

MOLECULAR INTERACTION OF PROTEIN P27, INHIBITOR OF CYCLIN DEPENDENT KINASES

MOLEKULÁRNÍ INTERAKCE PROTEINU P27, INHIBITORU CYKLIN DEPENDENTNÍCH KINÁZ

Čajánek L.¹, Dvořák P.², Hampl A.²

¹Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Česká republika

²Laboratoř molekulární embryologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: lukas.cajanek@post.cz

ABSTRACT

p27^{Kip1} is a member of a group of proteins called cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Thus, p27 has very important function in cell cycle regulation. As it was published, this regulator is highly expressed in many types of tissues. Currently, there is an evidence that p27 has some function unrelated to its role in regulation of G1/S transition. It is expected that p27 takes part in induction and/or maintenance of differentiation, in regulation of apoptosis or cell migration. While the regulatory role of p27 during G1 progression is well understood, molecular mechanisms of its function in differentiation, apoptosis and cell migration are still unclear. With relation to these data, we have analyzed interaction between p27 and p27-associated molecules in differentiated mouse embryonic stem cells and also in terminally differentiated tissues. We used two different experimental approaches to find and/or characterize these p27-associated molecules – *in vitro* binding assay and co-immunoprecipitation. Different associations were found in lysates prepared from different mouse organs. This fact is consistent with our hypothesis that p27 has different functions, with respect to the type of differentiated tissue. We also described an accumulation of some molecule associated to p27 in mouse embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. This fact supports the hypothesis that p27 has some new biological functions, probably independent of p27-function as cyclin-CDK inhibitor.

Keywords: p27^{Kip1}, cell cycle, differentiation

ABSTRAKT

Protein p27^{Kip1} (dále jen p27) patří mezi inhibitory cyklin dependentních kináz (CKI) a jako takový hraje zcela zásadní úlohu při regulaci buněčného cyklu. Vysoká hladina tohoto regulátoru byla popsána v celé řadě terminálně diferencovaných tkání. V poslední době se

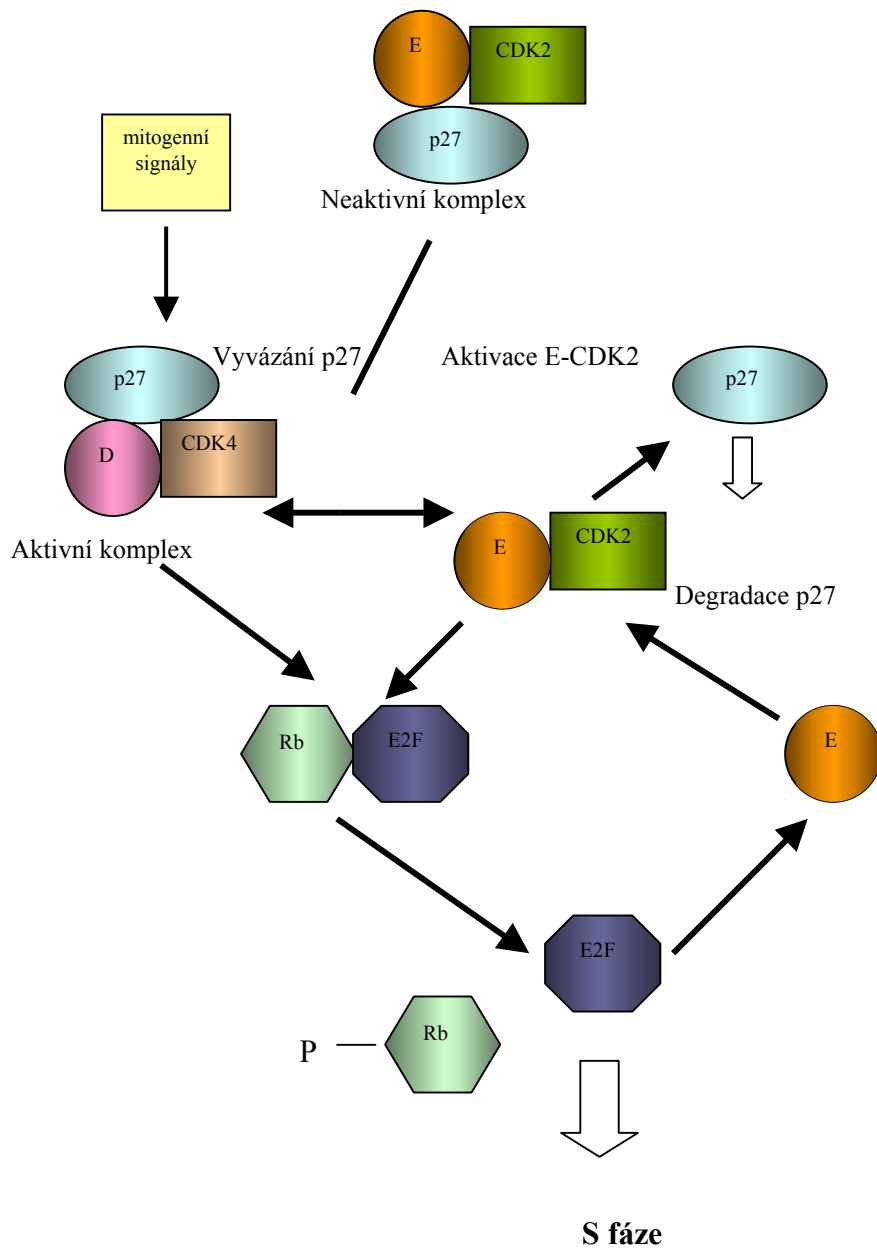
ovšem objevuje stále více údajů, které nasvědčují tomu, že biologická funkce p27 je mnohem komplexnější a nespočívá jen v udržování diferencovaných buněk v G0 fázi. Mezi další možné pole působnosti tohoto proteinu patří regulace diferenciačních procesů, apoptózy, případně dějů ovlivňujících buněčnou migraci a adhezivitu. V rámci této práce jsme se proto zabývali studiem interakcí p27 s jeho potenciálními asociačními partnery během diferenciace myších embryonálních kmenových buněk a také v terminálně diferencovaných tkáních. Využili jsme dvou základních přístupů – in vitro asociační analýzy s využitím rekombinantního p27 a izolace proteinových komplexů tvořených p27 a jeho asociačními partnery pomocí specifických protilátek. V jednotlivých lyzátech z myších orgánů jsme detekovali rozdílné molekuly asociující s p27 in vitro. Tento fakt podporuje naši teorii o dvojí úloze p27 v závislosti na daném typu terminálně diferencované tkáni. Nález molekuly asociující s p27 během diferenciace myších embryonálních buněk taktéž hovoří ve prospěch hypotézy o nové, na regulační aktivitě vůči komplexům cyklin – CDK nezávislé biologické funkci.

Klíčová slova: p27^{Kip1}, buněčný cyklus, diferenciace

ÚVOD

Buňka je základní stavební a funkční jednotka všech živých organismů. Vzhledem ke složitosti těla mnohobuněčných organismů je nutná precizní koordinace a řízení procesů, které v porovnání s jednobuněčnými organismy vyžadují určité omezení buněčné autonomie. Buněčný cyklus představuje sled událostí vedoucích od vzniku buňky až k jejímu rozdělení. Klíčovými událostmi v životě buňky jsou replikace jaderného genomu na dvě identické kopie (S-fáze) a mitotické dělení (M-fáze), kdy kopie genomu přechází do buňky dceřinné. Z důvodu nutnosti přesného provedení a energetické náročnosti obou procesů jsou replikace DNA a mitóza časově odděleny fázemi G1 a G2. Nové buňky vznikají po celý život daného organismu, čímž jednak přispívají k růstu těla, jednak k nahrazování buněk stárnoucích, již neplnících dostatečně své funkce. Během ontogeneze buňka prochází sledem změn, jejichž cílem je určitá funkční specializace. Tento proces se nazývá diferenciace.

Na regulaci proliferace a diferenciace se podílí široké spektrum molekul. Řada z nich se primárně uplatňuje při regulaci buněčného cyklu. Patří mezi ně také protein p27 z rodiny inhibitorů Cip/Kip. Nejlépe prostudovanou funkcí proteinů Cip/Kip je regulace aktivity cyklin dependentních kináz na rozmezí na přechodu mezi fázemi G1 a S. Současný model je schematicky znázorněn na Obrázku 1.



Obr. 1: Regulace přechodu G1/S. (podle Sherr a Roberts, 1999).

Mitogenní stimulace vede k expresi cyklinu D a následné aktivaci cyklin E-CDK2 díky titračnímu potenciálu cyklin D-CDK4/6 (komplex cyklin D-CDK4/6 má schopnost vázat protein p27 s mnohem vyšší afinitou než cyklin E-CDK2). Komplex cyklin D-CDK4/6-p27 je oproti E-CDK2-p27 enzymaticky aktivní, fosforyluje Rb a umožňuje tedy asociaci nově syntetizovaného cyklinu E s CDK2 tím, že vyvazuje p27. Fosforylace Rb vede k uvolnění transkripčních faktorů (např. E2F) a zahájení exprese genů nezbytných pro replikaci DNA a tedy vstupu do S fáze. Snížení koncentrace p27 umožňuje komplexu cyklin E-CDK2

fosforylovat nejen Rb, ale také právě p27 na treoninu 187 a tím spouštět jeho degradaci (Vlach et al., 1997). Zbytek molekul p27 zůstává vázán v komplexu s cyklin D-CDK4/6, v případě vymizení mitogenních signálů se zastavuje syntéza cyklinu a v konečném důsledku dojde k inhibici cyklin E-CDK2 a zastavení buněčného cyklu v G1 fázi.

