyamoorthy, M., Wahl, L.M., Harris, E.D., Mikovits, J.A., Monks, A.P., Hollingshead, M.G., Sausville, E.A., Staudt, L.M. (2001): Genomicscale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2: research 0041.1 - research 0041.11.
- Lane, M.E., Yu, B., Rice, A., Lipson, K.E., Liang, C., Sun, L., Tang, C., McMahon, G., Pestell, R.G., Wadler, S. (2001): A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 61: 6170 - 6177.
- Lapenna, S., Giordano, A. (2009): Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Disc* 8: 547 – 566.

- Liao, J.J.-L. (2007): Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. *J Med Chem* 50: 409 – 424.
- Ljungman, M., Paulsen, M.T. (2001): The Cyclin – Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine Inhibits RNA Synthesis and Triggers Nuclear Accumulation of p53 That is Unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol Pharm* 60: 785 – 789.
- MacCallum, D.E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Lane, D.P., Green, S.R. (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II–Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 65: 5399 – 5407.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002): The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298: 1912 – 1934.
- Matranga, C.B., Shapiro, G.I. (2002): Selective sensitization of transformed cells to flavopiridol-induced apoptosis following recruitment to S-phase. *Cancer Res* 62: 1707 - 1717.
- McClue, S.J., Blake, D., Clarke, R., Cowan, A., Cummings, L., Fischer, P.M. (2002): In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* 102: 463 – 468.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong, J.P.J., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P. (1997): Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243: 527 – 536.
- Mgbonyebi, O.P., Russo, J., Russo, I.H. (1999): Roscovitine Induces Cell Death and Morphological Changes Indicative of Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 59: 1903 – 1910.
- Midgley, R., Kerr, D. (2005): Bevacizumab: current status and future directions. *Ann Oncol* 16: 999 – 1004.
- Misra, R.N., Xiao, H.Y., Kim, K.S., Lu, S., Han, W.C., Barbosa, S.A., Hunt, J.T., Rawlins, D.B., Shan, W., Ahmed, S.Z., Qian, L., Chen, B.C., Zhao, R., Bednarz, M.S., Kellar, K.A., Mulheron, J.G., Batorsky, R., Roongta, U., Kamath, A., Marathe, P., Ranadive, S.A., Sack, J.S., Tokarski, J.S., Pavletich, N., Lee, F.Y., Webster, K.R., Kimball, S.D. (2004): N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-

- 2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *J Med Chem* 47: 1719 - 1728.
- O'Connor, D.S., Wall, N.R., Porter, A.C.G., Altieri, D.C.(2002): A p34^{cdc2} survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2: 43 - 54.
- O'Mahony, D.J., Smith, S.D., Xie, W.Q., Rothblum, L.I. (1992): Analysis of the phosphorylation, DNA-binding and dimerization properties of the RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2. *Nucl Acid Res* 20: 1301 -1308.
- O'Mahony, D.J., Rothblum, L.I. (1991): Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3180 – 3184.
- Paprskářová, M., Kryštof, V., Jorda, R., Džubák, P., Hajdúch, M., Wešierska-Gądek, J., Strnad, M. (2009): Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *J Cel Biochem* 107: 428 – 437.
- 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.
- Pavletich, N.P. (1999): Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287: 821– 828.
- Pennati, M., Campbell, A.J., Curto, M., Binda, M., Cheng, Y.Z., Wang, L.Z., Curtin, N., Golding, B.T., Griffin, R.J., Hardcastle, I.R., Henderson, A., Zaffaroni, N., Newell, D.R. (2005): Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: A possible role for survivin down-regulation. *Mol Cancer Ther* 4: 1328 – 1337.
- Poznic, M. (2009): Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J Biosci* 34: 305 – 312.
- Savio, M., Cerri, M., Cazzalini, O., Perucca, P., Stivala, L., Pichierri, P., Franchitto, A.P., Meijer, L., Prosperi, E. (2006): Replication-Dependent DNA Damage Response Triggered by Roscovitine Induces an Uncoupling of DNA Replication proteins. *Cell Cycle* 5: 2153 – 2159.
- Shapiro, G.I. (2006): Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J clin oncol* 24: 1770 - 1783.

- Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.
- Schang, L.M., Rosenberg, A., Schaffer, P.A. (2000): Roscovitine, a Specific Inhibitor of Cellular Cyclin-Dependent Kinases, Inhibits Herpes Simplex Virus DNA Synthesis in the Presence of Viral Early Proteins. *J Virol* 74: 2107 – 2120.
- Schramm, L., Hernandez, N. (2002): Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16: 2593 - 2620.
- Schutte, B., Nieland, L., van Engeland, M., Henfling, M.E.R., Meijer, L., Ramaekers, F.C.S. (1997): The Effect of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Olomoucine on Cell Cycle Kinetics. *Exp Cell Res* 236: 4 – 15.
- Sirri, V., Roussel P., Hernandez-Verdun, D. (1999): The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J Cell Sci* 112: 3259 - 3268.
- Tuan, J.C., Zhai, W., Comai, L. (1999): Recruitment of TATA-Binding Protein–TAFI Complex SL1 to the Human Ribosomal DNA Promoter Is Mediated by the Carboxy-Terminal Activation Domain of Upstream Binding Factor (UBF) and Is Regulated by UBF Phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19: 2872 – 2879.
- Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M. (2007): Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 18: 977 – 984.
- Vandel, L., Kouzarides, T. (1999): Residues phosphorylated by TFIID are required for E2F-1 degradation during S-phase. *The EMBO Journal* 18: 4280 – 4291.
- Voit, R., Grummt, I. (2001): Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13631 – 13636.
- Voit, R., Hoffmann, M., Grummt, I. (1999): Phosphorylation by G1-specific cdk–cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO Journal* 18: 1891 – 1899.
- Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E., Grummt, I. (1995): Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucl Acid Res* 23: 2593 – 2599.

- Voit, R., Schäfer, K., Grummt, I. (1997): Mechanism of Repression of RNA Polymerase I Transcription by the Retinoblastoma Protein. *Mol Cell Biol* 17: 4230 – 4237.
- Wall, N.R., O'Connor, D.S., Plescia, J., Pommier, Y., Altieri, D.C. (2003): Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 63: 230 – 235.
- Węsierska-Gądek, J., Kryštof, V. (2009): Selective Cyclin – dependent Kinase Inhibitors Discriminating between Cell Cycle and Transcriptional Kinases Future Reality or Utopia? *Ann NY Acad Sci* 1171: 228 – 241.
- White, R.J. (2005): RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Mol Cell Biol* 6: 69 – 78.
- Whittaker, S.R., Walton, M.I., Garrett, M.D., Workman, P. (2004): The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 64: 262 – 272.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., Piwnica-Worms, H. (1994): Cyclin A/Cdk2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14: 8420 - 8431.
- Yap, T.A., Molife, L.R., Blagden, S.P., Bono, J.S. (2007): Targeting cell cycle kinases and kinesins in anticancer drug development. *Exp Opin Drug Discov* 2: 539 - 560.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

Apaf-1	apoptotic protease-activating factor
ATM	Ataxia-Telangiectasia
ATR	Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related
ATP	adenosintrifosfát
ARF	alternative reading frame product
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	hovězí sérový albumin
CAK	CDK-aktivační kináza
cdc	cell division cycle
CDK	cyklin-dependentní kináza
cIAP-1	baculoviral IAP repeat-containing 2
Cip/Kip	CDK-interacting protein/kinase inhibiting protein
CTD	carboxy terminal domain of RNA polymerase II
CYC	cyklin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E2F	transkripční faktor E2F
FITC	fluorescein isothiokyanát
HMG	high mobility group
H1	histone cluster 1
IAP	inhibitor of apoptosis
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace
INK4	inhibitor CDK4
Ki-67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
MAT1	ménage-à-trois 1
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1

MCM	minichromosome maintenance
MDM2	mouse double minute 2
mRNA	messenger RNA
MRP	multidrug resistance protein
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NHEJ	non-homologous end joining
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
p16 ^{INK4A}	CDK4 inhibitor p16-INK4A
p27 ^{Kip1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Rb	protein retinoblastomu
RAM/Px	rabitt anti mouse/peroxidase
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serin
SINES	short intespersed nuclear elements
siRNA	small interfering RNA
SL1	promoter-selectivity factor
snRNA	small nuclear RNA
SWAR/Px	swine anti rabitt/peroxidase
TAFs	three TBP-associated factors
TBP	TATA-binding protein
TBS	tris buffered saline
TEMED	tetramethylethylendiamin
TFIIIB	RNA polymerase III transcription initiation factor B
TFIIIC	general transcription factor IIIC
TFIIH	transcription factor IIH
Thr	threonin

TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transfer RNA
TTF-1	transcription termination factor 1
UBF	upstream binding factor
U6	RNA, U6 small nuclear
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wee-1	Wee-1 homolog
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis