

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**Katedra fyziologie živočichů**

**Cirkadiánní regulace cyklu buněčného dělení  
a její poruchy**

Circadian regulation of cell cycle and its disorder

bakalářská práce

vedoucí: PharmDr. Alena Sumová, CSc.

Praha 2008

Pavel Houdek

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce PharmDr. Aleně Sumové, CSc. za nezměrnou trpělivost a neobyčejnou ochotu, kterou mi projevila, když jsem se potýkal s touto prací. Děkuji svým rodičům za dobré rady a vzornou péči, které se mi dostalo a vždy dostávalo.

## Obsah

<i>Abstrakt</i> .....	4
<i>Seznam použitých zkratk</i> .....	5
<i>Klíčová slova</i> .....	5
1. Úvod: Biologické rytmy .....	6
2. Cirkadiánní systém .....	6
2.1 Biologické hodiny .....	6
2.2 Suprachiasmatická jádra .....	6
2.3 Periferní oscilátory .....	7
3. Molekulární podstata biologických hodin .....	8
3.1 Schéma .....	8
3.2 Clock a Bmal1 .....	9
3.3 Per a Cry .....	10
3.4 CKIε .....	10
3.5 Rev-erba a Rora .....	11
4. Buněčný cyklus .....	11
4.1 Fáze buněčného cyklu .....	11
4.2 Kontrola buněčného cyklu .....	12
4.2.1 Restrikční bod a přechod z fáze G1 do fáze S .....	13
4.2.2 Kontrola vstupu do fáze S při poškození DNA .....	13
4.2.3 Přechod z fáze G2 do mitózy .....	15
4.2.4 Kontrola zahájení mitózy při poškození DNA .....	15
5. Cirkadiánní regulace buněčného cyklu .....	16
5.1 Regulace pomocí hodinami kontrolovaných genů .....	16
5.2 Interakce hodinových proteinů s regulátory buněčného cyklu .....	17
5.3 Nádorové bujení a chronoterapie .....	18
6. Závěr .....	20
<i>Seznam literatury</i> .....	21

## **Abstrakt**

Všechny organismy od jednobuněčných sinic po člověka vykazují rytmy v chování, fyziologických ukazatelích i v expresi genů. Nejlépe prostudované jsou mezi nimi rytmy cirkadiánní, tedy s periodou přibližně 24 hodin. Ústředním prvkem řízení cirkadiánních rytmů jsou suprachiasmatická jádra hypotalamu. Neurony těchto jader udržují cirkadiánní oscilace i v neperiodických podmínkách. Na molekulární úrovni jsou cirkadiánní rytmy řízeny expresí tzv. hodinových genů. Mechanismus oscilací v jejich expresi je tvořen transkripčně-translačními zpětnovazebnými smyčkami. Periferní tkáně také rytmicky přepisují hodinové geny, což tvoří základ jejich fyziologických cirkadiánních rytmů. Jednotlivé buněčné oscilátory jsou vůči sobě navzájem i vůči vnějšímu světelnému rytmu synchronizovány pomocí centrálního oscilátoru v suprachiasmatických jádrech. Cirkadiánní oscilace lze najít také v cyklu buněčné proliferace. Molekulární systém buněčného cyklu je na více místech propojen se systémem biologických hodin. Cílem této bakalářské práce je podat stručný přehled těchto propojení a uvést souvislost poruch časového řádu organismu se vznikem nádorového bujení a možnosti jeho terapie.

## **Abstract**

All organisms, from unicellular cyanobacteria to human, show rhythms in behavioural and physiological markers as well as in gene expression. Among them, the best known are the circadian rhythms, i.e. rhythms with approximately a 24-hour period. A pivotal element in control of circadian rhythms is a pair of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. Neurons of these nuclei maintain circadian oscillations even under non-periodical conditions. At the molecular level, the circadian rhythms are controlled by expression of so-called clock genes. A mechanism generating the expression oscillations is composed of transcriptional-translational feedback loops. Clock genes are expressed rhythmically also in cells of peripheral tissues forming thus a basis of physiological circadian rhythms. The single cell oscillators are synchronized with each other as well as with the external light/dark rhythm by means of the central oscillator in suprachiasmatic nuclei. The circadian oscillations are pronounced also in cell cycle and proliferation. The molecular system of cell cycle is interconnected to the biological clock system by multiple links. The aim of this bachelor thesis is to give a summary of these connections, of the relationship between malfunctions in the circadian system and tumorigenesis and of the possibilities of its therapy.

## Seznam použitých zkratk

ATM	ataxia telangiectasia mutated (mutace genu způsobuje tuto chorobu)
ATR	ATM and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
Bcl-xL	B-cell lymphoma
bHLH motiv	basic helix-loop-helix motif
Bmal1	brain and muscle ARNT-like 1
c-Myc	buněčný (cellular) homolog virového v-Myc (myelocytomatosis viral oncogene)
Cdc25	cell-division cycle 25
CDK	cyclin-dependent kinase
Cip/Kip	Cdk interacting protein/kinase inhibitory protein
CKI $\epsilon$	casein kinase I $\epsilon$
Cry	cryptochrome
dmSCN	dorsomediální část suprachiasmatického jádra
Gadd45 $\alpha$	growth arrest and DNA damage 45 $\alpha$
Chk1, Chk2	checkpoint kinase
MDM2	murine double minute
Myt1	myelin trancription factor 1
NPAS2	neuronal PAS domain protein 2
PAS doména	podle proteinů, v nichž byla objevena: PER, ARNT, SIM
Per	period
pRB	protein objevený v retinoblastomu
Rev-Erb $\alpha$	gen byl nalezen na antisense řetězci kódujícím gen Erb/alfa/
RevRE	Rev-Erb $\alpha$ response element
Ror $\alpha$	retinoic acid receptor-related orphan receptor $\alpha$
SCN	suprachiasmatic nuclei
Tim	homolog genu Timeless popsaného u drozofily
vlSCN	ventrolaterální část suprachiasmatického jádra
Wee1	od wee = malý, buňky s mutací ve Wee1 byly menší

## Klíčová slova:

biologické hodiny, suprachiasmatická jádra, hodinové geny, buněčný cyklus, kontrolní uzly, rakovina, protoonkogeny, chronoterapie

## Key words:

biological clock, suprachiasmatic nuclei, clock genes, cell cycle, checkpoints, cancer, protooncogenes, chronotherapy

# 1. Úvod: Biologické rytmy

Podmínky pro život organismů v biosféře se mění. Některé z nich se mění a opakují periodicky a tomu se živé organismy přizpůsobily vyvinutím biologických hodin. Ty jim umožňují pravidelně se měnící životní podmínky předjímat a připravit se na ně. U živých organismů jsme tak schopni pozorovat a měřit mnohé fyziologické, metabolické a behaviorální rytmy. Tyto rytmy rozdělujeme podle délky periody na

a) ultradiánní, jejichž perioda je výrazně kratší než 24 hodin (například činnost srdce, plic, nervová aktivita);

b) cirkadiánní, jejichž perioda je přibližně 24 hodin (například cyklus spánku a bdění, příjem potravy, pohybová aktivita, hladina hormonů v krvi a exprese mnoha genů);

c) infradiánní, jejichž perioda je výrazně delší než 24 hodin (například estrální a menstruační cyklus, hibernace, respektive estivace) (shrnutí v Illnerová, 1995).

Ve své práci se budu zabývat pouze rytmy cirkadiánními a uvedu jejich souvislost s časovou regulací cyklu buněčného dělení.

## 2. Cirkadiánní systém

### 2.1 Biologické hodiny

Biologické hodiny mají charakter vnitřního oscilátoru. To znamená, že jím indukované rytmy jsou endogenního původu a přetrvávají i ve zcela neperiodickém prostředí, například ve stálé tmě. V takovém prostředí pak oscilují podle své vnitřní periody  $\tau$ , která je pouze přibližně 24 hodin. Podle toho, zda je  $\tau$  kratší či delší než 24 hodin, pak organismus vypuštěný do stálé tmy začíná svůj subjektivní den buď stále časněji, nebo stále později (shrnutí v Hastings, 1997). V přírodě se biologické hodiny synchronizují s objektivním časem především pomocí denního světla (Daan et Pittendrigh, 1976), dále také pohybovou aktivitou, teplotou okolního prostředí, sociální interakcí, příjmem potravy nebo farmakologicky účinnými látkami.

### 2.2 Suprachiasmatická jádra

Biologické hodiny pozorujeme u všech světlocitlivých druhů organismů, od cyanobakterií po savce (shrnutí v Schibler, 2005). U savců je vnitřní oscilátor, neboli pacemaker, uložen v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu. Pokud savčí organismus podrobíme lézi SCN, přestane tento vykazovat rytmy, včetně pohybové aktivity (Stephan *et* Zucker, 1972). Jedná se o párový orgán uložený laterálně III. mozkové komory

nad optickým chiasma. Každé z obou jader obsahuje přibližně 10 000 neuronů a dělíme je na dorzomediální (dmSCN) a ventrolaterální (vlSCN) část. Charakteristikami obou částí je produkce odlišných hormonů: pro dmSCN je to arginin-vasopresin, pro vlSCN vazointestinální peptid. Obě části shodně produkují  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (Abrahamson *et Moore*, 2001).

Experimenty ukázaly, že každý jeden neuron SCN je samostatným oscilátorem s různou periodou  $\tau$ . Jednotný výstupní cirkadiánní rytmus vzniká až na úrovni neuronální sítě (Welsh *et al.*, 1995). Hlavním synchronizátorem SCN s vnějším prostředím je světlo. Fotorecepce denního světla probíhá na buňkách sítnice. Jsou do ní zapojeny tyčinky, čípky a gangliové buňky, které syntetizují pigment melanopsin. Biologické hodiny tak mohou být seřizovány i v případě slepoty z důvodu nefukčních tyčinek a čípků, a to pomocí percepce světla gangliovými buňkami (Panda *et al.*, 2003).

Do SCN je informace o recepci světla na sítnici vedena dvěma cestami. Ze sítnice vede přímé nervové spojení do SCN přes retinohypotalamický trakt. Druhá cesta vede ze sítnice přes intergenikulární lístek v talamu a odtud takto nepřímou do SCN tzv. genikulohypotalamickým traktem. Třetí cesta přivádějící informace do SCN je rovněž nepřímá a vede z raphe nucleí (shrnutí v Morin *et Allen*, 2005). Pomocí této dráhy je SCN informováno o změně vnějšího prostředí nesvětelnými signály.

Výstupní dráhy ze SCN vedou do ostatních částí hypotalamu a do dalších oblastí mozku a míchy. Cirkadiánní rytmy ze SCN řídí také výlev melatoninu do krve v šišince. Jeho hladina v krvi výrazně stoupá během subjektivní noci a je naopak velmi nízká během subjektivního dne. Melatonin tedy přenáší v těle informaci o vnitřním biologickém čase (Illnerová *et Vaněček*, 1985).

### **2.3 Periferní oscilátory**

Bylo zjištěno, že vnitřní oscilátor není uložen pouze v neuronech SCN, nýbrž i v buňkách mnohých periferních tkání. Expresce hodinových genů (viz níže) byla prokázána mimo SCN i v dalších částech mozku, v sítnici, srdci, játrech, plicích, ledvinách, kosterním svalstvu a jiných periferních tkáních. Když byly tyto tkáně izolovány *in vitro*, udržely svůj rytmus ještě přibližně 3 cykly a poté se jeho amplituda již stala nečitelnou. (shrnutí v Reppert *et Weaver*, 2001) Ukázalo se, že na buněčné úrovni běží oscilace dále, ale jednotlivé buněčné oscilátory se vzájemně rozešly a jejich rytmy na úrovni tkáně proto nebyly zřetelné. Centrální oscilátor v SCN je tedy nutný pro vzájemnou synchronizaci periferních oscilátorů, nikoliv pro udržení jejich oscilací (Yoo, 2004).

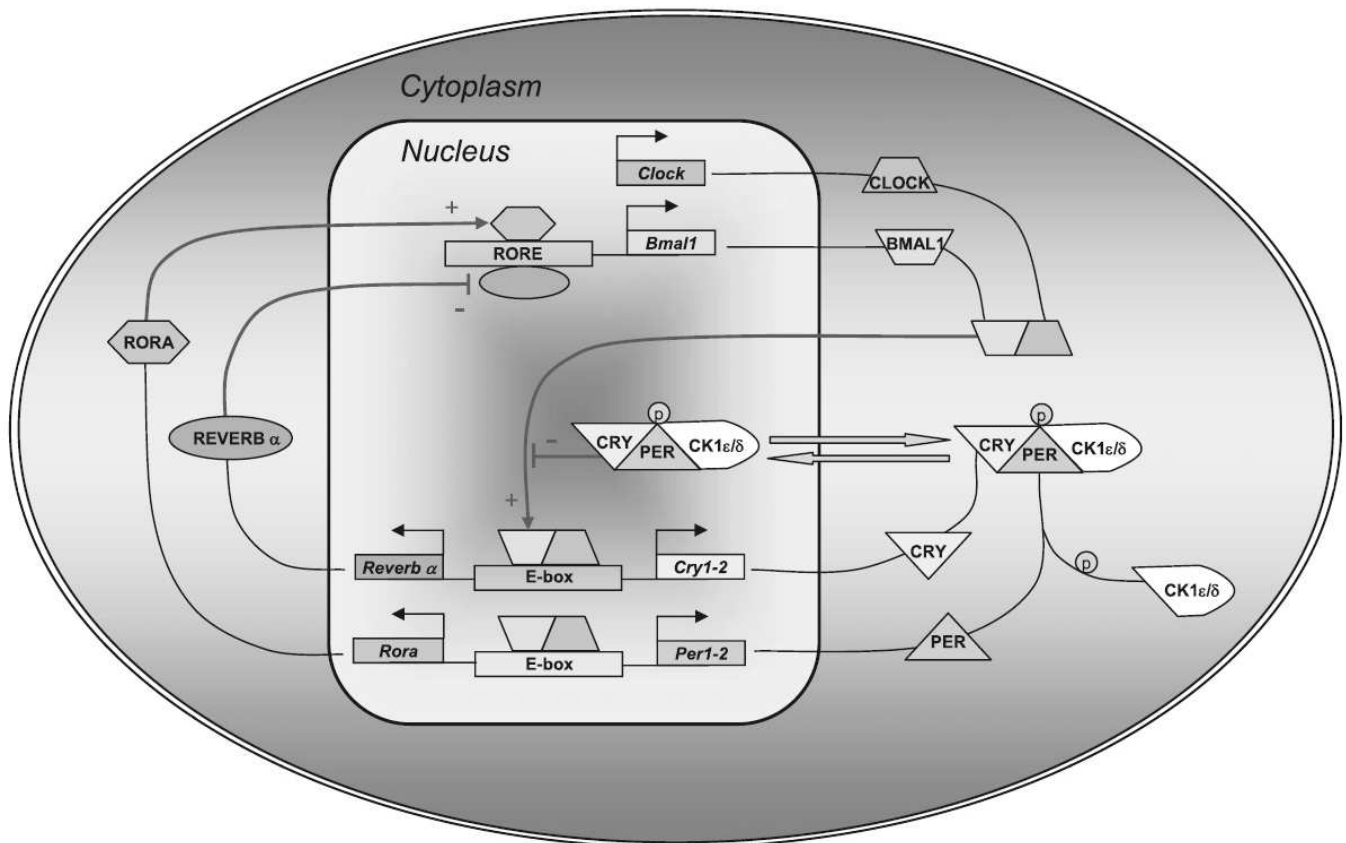
Periferní oscilátory nejsou ve stejné fázi jako centrální, bývají o 3 až 9 hodin opožděné. Na jejich synchronizaci se také významnou měrou podílí načasování příjmu potravy. Jakým způsobem je předávána informace o vnitřním biologickém čase z centrálního k periferním oscilátorům, zatím není známo. Patrně se jedná o kombinaci signálu neuronálního i humorálního. (shrnutí v Schibler *et al.*, 2003)

### 3. Molekulární podstata biologických hodin

#### 3.1 Schéma

Jak již bylo zmíněno dříve, je tedy každá nervová buňka suprachiasmatického jádra, a také buňky mnoha periferních tkání, samostatným oscilátorem. Molekulární podstata oscilací v těchto buňkách tkví v produktech tzv. hodinových genů. Řadíme k nim geny *Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry*, *Rev-erba*, *Rora* a *CKIε*. Oscilace vznikají v důsledku nejméně dvou transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček. Na počátku první z nich stojí proteiny *CLOCK* a *BMAL1*, které zastávají funkci pozitivní části smyčky (viz příložené schéma níže). Tyto dva proteiny spolu tvoří heterodimery a působí jako pozitivní transkripční faktory genů *Per* a *Cry*, jejichž mRNA dosahuje maximální koncentrace v polovině subjektivního dne (Gekakis *et al.*, 1998). Koncentrace samotných proteinů *PER* a *CRY* je nejvyšší koncem subjektivního dne. Proteiny *PER* a *CRY* spolu také tvoří heterodimer a interagují s dimerem *CLOCK:BMAL1*, čímž působí jako negativní faktor své vlastní transkripce. Koncentrace dimeru *PER:CRY* je za subjektivní noci nízká. Ve druhé transkripčně-translační smyčce dimer *CLOCK:BMAL1* aktivuje přepis genu *Rev-erba*, který zpětně negativně ovlivňuje přepis genu *Bmal1*. (shrnutí v Reppert *et Weaver*, 2001) Koncentrace *BMAL1* je tedy během subjektivního dne nízká a stoupá až za subjektivní noci, kdy přestávají působit inhibitory *PER:CRY* a *REV-ERBα*. *Bmal1* je tedy vždy exprimován v opačné fázi cyklu než *Per* a *Cry*. *BMAL1* ve vysoké koncentraci opět vytvoří heterodimery s molekulou *CLOCKu* a tím je smyčka uzavřena.





Schema molekulárního mechanismu biologických hodin. Převzato z Guilding *et Piggins*, 2007.

### 3.2 Clock a Bmal1

Oba proteiny CLOCK i BMAL1 obsahují tzv. PAS doménu, která jim umožňuje tvořit společný heterodimer. Teprve po jeho zformování vstupují do jádra, kde se vážou k DNA a regulují transkripci dalších genů. Na DNA se však vážou pomocí bLHL vazebného motivu pouze k tzv. E-boxům, speciálním enhancerovým sekvencím (5'-CACGTG-3').

V buňkách SCN nebyla zjištěna žádná rytmicita v expresi genu Clock, je tedy v SCN vytvářen konstantně, nebo osciluje pouze slabě (Sumová *et al.*, 2003). V některých periferních tkáních však jeho rytmická exprese naměřena byla (Kennaway *et al.*, 2003). Protein CLOCK je schopen tvořit heterodimery s BMAL1 i bez fosforylace, ale k interakci s dalšími proteiny je fosforylace nutná (Lee *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že myši s mutací v genu Clock nevykazují rytmus v expresi ani jiných hodinových genů (Jin *et al.*, 1999). Přesto se vyskytly pochybnosti, zda není význam genu Clock v cirkadiálním systému silně přeceněný, neboť i Clock-mutantní myši si zachovávají rytmus v pohybové aktivitě (Debruyne J. P. a spol., 2006). Ukazuje se však, že ztráta funkce genu Clock může být kompenzována jeho homologem NPAS2 (Bertolucci *et al.*, 2008).

Protein BMAL1 oproti CLOCKu vykazuje jasné cirkadiální oscilace s maximem za subjektivní noci. Společně s CLOCKem indukují transkripci genů Per, Cry, Rev-erba a

dalších hodinami kontrolovaných genů po navázání do oblasti jejich promotorů, čímž se zásadním způsobem podílejí na tvorbě pozorovatelných cirkadiálních rytmů (Gekakis *et al.*, 1998). Pokusy s Bmal1-mutantními myši ukázaly, že tento gen je pro systém biologických hodin nepostradatelný, jelikož tyto myši přestaly ve stálé tmě vykazovat jakýkoliv rytmus (Bunger *et al.*, 2000).

### 3.3 Per a Cry

Jak proteiny PER, tak proteiny CRY mají PAS doménu, díky níž mohou tvořit homo- a heterodimery. V heterodimeru pak vstupují do jádra, interagují s heterodimerem CLOCK:BMAL1 a negativně tak ovlivňují svou vlastní transkripci (shrnutí v Reppert *et Weaver*, 2001). Stejně tak negativně zasahují do transkripce dalších hodinových i hodinami kontrolovaných genů. Jejich exprese je vysoká během subjektivního dne a nízká během subjektivní noci.

V savčím genomu byly nalezeny tři Per geny, které jsou vzájemně homologní: Per1, Per2 a Per3. Per1 a Per2 jsou považovány za geny nezbytné pro chod hodin, protože jejich mutace vede k vážnému narušení rytmu v pohybové aktivitě. Oproti tomu mutace v Per3 nevedla k žádným významným změnám v rytmicitě a není tedy považován za esenciální pro správnou funkci biologických hodin (Shearman *et al.*, 2000). Dále bylo zjištěno, že Per1 se podílí na synchronizaci hodin světelným pulzem (Shigeyoshi *et al.*, 1997).

Jsou známé dva savčí geny Cry: Cry1 a Cry2. Geny Cry jsou ortologem ke genu Cryptochrome, který v rostlinách i v octomilce zastává funkci fotoreceptoru (shrnutí v Cashmore *et al.*, 1999). Jejich roli v cirkadiálním systému vidíme v tom, že pomáhají proteinům PER při vstupu do jádra, podporují jejich stabilitu a částečně je chrání před ubiquitinylací a degradací v proteazomu. Delece obou genů vede při vypuštění zvířat do stálé tmy k okamžitému rozrušení rytmu pohybové aktivity, proto jsou považovány za geny nezbytné pro funkci biologických hodin (Vitaterna *et al.*, 1999). Jestliže je deletován pouze gen Cry1, zůstanou sice rytmy zachovány, ale zkrátí se jejich perioda. Je-li deletován gen Cry2, perioda rytmů se naopak prodlouží (van der Horst *et al.*, 1999).

### 3.4 CKI $\epsilon$

Kasein kináza  $\epsilon$  je důležitou kinázou cirkadiálního systému serin/threoninového typu. Fosforyluje proteiny PER a tím reguluje rychlost jejich akumulace v cytoplazmě, potažmo délku periody cirkadiálních cyklů. Fosforylovaný PER se rychleji ubiquitinyluje a je tedy rychleji odbouráván v proteazomu (Vielhaber *et al.*, 2000). Pokud je CKI $\epsilon$  mutována a nefosforyluje PER dost výkonně, vstupuje tento dříve do jádra a celá denní perioda je

zkrácena (mutace  $\tau$ ) (Ralph *et Menaker*, 1988). Podobně mutace genu *Per2* v místě fosforylace kinázou vede k horšímu rozpoznávání proteinu kinázou a může mít podobné důsledky jako mutace genu samotné kinázy. Tato mutace byla rozpoznána jako příčina syndromu předsunuté fáze spánku (Toh *et al.*, 2001). Samotná kasein kináza nevykazuje žádnou cirkadiánní rytmicitu. Na regulaci cirkadiánního systému se rovněž účastní homologní kasein kináza  $\delta$ , která má podobné funkce (Lee *et al.*, 2001).

### 3.5 Rev-erba a Rora

Gen *Rev-erba* i gen *Rora* patří do skupiny tzv. sirotčích receptorů (anglicky orphan receptors), což znamená, že jsou monomerními jadernými receptory, které ke své funkci transkripčních faktorů nepotřebují žádný další ligand. Oba geny působí v regulační oblasti promotoru zvané *RevRE*, které obsahují sekvenci 5'-AGGTCA-3' (Harding *et Lazar*, 1993). *RevRE* sekvence se vyskytují v promotoru genu *Bmal1*, jehož transkripce je oběma geny regulována. *ROR $\alpha$*  na ni působí pozitivně, *Rev-erba* negativně (Akashi *et Takumi*, 2005). Samotný *Rev-erba* má ve svém promotoru sekvenci *E-box* a jeho exprese je tedy aktivována dimerem *CLOCK:BMAL1* a inhibována proteiny *PER* a *CRY*, čímž se uzavírá další vedlejší negativní smyčka cirkadiánního systému. Exprese proteinu *REV-ERB $\alpha$*  vykazuje významné cirkadiánní oscilace s maximem za subjektivního dne (Triqueneaux *et al.*, 2004).

## 4. Buněčný cyklus

### 4.1 Fáze buněčného cyklu

Má-li se buňka rozmnožovat, zdvojnásobí obvykle svůj objem a následně se rozdělí ve dvě buňky dceřinné. Tento proces nazýváme buněčný cyklus a dělíme jej do čtyř fází: *G1*, *S*, *G2* a *M* (ve zvláštních případech ještě i *G0*). K postupu těmito fázemi je zapotřebí exprese mnoha genů a fosforylace a degradace jejich proteinových produktů, kterou řídí cyklin-dependentní kinázy (CDK). Koncentrace CDK v buňce je neměnná, jejich aktivita však závisí na přítomnosti cyklinů, s nimiž tvoří komplexy. Koncentrace jednotlivých cyklinů v buňce silně kolísá podle toho, jak buňka prochází buněčným cyklem a která fáze právě probíhá. Obecně, koncentrace daného cyklinu je po většinu buněčného cyklu velmi nízká, v určitém bodě však začne stoupat a jakmile překročí kritickou hranici, spustí v buňce rychlé a nevratné změny, které ji přesunou do následující fáze buněčného cyklu. Do celého procesu jsou také včleněny tzv. kontrolní uzly, které jsou schopny postup cyklem pozastavit, dokud nejsou dokončeny klíčové úkony předcházející fáze (Hartwell *et Weinert*, 1989), například replikace DNA, nebo pokud je DNA poškozena.

Ve fázi G1 (předsyntetické) buňka roste a zvyšuje počet svých organel. Také vyhodnocuje vnější podmínky, a pokud jsou příznivé, podstoupí další buněčný cyklus. V mnohobuněčném organismu se příznivými podmínkami rozumí spíše dostatek mitogenů a růstových faktorů. Pokud jich dostatek není, nebo to vyžaduje diferenciaci buňky, nezapojí se buňka dále do buněčného cyklu a zůstává v tzv. fázi G0. Tento kontrolní uzel se nazývá restriční bod. Další kontrolní uzel zablokuje vstup do S fáze, pokud vnitřní kontrolní mechanismy signalizují poškození DNA. V pozdní fázi G1 stoupá v reakci na mitogenní podněty koncentrace cyklinu D (jedná se o cykliny D1, D2 a D3), který vytváří komplex s kinázami CDK4 a CDK6. Jejich aktivitou dojde ke zvýšení exprese cyklinu E (E1 a E2), který vytváří komplex s CDK2. Tento komplex je potřebný pro přechod buňky z fáze G1 do fáze S.

Ve fázi S (syntetické) buňka replikuje svoji DNA. Je to nejdůležitější a nejnáročnější fáze buněčného cyklu. Syntéza DNA je řízena komplexem CDK2 a cyklinu A (A1 a A2), který je přepisován díky působení komplexu CDK2/cyklin E. Ve fázi S je také zabudován kontrolní uzel, který zpomalí replikaci, je-li DNA poškozena.

Fáze G2 (postsyntetická) bývá poměrně krátká a buňka v ní ještě dále roste. Cyklin A má stále vysokou koncentraci, ale komplex tvoří s CDK1. Před vstupem do M fáze leží kontrolní uzel, který zaručuje, že do mitózy vstoupí buňka se zcela zreplikovanou a nepoškozenou DNA.

Během fáze M (mitotické) se buňka rozdělí (s výjimkou pohlavních) ve dvě buňky dceřinné s identickou genetickou informací. Na konci mitotické metafáze se nachází poslední kontrolní uzel, který nenechá přejít mitózu do anafáze, dokud nejsou všechny chromozomy správně připevněny na dělicí vřeténko. Vstup do mitózy řídí komplex CDK1/cyklin B (B1, B2 a B3). Před začátkem anafáze je však cyklin B rozložen. Následný počátek fáze G1 se vyznačuje útlumem aktivity CDK (shrnutí v Israels *et* Israels, 2001).

## **4.2 Kontrola buněčného cyklu**

Bylo již řečeno, že základním prvkem řízení buněčného cyklu jsou cyklin-dependentní kinázy. CDK jsou serin/threoninové kinázy, které vykonávají svoji funkci až v komplexu s cyklinem. Jejich aktivita však není regulována pouze navázáním různých cyklinů, ale i načasováním proteolytické degradace cyklinů fosforylací, která může komplex aktivovat i inhibovat, a přímou interakcí s dalšími proteinovými regulátory, které mohou činnost komplexu efektivně inhibovat (shrnutí v Garrett, 2001).

Z rozsáhlé látky řízení buněčného cyklu vyjímám v následujícím pouze údaje relevantní k mému tématu.

#### **4.2.1 Restrikční bod a přechod z fáze G1 do fáze S**

Nejdůležitějším místem kontroly buněčného cyklu je restrikční bod G0. V tomto bodě se rozhoduje, zda vůbec buňka další dělení podstoupí, narozdíl od dalších kontrolních uzlů, kde už se může průchod buněčným cyklem pouze pozdržet, příp. může být zahájena apoptóza. Buňka přijímá vnější podněty k růstu a dělení skrze membránové receptory, vede je pomocí signálních drah a informaci shromažďuje v podobě stoupající koncentrace cyklinu D (shrnutí v Sherr, 1995). Když jejich koncentrace přestoupí určitou mez, buňka zahájí další buněčný cyklus. Cyklin D částečně aktivuje CDK tím, že s ní vytvoří komplex. Plná aktivace CDK je pak umožněna její fosforylací Cdk-aktivující kinázou (Harper *et al.*, 1998).

Pro zahájení přestupu buňky z fáze G1 do fáze S je klíčový cyklin E. Jeho expresi kontroluje transkripční faktor E2F. Ten již je v buňce přítomen, je ale inhibován interakcí s proteiny rodiny RB, tj. pRb, p107 a p130 (Chellappan *et al.*, 1991). Aktivní komplexy CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D fosforylují proteiny RB, které tímto změni konformaci a přestávají inhibovat E2F (Hinds *et al.*, 1992). Uvolněný E2F indukuje transkripci cyklinu E a dokonce i svou vlastní, čímž vzniká pozitivní zpětná vazba. Vznikající komplexy CDK2/cyklin E mohou také fosforylovat proteiny RB a tím dále zpětnovazebně posilovat transkripci cyklinu E. E2F indukuje také transkripci fosfatázy Cdc25A, která odstraňuje inhibiční fosfáty z CDK2 a tím zvyšuje její aktivitu. Komplex CDK2/cyklin E může být také inhibován proteinem p21 z rodiny inhibitorů cyklin-dependetních kináz Cip/Kip. O tento inhibitor mohou kompetovat komplexy CDK/cyklin D a tím napomáhat zvýšení koncentrace aktivních CDK2/cyklin E (Lundberg *et al.*, 1998).

V iniciaci buněčného cyklu může hrát také důležitou roli gen c-Myc. Bylo pozorováno, že pokud je jeho koncentrace v buňce zvýšená, zvyšuje se rovněž exprese cyklinu D1, D2 a E, dále fosfatázy Cdc25A a CDK4, a naopak se snižuje účinnost proteinu p27, který inhibuje CDK (Daksis *et al.*, 1994; Pérez-Roger *et al.*, 1997; Galaktionov *et al.*, 1996). Tím vším je schopen c-Myc značnou měrou přispět k překonání restrikčního bodu. Proto je c-Myc řazen mezi protoonkogeny a mnoho druhů karcinomů je spojeno s jeho zvýšenou expresí (shrnutí v Garte, 1993).

#### **4.2.2 Kontrola vstupu do fáze S při poškození DNA**

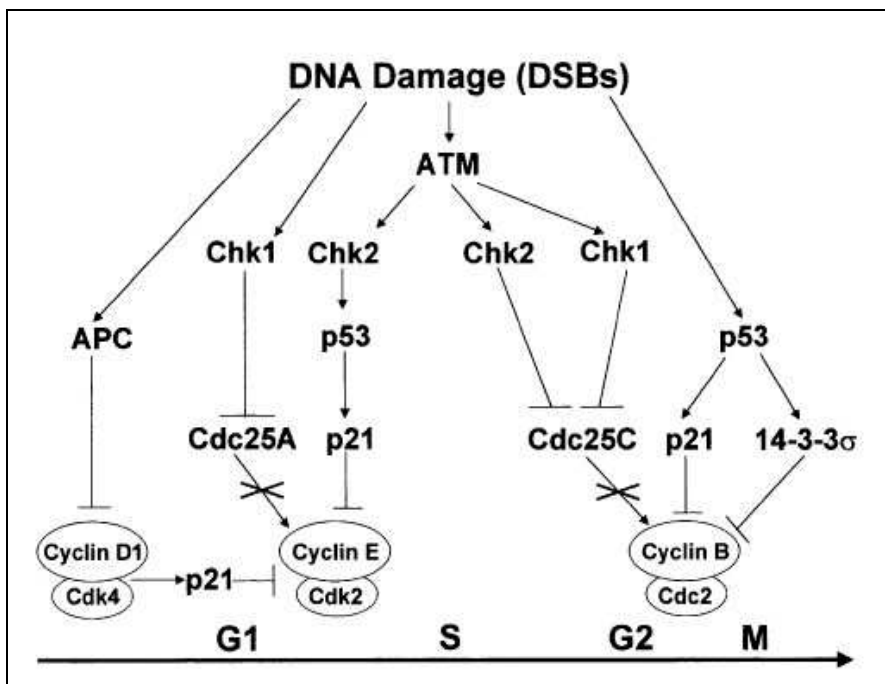
Genetická informace uložená v molekule DNA je pro buňku životně důležitá. Dojde-li k jejímu poškození ať už fyzikálními nebo chemickými vlivy, musí buňka přednostně vzniklé