Vysoká hladina p27 byla detekována v celé řadě terminálně diferencovaných tkáních. Zdá se pravděpodobné, že jeho úloha nespočívá pouze v udržování buněk v klidovém stádiu, ale v plnění mnohem sofistikovanějších funkcí během diferenciačních procesů. Role p27 během diferenciacce byla studována jak u celé řady buněčných modelů *in vitro*, tak *in vivo* porovnáváním standardních a p27- deficičních myší. Výsledky zmíněných experimentů často popisují významné postavení p27 při regulaci diferenciacce nebo apoptózy a také defekty spojené se ztrátou tohoto regulátoru. Konkrétně se p27 například uplatňuje jako induktor diferenciacce epitelálních buněk (Quaroni et al., 2000). Autoři této práce k tomuto závěru dospěli studiem vlivu vynucené exprese p16, p21 a p27 na proliferační a/nebo diferenciační potenciál použité buněčné linie. Zvýšená exprese těchto proteinů vedla ve všech případech k zastavení buněčného cyklu, ovšem u p21 a p27 ve spojení s expresí diferenciačních markerů.

METODIKA

1. Příprava rekombinantních proteinů:

cDNA myšího p27 naklonovaná do plazmidu λ EXlox(+)-mp27-FL byla amplifikována pomocí PCR, produkty PCR byly purifikovány pomocí kitu GENE CLEAN (Qbiogen) dle postupu uváděného výrobcem. Pro účely klonování byla izolovaná DNA a expresní vektor pET-30a (Novagen) štěpena restrikcí endonukleázami EcoRI a Not I (MBI Fermentas). Ligace inzertu a vektoru pET-30a byla provedena T4 DNA ligázou (MBI Fermentas). Takto připravené rekombinantní plazmidy byly transformovány do kompetentních bakterií metodou teplotního šoku. Transformované bakterie byly vysety na Petriho misky s LB agarom (kanamycin 30 μ g na ml).

Z úspěšně transformovaných bakterií byla připravena bakteriální kultura v 150 ml LB media (kanamycin 30 μ g na ml). Expres p27 byla indukována 1 mM IPTG (izopropyl β thiogalaktopyranozid) za nezměněných kultivačních podmínek po dobu 4 hodin. Bakteriální suspenze byla centrifugována (5000 rpm/ 5minut / 4°C), získaný pelet byl resuspendován ve vychlazeném lyzovacím pufru (500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄·2H₂O, upravit pH na 8, 0,1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid, 1 μ g na ml aprotininu, 1 μ g na ml leupeptinu, 10 μ g na ml inhibitoru trypsinu).

Buňky byly lyzovány sonikací (ultrazvukový homogenizátor Bandelin, Sonopuls) a centrifugovány (13000 rpm / 30 minut/ 4°C). Koncentrace proteinů v supernatantu byla stanovena pomocí soupravy DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) dle postupu uvedeného výrobcem. Rekombinantní p27 s polyhistidinovou značkou(6x His) byl izolován pomocí ProBond Resin (Invitrogen).

2. In vitro asociační analýza:

Vypreparované myší orgány byly opláchnuty PBS (pH = 7,4), homogenizovány a lyzovány v lyzovacím pufru (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P-40, upravit pH na 7,4, 0,1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid, 1 µg na ml aprotininu, 1 µg na ml leupeptinu, 10 µg na ml inhibitoru trypsinu, 10 µg na ml tosyl-L-fenylalaninu) na ledu po dobu 30 minut, poté centrifugovány (13000 rpm / 30 minut / 4°C). Supernatant obsahující extrahované proteiny byl uskladněn při -80°C do doby použití. Před experimentem bylo stanoveno celkové množství proteinů v lyzátu soupravou DC Protein Assay Kit a vzorky byly upraveny na stejnou koncentraci celkového proteinu.

K proteinovým extraktům byla nejprve přidána ProBond Resin, aby došlo k vychytání nespecificky interagujících proteinů. Takto upravený extrakt byl inkubován (4°C) s rekombinantním proteinem p27, imobilizovaným na zmíněnou afinitní matici. Interakce p27 ↔ proteiny tkáňového extraktu byly analyzovány pomocí denaturační polyakrylamidové gelové elektroforézy(SDS-PAGE). Proteiny v gelu byly obarveny stříbrem (Shevchenko et al., 1996).

3. Koimunoprecipitační analýza:

Proteinové extrakty upravené na stejnou koncentraci byly nejprve inkubovány s Protein A agarózovými částicemi (Sigma). K takto upraveným extraktům byla přidána protilátka vůči proteinu p27 (králičí protilátka sc-528 (Santa Cruz Biotechnology)). Po hodinové inkubaci při 4°C, byly k extraktům přidány Protein A agarózové částice. Inkubace celé směsi probíhala za stejných podmínek do druhého dne. Poté byly Protein A agarózové částice promyty lyzovacím puftrem, smíchány s Leammliho puftrem a takto připravené vzorky byly naneseny na denaturační polyakrylamidovou gelovou elektroforézu. Proteiny v gelu byly opět barveny stříbrem.

