

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Petra Novotná

Úloha PKN kináz v nádorové transformaci
The role of PKN family kinases in cancer

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D., za vstřícnost, ochotu a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 5. 2021

Podpis:

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá rodinou Ser/Thr kináz PKN. Ta zahrnuje tři izoformy PKN1, PKN2 a PKN3. Především se pak podrobněji zabývá kinázou PKN3. Jedná se o kinázy příbuzné s proteinkinázou C, patřící do superrodiny AGC. PKN kinázy jsou aktivované malými G proteiny z rodiny Rho GTPáz nebo nenasycenými mastnými kyselinami. PKN kinázy se účastní mnoha buněčných procesů, mezi které patří například regulace přestaveb cytoskeletu. Ovlivňují buněčnou adhezi, pohyb buněk, embryonální vývoj i buněčný cyklus. Exprese PKN3 je zvýšená zejména v rakovinových buňkách, ale v normálních tělních buňkách je jen v nepatrném množství. Z toho důvodu se PKN3 jeví jako velice zajímavý terapeutický cíl pro léčbu rakoviny. Studie ukazují, že PKN3 má značný vliv na motilitu rakovinových buněk, protože se podílí na jejich migraci a schopnosti tvorby metastáz.

Klíčová slova

PKN, kinázy, rakovina, cytoskelet, Rho

Abstract

This bachelor thesis is focused on the PKN family of Ser/Thr kinases. This family includes three isoforms PKN1, PKN2 and PKN3. Especially it deals with the kinase PKN3 in more detail. These are kinases related to protein kinase C, belonging to the AGC superfamily. PKN kinases are activated via small G proteins of the Rho GTPase family or unsaturated fatty acids. PKN kinases are involved in many cellular processes, such as the regulation of cytoskeletal rearrangements, affect cell adhesion, cell movement, embryonic development and the cell cycle. Expression of PKN3 is particularly increased in cancer cells but is only present in small amounts in normal body cells. Therefore, PKN3 appears to be a very interesting therapeutic target for the treatment of cancer. Studies have shown that PKN3 has a significant effect on the motility of cancer cells, thus contributing to their migration and ability to form metastases.

Key words

PKN, kinases, cancer, cytoskeleton, Rho

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Superrodina AGC.....	2
2.1. Struktura kinázové domény superrodiny AGC a její regulace.....	3
3. Rodina PKN.....	5
3.1. Terminologie.....	5
3.2. Struktura PKN kináz.....	5
3.3. Aktivace PKN kináz.....	6
3.3.1. Rho GTPázy.....	8
3.3.1.1. Regulace Rho GTPáz.....	8
3.3.1.2. Vliv Rho GTPáz na pohyb buněk.....	9
3.3.1.3. RhoA/RhoB/RhoC a nádory.....	9
3.4. Funkce PKN kináz v buňkách.....	10
3.5. PKN3.....	12
3.5.1. Distribuce PKN3 v tkáních.....	12
3.5.2. PKN3 jako efektor PI3K.....	12
3.5.3. Vliv PKN3 na invazivitu nádorových buněk.....	13
3.5.4. Využití inhibice PKN3 v protinádorové terapii.....	16
4. Závěr.....	18
5. Zdroje.....	19

1. Úvod

Rodina proteinkináz N (PKN) patří do superrodiny AGC kináz. Přesněji se jedná o kinázy příbuzné s proteinkinázou C (PKC). Kinázy, které se řadí do superrodiny AGC kináz jsou Ser/Thr kinázy, které zprostředkovávají přenos fosfátu z donorové molekuly na serinové nebo threoninové aminokyselinové zbytky cílového proteinu.

Rodina PKN se skládá ze tří proteinkináz označených jako PKN1, PKN2 a PKN3. PKN1 a PKN2 jsou poměrně hojně exprimované ve všech tělních tkáních, ale míra exprese PKN3 ve většině normálních tkání je velice nízká. Zato je PKN3 silně exprimovaná především v nádorových buňkách a podílí se na tvorbě metastáz (Oishi *et al.*, 1999; Leenders *et al.*, 2004).