škody napravit dříve, než by poškození mohlo ohrozit její existenci nebo její rozmnožení. Poškození DNA může zastavit chod buněčného cyklu, dokud není DNA opět reparována. Příliš rozsáhlé škody mohou vést až k apoptóze buňky (Israels *et* Israels, 1999)

Ústředním prvkem reakce na poškození DNA je protein p53. Za standartních okolností je p53 udržován při nízkých nebo nedetekovatelných koncentracích proteinem MDM2. MDM2 se váže na p53. Jednak tak inhibuje jeho aktivitu a jednak jej transportuje z jádra a zajistí jeho ubikvitinylaci a proteolytickou degradaci (Momand *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1997).

Pokud je v buňce zjištěno poškození DNA, je aktivována kináza ATM, v případě obouřetězcového zlomu DNA (viz přiložené schema níže), nebo komplex kinázy ATR a proteinu ATRIP, v případě jednořetězcového zlomu (Zou *et* Elledge, 2003). Tyto kinázy kromě řady dalších substrátů fosforylují a tím aktivují serin/threonin kinázu Chk2, která dále fosforyluje p53 (Ahn *et al.*, 2000). Fosforylace způsobí, že MDM2 není dále schopen vázat p53, a p53 se tím vymyká jeho inhibici (Shieh *et al.*, 1997). Aktivovaný p53 působí jako transkripční faktor a indukuje mezi dalšími i transkripci genu p21, který inhibuje komplexy CDK/cyklin D (Ogryzko *et al.*, 1997). Za takových okolností tedy proteiny RB zůstávají hypofosforylované a k postupu buněčným cyklem nemůže dojít.

Výše popsaný mechanismus je schopen buňku udržet v kontrolním uzlu G1/S a je předcházen ještě dvěma ději. Prvním z nich je postupná degradace cyklinu D (Agami *et* Bernards, 2000). To má za následek rozpad komplexů s CDK4 a CDK6 a uvolnění p21 z těchto komplexů ve prospěch inhibice CDK2. Druhým dějem je pak aktivace serin/threonin kinázy Chk1, která fosforyluje Cdc25A (Mailand *et al.*, 2000). Fosforylovaná fosfatáza Cdc25A podléhá rychlé degradaci a nemůže tak odstranit inhibiční fosforyl na CDK2. Tím dochází k pozastavení průběhu buněčného cyklu a tento stav pomáhá udržet aktivovaný protein p53.



Schema kontrolních uzlů G1/S a G2/M při dvojřetězcovém zlomu DNA. Převzato z Garrett, 2001.

#### 4.2.3 Přejít z fáze G2 do mitózy

Pro zahájení mitózy a všech příslušných přestaveb jaderného obalu a cytoskeletu je zapotřebí aktivního komplexu CDK1 a cyklinu B, který by řídil činnost dalších genů. Koncem fáze G2 je již tento komplex v buňce dostatečně akumulován a nafosforylován Cdk-aktivující kinázou, ale nese i inhibiční fosforyl, který mu brání v enzymatické aktivitě. Tuto inhibiční fosforylaci zajišťují kinázy Myt1 a Wee1 (Parker *et Piwnica-Worms*, 1992; Liu *et al.*, 1997). Obrat iniciují kinázy Plk, které fosforylují a aktivují klíčovou fosfatázu Cdc25C. Ta je schopná komplexu CDK1/cyklin B odejmout inhibiční fosfát (shrnuto v Garrett, 2001). Posilujícího efektu je dosaženo pozitivním zpětnovazebným působením CDK1/cyklin B na dosud neaktivované Cdc25C. Již aktivovaný CDK1/cyklin B navíc dokáže fosforylací inhibovat Wee1. Jakmile se tedy aktivuje malé množství fosfatáz Cdc25C, lze poměrně rychle a naráz docílit úplné aktivace cyklin-dependentních kináz a spuštění mitózy.

#### 4.2.4 Kontrola zahájení mitózy při poškození DNA

Stejně jako je tomu v kontrolním uzlu G1/S, jsou i v tomto případě při poškození DNA aktivovány kinázy ATM a ATR-ATRIP (viz příložené schema výše). Tyto zprostředkovávají fosforylaci a aktivaci kináz Chk1 a Chk2 (Matsuoka *et al.*, 1998). Obě fosforylují Cdc25C, což umožní proteinu 14-3-3 interagovat s takto fosforylovanou

Cdc25C (Peng *et al.*, 1997). To vede k transportu fosfatázy Cdc25C z jádra do cytoplazmy, takže v jádře nemůže účinkovat.

Dále se na zastavení buněčného cyklu podílí i protein p53, který indukuje expresi dvou dalších genů. První, již výše popsany protein p21 se váže na komplex CDK1/cyklin B a inhibuje jeho aktivitu (Bunz *et al.*, 1998). Druhý je protein 14-3-3 $\sigma$ , který se také váže na komplex CDK1/cyklin B a transportuje jej z jádra, čímž mu také zamezuje v aktivitě (Chan *et al.*, 1999). Je prokázáno, že při poškození DNA je inhibována i Plk1, jedna z kináz Plk aktivujících Cdc25C (Smits *et al.* 2000). Tak je možné zastavit progresi buněčným cyklem na dostatečně dlouhou dobu, aby se poškozená DNA stihla opravit.

## 5. Cirkadiánní regulace buněčného cyklu

### 5.1 Regulace pomocí hodinami kontrolovaných genů

První zmínka o cirkadiánním rytmu v buněčném dělení pochází z roku 1938 (Cooper *et Schiff*, 1938). Dnes je již dobře známo, že rychle se obnovující tkáně vykazují pravidelné cirkadiánní rytmy v syntéze DNA a dělení buněk (Smaaland *et al.*, 1991; Buchi *et al.* 1991). Stejně jako u jiných cirkadiánních fyziologických rytmů jsou i tyto zapříčiněny rytmickou expresí hodinami kontrolovaných genů. Geny, které obsahují ve svých promotorech sekvenci E-boxů, jsou kontrolovány heterodimerem CLOCK:BMAL1 a jsou exprimovány ve fázi s geny Per. V antifázi k Per genům, to jest ve fázi s genem Bmal1, jsou exprimovány geny, které jsou aktivovány skrze RevRE sekvenci (Ueda *et al.*, 2002). Samy hodinami kontrolované geny mohou být transkripční faktory a dále ovlivňovat expresi mnoha dalších genů, čímž v důsledku vytvářejí pozorovatelné fyziologické rytmy. Cirkadiánní rytmy v expresi byly změřeny u 2-10 % savčích genů (Akhtar *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002; Duffield *et al.* 2002).

Mezi hodinami kontrolovanými geny byly nalezeny i geny regulující buněčný cyklus. Z nejdůležitějších cirkadiánně exprimovaných genů je možno jmenovat cykliny E, A, B1 a D1, dále protein p53, Mdm2, Wee1, protoonkogen c-Myc nebo nádorový supresor Gadd45 $\alpha$  (Bjarnason *et al.*, 1999; Bjarnason *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2002; Akhtar *et al.*, 2002). V oblastech promotorů genů c-Myc, Wee1 a cyklin D1 byly dokonce nalezeny E-boxy (shrnuto v Reddy *et al.*, 2005). Cirkadiánní systém tedy zasahuje do průběhu buněčného cyklu přinejmenším na dvou místech: v kontrolním uzlu G1/S a G2/M.