4. Kultivace myších embryonálních kmenových buněk a příprava embryoidních tělísek:

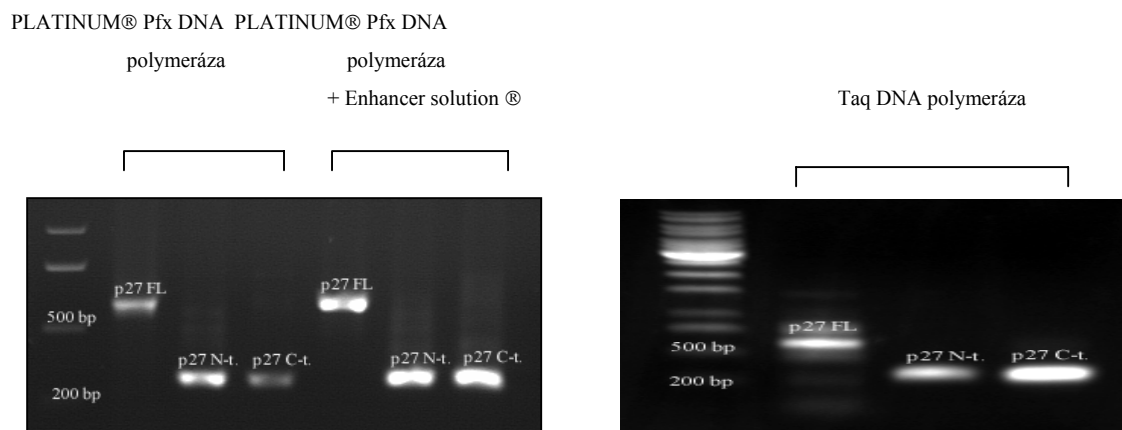
Nediferencované myší embryonální kmenové (mES) buňky byly kultivovány na poželatinovaných miskách v kompletním D-MEM médiu (Gibco) (20 % fetální telecí sérum, 100 mM nukleosidy, 0,05 mM β -merkapt ethanol, penicilin 100 i.u. na ml, streptomycin 0,1 mg na ml a 1000 U na ml leukemický inhibiční faktor (LIF)). Embryoidní tělíska byla připravena kultivací ES buněk v D-MEM médiu bez přídavku leukemického inhibičního faktoru na bakteriologických miskách bez možnosti adheze. Při experimentech byly použity linie mES 10 a 22 (p27^{-/-}) (Bryja et al., 2004b).

5. Myši standardního fenotypu a myši deficientní pro p27 (p27 „knockout“):

Myši deficientní v genu p27^{Kip1} (Fero et al., 1996) byly získány od Dr. Jamese M. Robertse (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA). Myši byly chovány a kříženy v chovném zařízení Laboratoře molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací. Tato metoda je v souladu s doporučením „Panel of Euthanasia“ Americké asociace veterinárního lékařství.

VÝSLEDKY

Proto pro posouzení biologické úlohy p27 v diferencovaných tkáních pomocí asociačních studií bylo našim cílem připravit rekombinantní formy p27 v expresním kmeni *E. coli* BL21 (DE3), a to jednak celý protein (p27 FL), jednak jeho N- koncovou (p27 N-t.) a C- koncovou část (p27 C-t). Navrhli jsme dvojice primerů a testovali různé amplifikační podmínky polymerázové řetězové reakce.). Použití Taq polymerázy se pro účely klonování neukázalo jako příliš vhodné, neboť při agarózové elektroforéze byla zjištěna přítomnost nespecifických PCR produktů. Na základě těchto pokusů byla pro další experimenty zvolena PLATINUM® Pfx DNA polymeráza v kombinaci s Enhancer solution® (vyšší účinnost PCR při zachování vysokého stupně specifičnosti).



Obr. 2: PCR amplifikace celé sekvence p27, jeho N-koncové a C-koncové části.