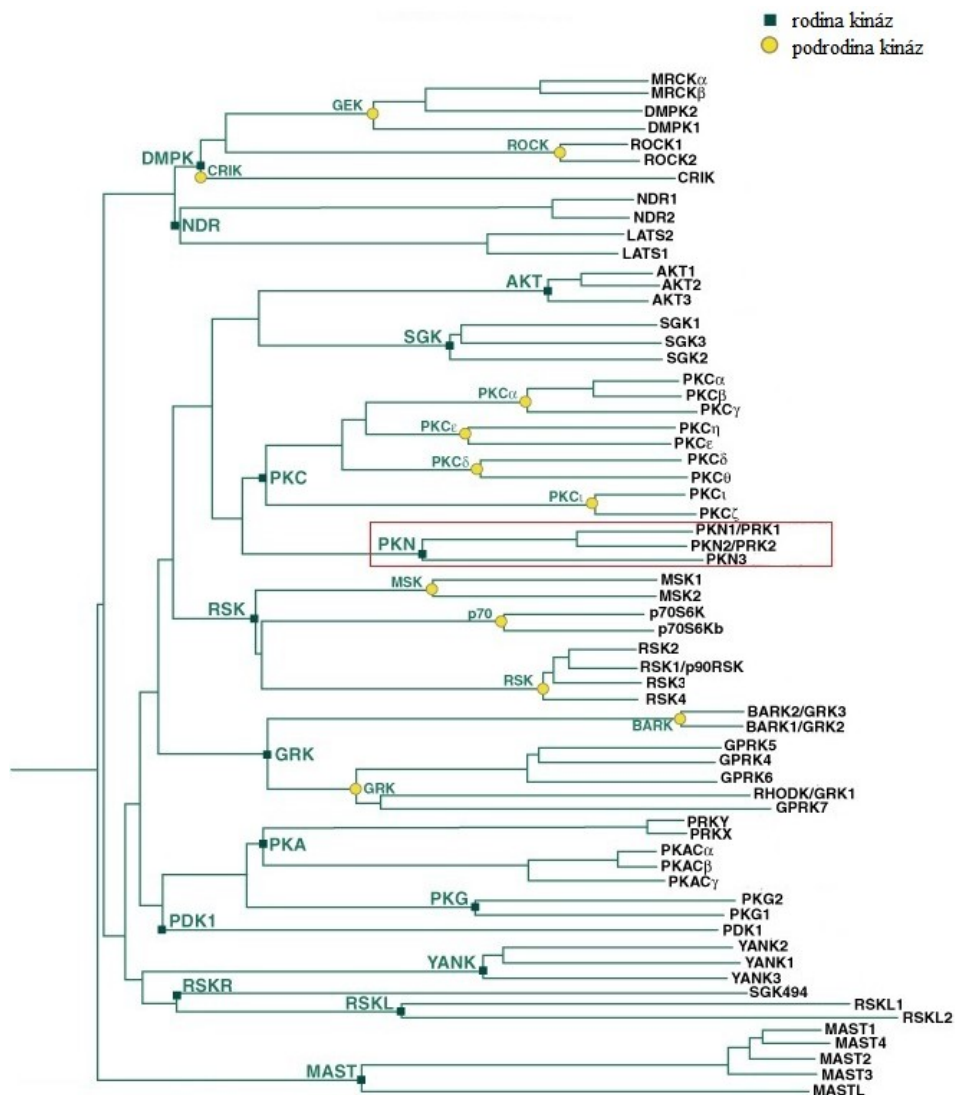
Nenasycené mastné kyseliny, jako například kyselina arachidonová nebo kyselina olejová, jsou schopné aktivovat kinázy PKN. Citlivost jednotlivých kináz z rodiny PKN je k nenasyceným mastným kyselinám značně odlišná. Nejcitlivější k tomuto druhu aktivace je PKN1, která reaguje na přítomnost kyseliny arachidonové velmi výrazným zvýšením své kinázové aktivity. Naopak PKN3 téměř na přítomnost nenasycené mastné kyseliny nereaguje (Oishi *et al.*, 1999). Dalšími aktivátory PKN kináz mohou být i některé fosfolipidy (Palmer *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1997).