Důkladně se podařilo prozkoumat cirkadiánní regulaci exprese genu Wee1. Japonský tým vedený Hitoshim Okamura publikoval pokus, ve kterém provedli částečnou hepatektomii myších jater *in vivo* (Matsuo *et al.*, 2003). Jaterní buňky přešly z fáze G0 do G1



a S a replikovaly svou DNA. Přestože pokus prováděli vícekrát v různý cirkadiánní čas, buňky vstoupily do mitózy pokaždé ve stejný cirkadiánní čas. Bylo to způsobeno tím, že jen po omezenou část cirkadiánní cyklu byla koncentrace proteinu WEE1 dostatečně nízká, aby přestal inhibovat průchod kontrolním uzlem G2/M. Bylo objeveno, že promotor Wee1 obsahuje sekvence E-boxů a je pod přímou kontrolou heterodimeru CLOCK:BMAL1. Wee1 je exprimován ve fázi s Per1 a v jaterních buňkách vykazuje výrazné cirkadiánní rytmy s vysokou amplitudou.

Další doklady o propojení obou systémů přináší pokusy s myšmi, které mají mutovaný a tudíž nefunkční gen Per2. Zatímco v buňkách nemutovaných myší osciluje exprese genu c-Myc cirkadiánně s nízkou amplitudou, v Per2-mutantních myších je exprese c-Myc signifikantně zvýšená a rovněž exprese genů, které c-Myc reguluje, je významně změněná (Fu *et al.*, 2002). Je také známo, že exprese genu c-Myc je heterodimerem CLOCK:BMAL1 skrze E-boxy ovlivněná negativně, neboť se ukázalo, že komplex CLOCK:BMAL1 je schopen obou druhů regulace, jak pozitivní, tak negativní (Kondratov *et al.*, 2006).

Cirkadiánní systém je zapojen do řízení buněčného cyklu v případě poškození DNA, což dosvědčuje i další pokus s Per2-mutantními myšmi. Po ozáření nemutované myši paprsky gamma dochází v jejích játrech k indukci exprese genů Per1, Per2, Clock, Cry1 a Bmal1. Avšak má-li myš mutovaný gen Per2, k indukci této exprese nedochází (Fu *et al.*, 2002).

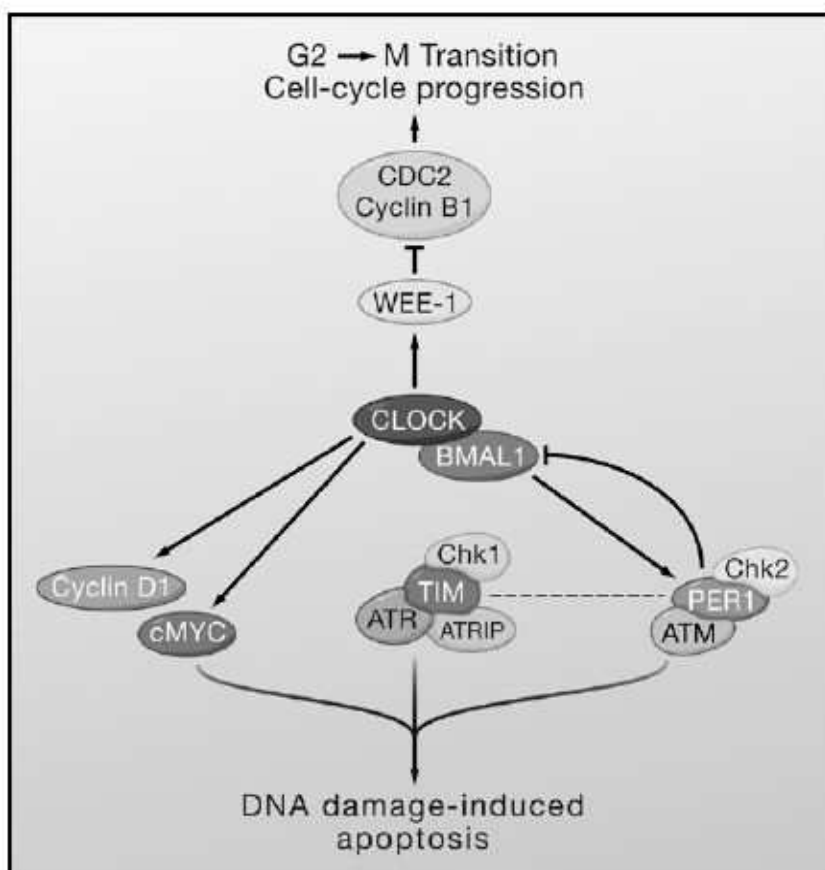
## 5.2 Interakce hodinových proteinů s regulátory buněčného cyklu

Také protein PER1 je zapojen do signálních drah kontrolních uzlů buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že při poškození DNA ionizujícím zářením interaguje PER1s proteiny ATM a Chk2, které se zapojují do kontroly buněčného cyklu (viz výše). Při supresi PER1 pomocí siRNA byla fosforylace Chk2 kinázou ATM značně snížena (Gery *et al.*, 2006). Podobně je do molekulárního aparátu buněčného cyklu zapojen protein TIM (viz příložené schema níže). Gen Tim je považován za jeden z hodinových genů, přestože dosud není přesně známo, jakým mechanismem v biologických hodinách působí. Určitý význam však přesto má, jelikož dočasné vyřazení transkriptů tohoto genu v neuronech narušilo neuronální aktivitu a také významně změnilo rytmy ostatních hodinových genů (Barnes *et al.*, 2003). Další studium je však obtížné, protože mutace v genu Tim je letální již v embryonálním stádiu (Gotter *et al.*, 2000), je však díky tomu zřejmé, že TIM hraje významnou roli v buněčných procesech probíhajících během ontogeneze. Také s tímto hodinovým genem interagují kinázy regulující průchod buněčným cyklem, a sice komplex ATR-ATRIP a Chk1 (viz výše). Když byla buňka vystavena genotoxickému stresu, interakce se zvýšila. Když byly transkripty genu Tim

dočasně vyřazeny pomocí siRNA, fosforylace Chk1 se výrazně snížila a to i v odpovědi na poškození DNA (Ünsal-Kaçmaz *et al.*, 2005). Mimo regulátorů buněčného cyklu TIM také interaguje s proteinem TIPIN, který je schopen vázat některé proteiny, které jsou součástí replikační vidličky. Uvažuje se proto, že by TIM mohl mít i regulační funkci při replikaci DNA (Gotter *et al.*, 2007).

Z uvedených údajů je patrné, že hodinové proteiny PER1 a TIM jsou vícenásobně zapojeny do regulace buněčného cyklu, zejména do mechanismu odpovědi na poškození DNA. Uvažuje se o tom, že by v systému měly funkce buď kofaktorů velkých enzymových komplexů, anebo adaptorů, které usnadňují přístup substrátu pro kinázy ATM a ATR.

Aktivita mimo rámec systému biologických hodin byla na modelu drápatky zjištěna i u kinázy CKIε, která fosforyluje části komplexu degradace β-kateninu. Tato fosforylace komplex destabilizuje a tím pádem inhibuje degradaci β-kateninu, který spolureguluje buněčnou proliferaci (Gao *et al.*, 2002).



**Schema interakcí**  
hodinových proteinů  
s regulátory buněčného  
cyklu. Převzato z Hunt *et*  
Sassone-Corsi, 2007.

### 5.3 Nádorové bujení a chronoterapie

Molekulární systém řízení buněčného cyklu je rozsáhlý a komplexní aparát a někdy i drobný zásah v podobě mutace může vést k závažným změnám v jeho regulaci, k nekontrolovatelné buněčné proliferaci a nakonec k nádorovému bujení. Z hlediska souvislosti s biologickými hodinami je vhodné pohlížet na nádorové bujení jako genovou deregulaci. Například aktivace protoonkogenu c-Myc spolu s Bcl-x(L), který potlačuje apoptózu, již je dostačující k navození nádorového bujení (Pelengaris *et al.*, 2002).

Bylo také pozorováno, že myši, které mají mutantní gen Per2, mají častěji hyperplázie slinných žláz a velmi zvýšenou tvorbu lymfomů po ozáření paprsky gamma. Způsobeno je to patrně deregulací genu c-Myc, protože jeho nádorový supresor p53 má vlivem mutace Per2 sníženou expresi (Fu *et al.*, 2002; Blyth *et al.*, 1995). Dále u homologického Per1 bylo objeveno, že jeho koncentrace v rakovinných buňkách je snížena. Další experimenty ukázaly, že buňky se zvýšenou expresí Per1 byly velmi citlivé na spuštění apoptózy a naopak buňky s nízkou expresí Per1 byly odolnější vůči vyvolání apoptózy ionizujícím zářením (Gery *et al.*, 2006). Lze tedy usoudit, že deregulace genů Per1 a Per2 má za následek narušení přirozeného obranného systému buňky proti nekontrolovatelnému dělení.