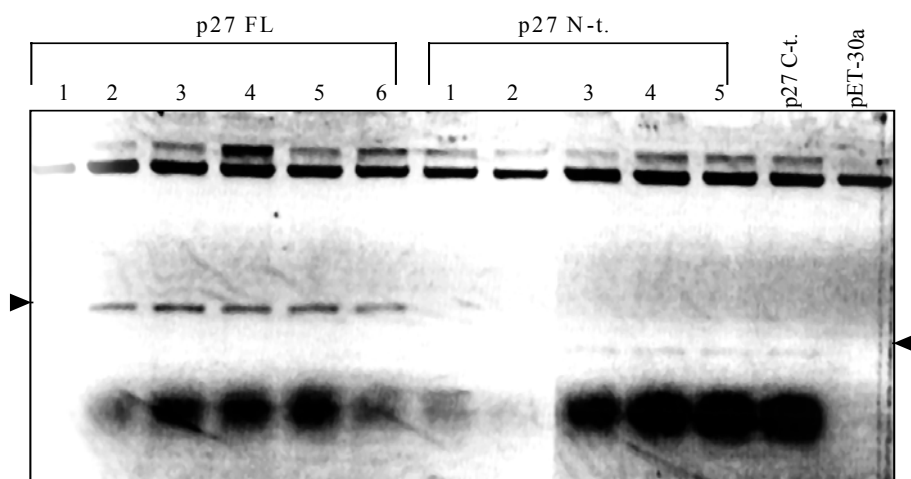
Produkty PCR byly eluovány z gelu a stejně jako vektor štěpeny restričními endonukleázami Eco RI a Not I. Kompetentní *E.coli* BL 21(DE3) byly transformovány ligační směsí upraveného vektoru s příslušnou inzertní sekvencí. Jako negativní kontrola úspěšnosti transformace byly použity kompetentní bakterie transformované linearizovaným vektorem pET -30a s upravenými 5' konci (30 minut s alkalickou fosfatázou) bez přítomnosti inzertu. Jako pozitivní kontroly úspěšné ligace a transformace byly vzaty bakterie transformované religovaným vektorem, respektive neštěpeným vektorem. Získané počty kolonií transformantů jsou uvedeny v Tabulce 1.

transformovaná DNA	počet kolonií
pET -30a-p27 FL	30
pET -30a-p27 N-t.	13
pET -30a-p27 C-t.	1
pET- 30a (upraveno alkalickou fosfatázou)	1
religovaný pET-30a	26
pET-30a ¹	>200

Tabulka 1. Transformace bakterií rekombinantním p27

¹ Transformace vektorem pET-30a bez inzertu (použit 1 μ l, c = 750 ng/ μ l), použito jako pozitivní kontroly přenosu DNA do kompetentních bakterií.

Z vybraných klonů (p27 FL 1-6, p27 N-t. 1-5, p27 C-t. 1) jsme izolovali plazmidovou DNA a štěpili pomocí EcoRI a NotI. Úspěšné začlenění klonované DNA do vektoru bylo potvrzeno u klonů p27 FL 1-6, p27 N-t. 3-5 a p27 C-t. 1. (viz. Obrázek. 3).



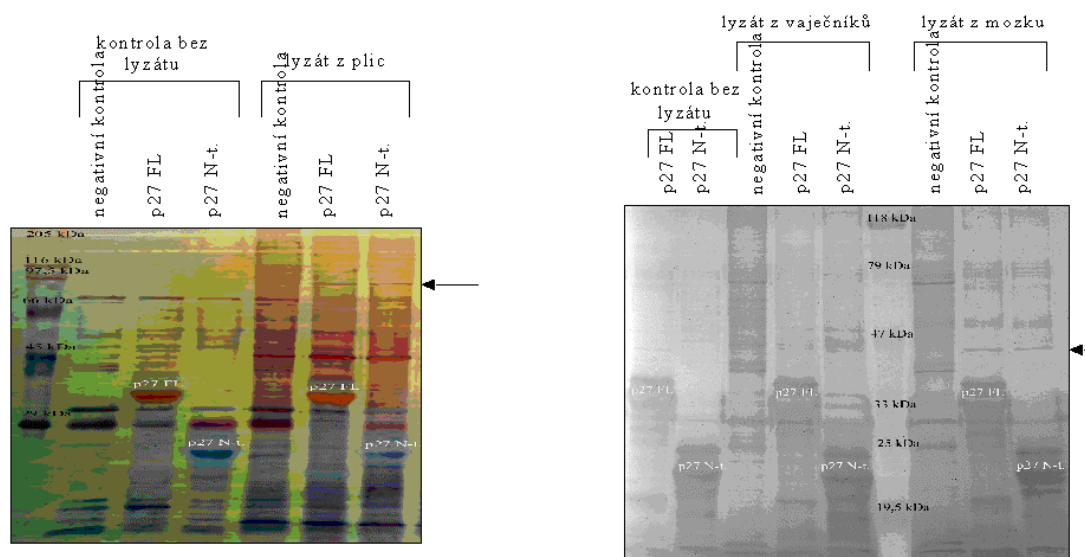
Obr. 3: Analýza plazmidové DNA izolované z transformovaných bakterií. Restrikční fragmenty byly separovány v 1 % agarózovém gelu..

Pro úplné ověření úspěšného klonování byla provedena sekvenční analýza v Laboratoři speciálních technik molekulární biologie (Laboratoř molekulární fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta MU) (klony p27 FL 1, p27 N-t. 4 a p27 C-t. 1). 100% shoda byla potvrzena v případě p27 FL 1 a p27 N-t., u p27 C-t. 1 se opakovaně nepodařilo sekvenci stanovit.

Skutečnost, že většina rekombinantního p27 je produkována v solubilní formě, umožnila využít přístupu izolace a purifikace pomocí IMAC za nativních podmínek. Jako optimální promývací podmínky jsme vyhodnotili kombinaci 20 mM imidazolu a 1 % TWEEN. Při těchto podmínkách bylo dosaženo dostatečné výtěžnosti ve spojení s přijatelným množstvím nespecificky se vázajících bakteriálních proteinů.

Pro posouzení role p27 v diferenciaci jsme navrhli experiment, který spočíval v analýze molekul interagujících s rekombinantním p27 *in vitro*. Pro sledování těchto interakcí jsme připravili proteinové extrakty myších orgánů, u nichž byla popsána vysoká hladina p27 *in vivo* (Bryja et. al, 2004a). Konkrétně byly připraveny tkáňové extrakty z plic, mozku, vaječníků a varlat. Z důvodu snahy o minimalizaci možných falešně pozitivních výsledků byly jako negativní kontroly vždy použity vzorky získané inkubací afinitní matrice s lyzátem bakterií neexprimujících rekombinantní p27 (vzhledem k detekci exprese p27 bez indukce IPTG byly použity bakterie BL 21(DE3) neobsahující daný rekombinantní plazmid). Takto

imobilizované bakteriální proteiny nespecificky interagující s afinitní matricí byly inkubovány s příslušným tkáňovým lyzátem stejným způsobem jako v případě imobilizovaného p27. Jak je patrné z Obrázku 4, tímto postupem byly vytipovány některé molekuly potenciálně asociující s p27, a to protein o molekulové hmotnosti cca. 40 kDa, interagující s p27 FL i p27 N-t. (mozek,) a dále protein o molekulové hmotnosti přibližně 95 kDa (plíce) interagující opět s p27 FL i p27 N-t.

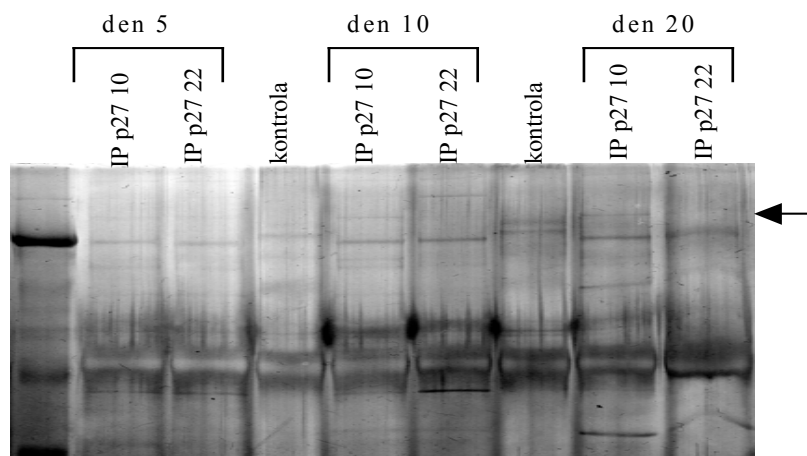


Obr. 4: Analýza asociujících molekul v tkáňových extraktech.

Na jednu asociační analýzu byl použit 1 mg celkového proteinu příslušného tkáňového extraktu, který byl inkubován s proteiny imobilizovanými na 10 μ l afinitní resin. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (10 % polyakrylamidový gel) a obarveny stříbrem.

Na základě výsledků získaných asociačními pokusy *in vitro* jsme se pokusili o izolaci partnerských molekul asociovaných s p27 v terminálně diferencovaných tkáních. Tímto přístupem se ovšem v tkáňových lyzátech izolovat p27 a/nebo asociované molekuly přes opakované pokusy nepodařilo.

Mnohem lepších výsledků jsme dosáhli při použití proteinových extraktů mES linií 10 a 22, diferencovaných do embryoidních tělísek. U linie 10 byl identifikován protein o molekulové hmotnosti cca. 125 kDa, jehož akumulace v komplexu s p27 se zvyšuje s postupující diferenciací (viz. Obrázek. 5).



Obr. 5: Imunoprecipitační analýza molekul asociovaných s p27 u mES linie 10.

Na IP reakci bylo použito 200 μg celkového proteinu získaného lyzí embryoidních tělísek v 5., 10. a 20. dni kultivace, 1 μg protilátky sc-528 a 5 μl Protein A – agarózových částic. Jako negativní kontrola byla použita mES linie 22 (p27^{-/-}). Kontrola bez lyzátu byla připravena z 1 μg protilátky a 5 μl Protein A – agarózových částic. Proteiny ve vzorcích byly separovány pomocí SDS – PAGE (10 % polyakrylamidový gel) a obarveny stříbrem.