Souvislost nádorového bujení a biologických hodin lze ukázat i na úrovni oscilátoru v SCN. Pokud například byla zničena SCN elektrolytickou lézí myším, kterým byl voperován osteosarkom nebo pankreatický adenokarcinom, rostly tyto nádory dvakrát až třikrát rychleji než u myší se zachovanými SCN (Filipski *et al.*, 2002). Podobných výsledků bylo dosaženo i nepravidelným světelným režimem pokusných zvířat, který narušil jejich cirkadiánní rytmy (Li *et Xu*, 1997; Filipski *et al.*, 2004).

Analogická situace byla nalezena i u lidských pacientů. Ve studii prováděné na 104 pacientech s metastatickým karcinomem prsu byla porovnávána prognóza vývoje nádoru s cirkadiánním rytmem kortisolu obsaženým ve slinách. Ukázalo se, že pacienti s nízkým rytmem nebo úplně bez cirkadiánních rytmů podleli karcinomu dříve (Sephton *et al.*, 2000). Další sledování byla prováděna na lidech pracujících v nepravidelnou denní dobu a hlavně v noci, především pak u zdravotních sester. I zde bylo dokázáno, že lidé pracující v nočních směnách mají významně zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění prsu (Schernhammer *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2001; Hansen, 2001).

Bylo zjištěno, že i nádorové buňky vykazují cirkadiánní rytmy v proliferaci, které jsou synchronní s hostitelem, alespoň ty pomalu rostoucí (Izquierdo, 1977). Pokročilá a rychle rostoucí nádory mají často rytmus proliferace ultradiánní, tedy rychlejší než 24 hodin (Klevecz *et Braly*, 1991). Takového stavu využívá chronoterapie. Účinnost cytotoxických

láték, kterými se rakovina obvykle léčí, totiž silně závisí na cirkadiánní fázi buněčného cyklu a není tedy po celý den stejná. Je zřejmé, že podávání těchto léků v průběhu celého dne zbytečně zatěžuje organismus pacienta. Chronoterapie usiluje o nalezení optimální denní doby, kdy podávaný lék nejlépe zasáhne nádorové buňky a nejméně uškodí pacientovi. Uvádí se, že chronoterapie může být dvakrát až osmkrát účinnější než standardní léčba (shrnuje Wood *et* Hrushesky, 1996).

## 6. Závěr

Ve své práci jsem popsal základní schéma fungování cirkadiánního systému i buněčného cyklu a uvedl jsem řadu příkladů jejich vzájemného propojení. Vidíme však, že tento vztah není úplně vzájemný. Známe mnoho případů, kdy mutace hodinových genů ovlivní chod buněčného cyklu, dosud ale neznáme žádnou mutaci v aparátu buněčného cyklu, která by se projevila na fungování biologických hodin. Mnoho z těchto společných pojítek, molekulárních interakcí a signálních drah dosud zůstává neprobádáno a jistě se tímto směrem bude ubírat i budoucí výzkum. Zůstává například otevřenou otázkou, jakým mechanismem buňka rozlišuje mezi geny, které mají aktivovat cirkadiánní transkripční faktory, a geny, které aktivují transkripční faktory buněčného cyklu, přestože obě skupiny regulují transkripci skrze identickou sekvenci E-boxů. Tato okolnost spolu s dalšími navozuje otázku společných evolučních propojení. Význam tohoto spojení se dostává do popředí zvláště nyní, kdy moderní civilizace často vyvíjí na člověka tlak, který vede k narušení jeho vnitřního cirkadiánního systému.

## Seznam literatury

Abrahamson E. E., Moore R. Y. (2001): Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1-2): 172-91

Agami R., Bernards R. (2000): Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*, 102(1): 55-66

Ahn J. Y., Schwarz J. K., Piwnicka-Worms H., Canman C. E. (2000): Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer research*, 60(21): 5934-6

Akashi M., Takumi T. (2005): The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature structural & molecular biology*, 12(5): 441-8

Akhtar R. A., Reddy A.B., Maywood E.S., Clayton J.D., King V.M., Smith A.G., Gant T.W., Hastings M.H., Kyriacou C.P. (2002): Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 12(7): 540-50

Albus H., Vansteensel M. J., Michel S., Block G. D., Meijer J. H. (2005): A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology*, 15(10): 886-93

Barnes J. W., Tischkau S. A., Barnes J. A., Mitchell J. W., Burgoon P. W., Hickok J. R., Gillette M. U. (2003): Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science*, 302(5644): 439-42

Bertolucci C., Cavallari N., Colognesi I., Aguzzi J., Chen Z., Caruso P., Foá A., Tosini G., Bernardi F., Pinotti M. (2008): Evidence for an overlapping role of CLOCK and NPAS2 transcription factors in liver circadian oscillators. *Molecular and cellular biology*, 28(9): 3070-5

Bjarnason G. A., Jordan R. C., Sothorn R. B. (1999): Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *The American journal of pathology*, 154(2): 613-22

Bjarnason G. A., Jordan R. C., Wood P. A., Li Q., Lincoln D. W., Sothorn R. B., Hrushesky W. J., Ben-David Y. (2001): Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *The American journal of pathology*, 158(5): 1793-801

Blyth K., Terry A., O'Hara M., Baxter E. W., Campbell M., Stewart M., Donehower L. A., Onions D. E., Neil J. C., Cameron E. R. (1995): Synergy between a human c-myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene*, 10(9): 1717-23

Buchi K. N., Moore J. G., Hrushesky W. J., Sothorn R. B., Rubin N. H. (1991): Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology*, 101(2): 410-5

- Bunger M. K., Wilsbacher L. D., Moran S. M., Clendenin C., Radcliffe L. A., Hogenesch J. B., Simon M. C., Takahashi J. S., Bradfield C. A. (2000): Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7): 1009-17
- Bunz F., Dutriax A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393): 1497-501
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y. J., Liu D. (1999): Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284(5415): 760-5
- Cooper Z. K., Schiff A. (1938): Mitotic rhythm in human epidermis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39: 323-352
- Daan S., Pittendrigh C. S. (1976): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology*, 106: 255-266
- Daksis J. I., Lu R. Y., Facchini L. M., Marhin W. W., Penn L. J. (1994): Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene*, 9(12): 3635-45
- Davis S., Mirick D. K., Stevens R. G. (2001): Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20): 1557-62
- Debruyne J. P., Noton E., Lambert C. M., Maywood E. S., Weaver D. R., Reppert S. M. (2006): A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50(3): 465-77
- Duffield G. E., Best J. D., Meurers B. H., Bittner A., Loros J. J., Dunlap J. C. (2002): Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Current Biology*, 12(7): 551-7
- Filipski E., King V. M., Li X., Granda T. G., Mormont M. C., Liu X., Claustrat B., Hastings M. H., Lévi F. (2002): Host circadian clock as a control point in tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(9): 690-7
- Filipski E., Delaunay F., King V. M., Wu M. W., Claustrat B., Gréchez-Cassiau A., Guettier C., Hastings M. H., Francis L. (2004): Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer research*, 64(21): 7879-85
- Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C. (2002): The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111(1): 41-50
- Galaktionov K., Chen X., Beach D. (1996): Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 382(6591): 511-7

- Gao Z. H., Seeling J. M., Hill V., Yochum A., Virshup D. M. (2002): Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3): 1182-7
- Garrett M. D. (2001): Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81(5): 515-22
- Garte S. J. (1993): The c-myc oncogene in tumor progression. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(4): 435-49
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H. B., Davis F. C., Wilsbacher L. D., King D. P., Takahashi J. S., Weitz C. J. (1998): Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280(5369): 1564-9
- Gery S., Komatsu N., Baldjyan L., Yu A., Koo D., Koeffler H. P. (2006): The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Molecular cell*, 22(3): 375-82
- Gotter A. L., Manganaro T., Weaver D. R., Kolakowski L. F. Jr., Possidente B., Sriram S., MacLaughlin D. T., Reppert S. M. (2000): A time-less function for mouse timeless. *Nature neuroscience*, 3(8): 755-6
- Gotter A. L., Suppa C., Emanuel B. S. (2007): Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *Journal of molecular biology*, 366(1): 36-52
- Guilding C., Piggins H. D. (2007): Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience*, 25(11): 3195-216
- Hansen J. (2001): Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology*, 12(1): 74-7
- Harding H. P., Lazar M. A. (1993): The orphan receptor Rev-Erba alpha activates transcription via a novel response element. *Molecular and cellular biology*, 13(5): 3113-21
- Hartwell L. H., Weinert T. A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246(4930): 629-34
- Hastings M. H. (1997): Circadian clocks. *Current Biology*, 7 (11): R607-2
- Hinds P. W., Mittnacht S., Dulic V., Arnold A., Reed S. I., Weinberg R. A. (1992): Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, 70(6): 93-1006
- Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, 420(1): 25-7
- Hunt T., Sassone-Corsi P. (2007): Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle. *Cell*, 129(3): 461-4