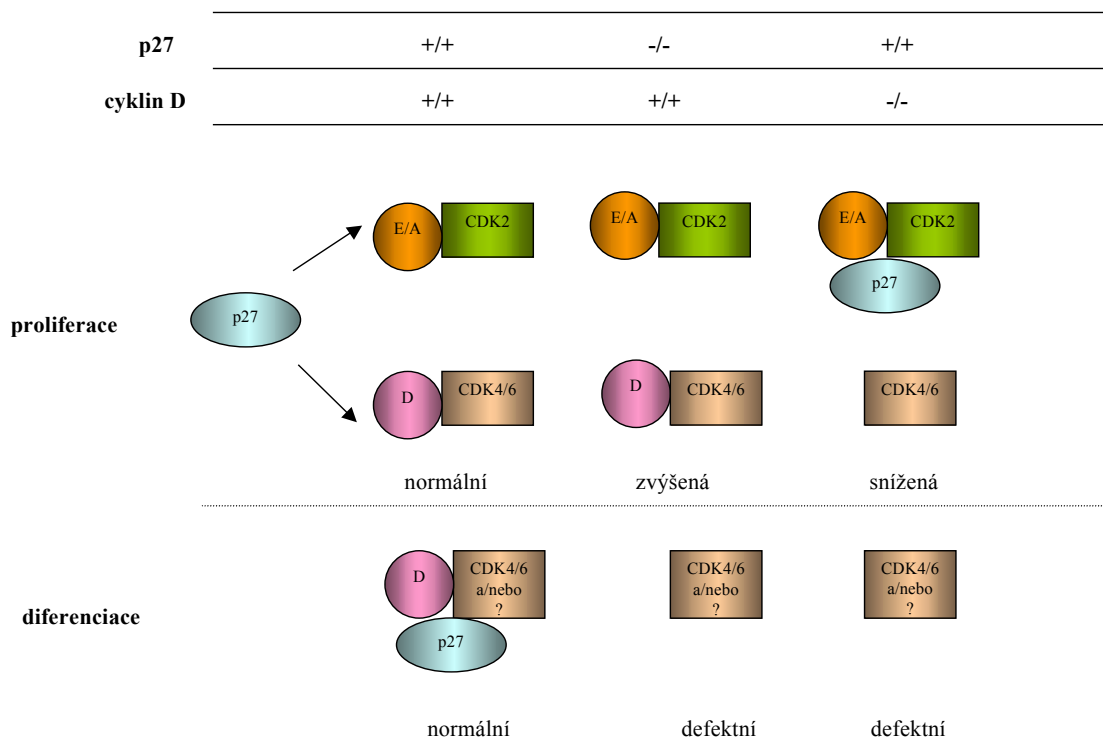
DISKUZE

Asociační analýzou byly detekovány některé molekuly asociující s p27 *in vitro*, a to protein o molekulové hmotnosti cca. 40 kDa¹, interagující s p27 FL i p27 N-t. (mozek) a dále protein o molekulové hmotnosti přibližně 95 kDa¹ (plíce) interagující opět s p27 FL i p27 N-t. Po potvrzení těchto výsledků by bylo vhodné potenciální asociační partnery analyzovat a identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

p27 as²ociující molekuly byly detekovány také koimunoprecipitační analýzou. V první fázi bylo našim cílem potvrzení výsledků získaných *in vitro* asociačním přístupem, proto jsme použili tkáňové extrakty připravené z p27^{+/+} a p27^{-/-} myši (plíce, mozek, varlata). Tímto způsobem se přes testování různých množství celkového proteinu použitého na reakci a různého množství protilátky izolovat asociující molekuly nepodařilo. Na vině byla zřejmě degradace cílových molekul a/nebo jejich proteolytické štěpení, čímž se jejich množství ve vzorku dostalo pod detekovatelnou úroveň. Lyzáty pro tyto analýzy byly vždy připraveny z vypreparovaných myších orgánů, které samozřejmě nejsou homogenní, ale jsou tvořeny mnoha buněčnými subpopulacemi, navíc často s vysokým podílem extracelulární matrix. Je tedy možné, že cílové molekuly byly v konečném proteinovém extraktu v natolik minoritní

¹ Udávané molekulové hmotnosti byly odhadnuty dle použitých hmotnostních standardů.

formě, že je nebylo možno detekovat zvoleným přístupem. Z těchto důvodů jsem přistoupil k analýze molekul asociujících s p27 během diferenciaci myších kmenových embryonálních buněk. Získané výsledky nasvědčují tomu, že p27 vytváří během diferenciaci komplex s proteinem o molekulové hmotnosti cca. 125 kDa¹ a množství tohoto komplexu s postupující diferenciací v buňce narůstá (viz. Obrázek. 5).