- Chan T. A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1999): 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401(6753): 616-20
- Chellappan S. P., Hiebert S., Mudryj M., Horowitz J. M., Nevins J. R. (1991): The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6): 1053-61
- Illnerová H., Vaněček J. (1985): Regulation of the circadian rhythm in pineal melatonin production. *Physiologia Bohemoslovaca* 34: 57-61
- Illnerová H. (1995): Pokroky v neurovědách, kapitola Chronobiologie, Univerzita Karlova
- Israels L. G., Israels E. D. (1999): Apoptosis. *Stem Cells*, 17(5): 306-13
- Israels E. D., Israels L. G. (2001): The cell cycle. *Stem cells*, 19(1): 88-91
- Izquierdo J. N. (1977): Increased cell proliferation with persistence of circadian rhythms in hamster cheek pouch neoplasms. *Cell and tissue kinetics*, 10(4): 313-22
- Jin X., Shearman L. P., Weaver D. R., Zylka M. J., de Vries G. J., Reppert S. M. (1999): A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96(1): 57-68
- Kennaway D.J., Varcoe T. J., Mau V. J. (2003): Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular human reproduction*, 9(9): 503-7
- Klevecz R. R., Braly P. S. (1991): Circadian and ultradian cytokinetic rhythms of spontaneous human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 618: 257-76
- Kondratov R. V., Shamanna R. K., Kondratova A. A., Gorbacheva V. Y., Antoch M. P. (2006): Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. *The FASEB journal*, 20(3): 530-2
- Lee C., Etchegaray J. P., Cagampang F. R., Loudon A. S., Reppert S. M. (2001): Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107(7): 855-67
- Li J. C., Xu F. (1997): Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biological signals*, 6(2): 77-89
- Liu F., Stanton J. J., Wu Z., Piwnicka-Worms H. (1997): The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Molecular and cellular biology*, 17(2): 571-83
- Lundberg A. S., Weinberg R. A. (1998): Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and cellular biology*, 18(2): 753-61
- Mailand N., Falck J., Lukas C., Syljuâsen R. G., Welcker M., Bartek J., Lukas J. (2000): Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, 288(5470):1425-9



- Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H. (2003): Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302(5643):255-9
- Matsuoka S., Huang M., Elledge S. J. (1998): Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282(5395): 1893-7
- Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C., George D., Levine A. J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7): 1237-45
- Morin L. P., Allen C. N. (2005): The circadian visual system. *Brain research reviews*, 51(1): 1-60
- Ogryzko V. V., Wong P., Howard B. H. (1997): WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Molecular and cellular biology*, 17(8): 4877-82
- Panda S., Antoch M. P., Miller B. H., Su A. I., Schook A. B., Straume M., Schultz P. G., Kay S. A., Takahashi J. S., Hogenesch J. B. (2002): Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109(3): 307-20
- Panda S., Provencio I., Tu D. C., Pires S. S., Rollag M. D., Castrucci A. M., Pletcher M. T., Sato T. K., Wiltshire T., Andahazy M., Kay S. A., Van Gelder R. N., Hogenesch J. B. (2003): Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632): 525-7
- Parker L. L., Piwnica-Worms H. (1992): Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 257(5078): 1955-7
- Pelengaris S., Khan M., Evan G. I. (2002): Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, 109(3): 321-34
- Peng C. Y., Graves P. R., Thoma R. S., Wu Z., Shaw A. S., Piwnica-Worms H. (1997): Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 277(5331): 1501-5
- Pérez-Roger I., Solomon D. L., Sewing A., Land H. (1997): Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene*, 14(20): 2373-81
- Ralph M. R., Menaker M. (1988): A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241(4870): 1225-7
- Reddy A. B., Wong G. K., O'Neill J., Maywood E. S., Hastings M. H. (2005): Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutation research*, 574(1-2): 76-91
- Reppert S. M., Weaver D. R. (2001): Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual review of physiology*, 63: 647-76

- Shearman L. P., Jin X., Lee C., Reppert S. M., Weaver D. R. (2000): Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Molecular and cellular biology*, 20(17): 6269-75
- Sherr C. J. (1995): D-type cyclins. *Trends in biochemical sciences*, 20(5): 187-90
- Harper J. W., Elledge S. J. (1998): The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes & development*, 12(3): 285-9
- Sephton S. E., Sapolsky R. M., Kraemer H. C., Spiegel D. (2000): Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(12): 994-1000
- Shieh S. Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. (1997): DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3): 325-34
- Shigeyoshi Y., Taguchi K., Yamamoto S., Takekida S., Yan L., Tei H., Moriya T., Shibata S., Loros J. J., Dunlap J. C., Okamura H. (1997): Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, 91(7):1043-53
- Schernhammer E. S., Laden F., Speizer F. E., Willett W. C., Hunter D. J., Kawachi I., Colditz G. A. (2001): Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20): 1563-8
- Schibler U., Ripperger J., Brown S. A. (2003): Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *Journal of biological rhythms*, 18(3): 250-60
- Schibler U. (2005): The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO reports*, 6: S9-13
- Smaaland R., Laerum O. D., Lote K., Sletvold O., Sothorn R. B., Bjerknes R. (1991): DNA synthesis in human bone marrow is circadian stage dependent. *Blood*, 77(12): 2603-11
- Smits V. A., Klompmaker R., Arnaud L., Rijksen G., Nigg E. A., Medema R. H. (2000): Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nature cell biology*, 2(9): 672-6
- Stephan F. K., Zucker I. (1972): Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6): 1583-6
- Storch K. F., Lipan O., Leykin I., Viswanathan N., Davis F. C., Wong W. H., Weitz C. J. (2002): Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417(6884): 78-83
- Sumová A., Jáč M., Sládek M., Šauman I., Illnerová H. (2003): Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *Journal of biological rhythms*, 18(2): 134-44
- Toh K. L., Jones C. R., He Y., Eide E. J., Hinz W. A., Virshup D. M., Ptáček L. J., Fu Y. H. (2001): An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291(5506): 1040-3

Triqueneaux G., Thenot S., Kakizawa T., Antoch M. P., Safi R., Takahashi J. S., Delaunay F., Laudet V. (2004): The orphan receptor Rev-erb $\alpha$  gene is a target of the circadian clock pacemaker. *Journal of molecular endocrinology*, 33(3): 585-608

Ueda H. R., Chen W., Adachi A., Wakamatsu H., Hayashi S., Takasugi T., Nagano M., Nakahama K., Suzuki Y., Sugano S., Iino M., Shigeyoshi Y., Hashimoto S. (2002): A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418(6897): 534-9

Ünsal-Kaçmaz K., Mullen T. E., Kaufmann W. K., Sancar A. (2005): Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Molecular and cellular biology*, 25(8): 3109-16

van der Horst G. T., Muijtjens M., Kobayashi K., Takano R., Kanno S., Takao M., de Wit J., Verkerk A., Eker A. P., van Leenen D., Buijs R., Bootsma D., Hoeijmakers J. H., Yasui A. (1999): Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728): 627-30

Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z. H., Virshup D. M. (2000): Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Molecular and cellular biology*, 20(13): 4888-99

Vitaterna M. H., Selby C. P., Todo T., Niwa H., Thompson C., Fruechte E. M., Hitomi K., Thresher R. J., Ishikawa T., Miyazaki J., Takahashi J. S., Sancar A. (1999): Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21): 12114-9

Welsh D. K., Logothetis D. E., Meister M., Reppert S. M. (1995): Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4): 697-706

Wood P. A., Hrushesky W. J. (1996): Circadian rhythms and cancer chemotherapy. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 6(4): 299-343

Yoo S. H., Yamazaki S., Lowrey P. L., Shimomura K., Ko C. H., Buhr E. D., Siepkha S. M., Hong H. K., Oh W. J., Yoo O. J., Menaker M., Takahashi J. S. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15): 5339-46

Zou L., Elledge S. J. (2003): Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625): 1542-8