Obr. 6: Model dvojí role p27 (dle Bryja et al., 2004b)

Hlavní otázkou zůstává, jaký je biologický aspekt popsaných interakcí. V buněčném extraktu připraveném z plic byla detekována zcela jistě jiná asociující molekula než v případě vzorků připravených z mozku a varlat. Vzhledem k obrovské variabilitě mezi diferencovanými buněčnými typy není překvapením, že na vlastním procesu diferenciaci se nepodílí univerzální molekulární mechanismy, ale často procesy velmi specifické. Tyto děje ovšem vždy vedou ke stejnému cíli a tím je terminální diferenciaci spojená se zastavením buněčného cyklu. Molekuly účastníci se regulace proliferace a/nebo diferenciaci tak plní rozdílné funkce v závislosti na daném typu tkáně. Pro možnou dvojí úlohu p27 (viz. Obrázek

6) v diferencovaných tkáních hovoří výsledky *in vivo* experimentů na myších, sledujících vzájemnou provázanost mezi nárůstem hladiny p27 a cyklinů typu D (Bryja et al, 2004b). Autor zmíněné práce popisuje dva rozdílné fenomény ve vztahu mezi množstvím p27 a cyklinu D – u jedné skupiny orgánů je absence p27 spojena s nárůstem kinázové aktivity CDK 2, hladina cyklinů typu D se ztrátou p27 nijak výrazně nemění. U druhé skupiny naopak nepřítomnost p27 vede k výraznému poklesu hladiny cyklinů D2 a D3, kinázová aktivita CDK 2 zůstává i po ztrátě p27 na stejné úrovni.

Výsledky získané *in vitro* asociační analýzou tuto hypotézu potvrzují – mozek (40 kDa asociující molekula) patří dle zmíněného modelu mezi skupinu orgánů, u nichž ztráta p27 vede k prudkému nárůstu aktivity CDK 2. To je v souladu s „klasickou“ představou o funkci p27 jako regulátoru aktivity komplexu cyklin – CDK. (viz. Obrázek 1). Zvýšená aktivita cyklin E/A – CDK 2 tedy zvyšuje proliferační potenciál p27^{-/-} buněk určitého typu a je pravděpodobnou příčinou často pozorované hyperplazie (Fero et al, 1996, Nakayama et al, 1996.). Plíce (95 kDa asociující molekula) patří mezi orgány druhé skupiny, tj. bez nárůstu aktivity CDK 2, zato s poklesem hladiny cyklinů D. Funkce p27 zde tedy nespočívá jen v udržování buněk v G0 fázi díky vazbě na komplex cyklin E/A – CDK 2, aktivita tohoto komplexu je pravděpodobně regulována jinou CKI molekulou.

Také diferenciace mES je spojena se zvýšením množství jak Cip/Kip proteinů, tak cyklinů D. ES buňky mají velký proliferační potenciál. Podobně jako u některých nádorových linií byla u ES buněk popsána velmi nízká hladina hypofosforylovaného Rb, což vedlo k formulaci hypotézy, že u těchto buněk chybí klasický bod restrikce při přechodu mezi G1 a S (viz. přehledný článek Burdon et. al, 2002). Podle obecně uznávaného modelu je pak diferenciace mES spojena se zpomalováním buněčného cyklu vlivem CKI regulátorů, tedy i p27. Výsledky získané koimunoprecipitační analýzou ovšem hovoří spíše ve prospěch hypotézy, podle které plní p27 dvojí úlohu, tj. brzdí buněčný cyklus a/nebo spouští či udržuje diferenciaci: 1. Množství cyklin E – CDK2 asociovaného s p27 bylo u diferencujících mES pod hranicí citlivosti barvení proteinů stříbrem. 2. Byla detekována asociace s cca. 125 kDa¹ proteinem. Je tedy pravděpodobné, že většina z celkového množství p27 přítomného v buňce tvoří komplex právě s tímto proteinem a neúčastní se inhibice aktivity CDK 2.

ZÁVĚR

Předkládaná práce se snaží přispět k problematice regulační úlohy proteinu p27 během diferenciace za využití dvou odlišnými experimentálních přístupů, které vedly k detekci specifických interakcí p27. Doposud se ovšem nepodařilo tyto asociující molekuly

identifikovat. Jejich identifikace v blízké budoucnosti umožní další, mnohem detailnější studium nových funkcí p27.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bryja, V., Pachernik, J., Faldikova, L., Krejci, P., Pogue, R., Nevřiva, I., Dvorak, P. and Hampl, A. (2004a). The role of p27(Kip1) in maintaining the levels of D-type cyclins in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1691, 105-16.

Bryja, V., Pachernik, J., Soucek, K., Horvath, V., Dvorak, P. and Hampl, A. (2004b). Increased apoptosis in differentiating p27-deficient mouse embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci* 61, 1384-400.

Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 12, 432-8.

Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M. et al. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-44.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I. and Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-20.

Quaroni, A., Tian, J. Q., Seth, P. and Ap Rhys, C. (2000). p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1045-57.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-12.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-8.

Vlach, J., Hennecke, S. and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-44.