PKN kinázy jsou efektory malých G proteinů z rodiny Rho. Rodina Rho jsou malé GTPázy, které fungují jako molekulární přepínače mezi aktivovaným a inaktivovaným stavem (navázaným GTP nebo GDP) (Amano *et al.*, 1996). Tímto mechanismem jsou schopné ovlivňovat další enzymy a signální kaskády. Rho GTPázy se svým působením podílejí na přestavbách buněčného skeletu, a mohou tak ovlivňovat i pohyblivost buněk. Mají také vliv na regulaci buněčného cyklu a na mnoho dalších buněčných dějů.

Cílem této bakalářské práce je popis rodiny kináz PKN. Především pak charakteristika kinázy PKN3, jejích vlastností, funkcí a jejího vlivu na buňky. PKN3 se jeví jako atraktivní terapeutický cíl, při léčbě rakoviny. Regulace PKN3 by mohla napomáhat k zabránění nádorovým buňkám tvořit metastáze v těle pacienta.

2. Superrodina AGC

Superrodina AGC kináz zahrnuje 63 příbuzných Ser/Thr kináz (Obrázek 1) (Leroux, Schulze and Biondi, 2018). Jméno skupiny AGC kináz bylo odvozeno od jejich tří hlavních rodin, a to od cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA), cGMP-dependentní proteinkinázy (PKG) a proteinkinázy C (PKC). Do superrodiny AGC patří, mimo již zmíněných hlavních rodin kináz, i kináza PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1). Ta se vyskytuje napříč eukaryotickými organismy a funguje jako aktivátor mnoha dalších kináz, včetně kináz ze superrodiny AGC. Dalšími kinázami z této superrodiny jsou například MAST (microtubule-associated serine/threonine-protein-kinase), RSK (ribosomal S6 kinase), která je součástí signální kaskády zapojené do epiteliálně-mezenchymálního přechodu, a již zmíněná rodina kináz PKN (Arencibia *et al.*, 2013).

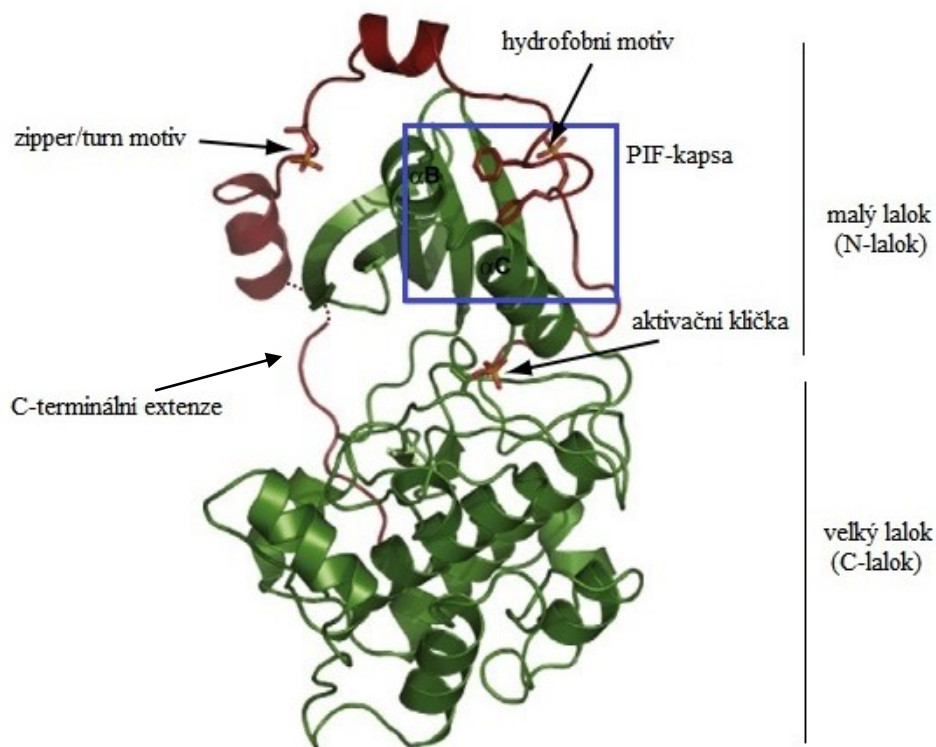


Obrázek 1: Kladogram superrodiny AGC kináz. Rodina PKN kináz je vyznačena červeným rámečkem. Jednotlivé rodiny kináz jsou označeny zeleným čtverečkem a jejich podrodiny žlutým kolečkem (upraveno podle www.cellsignal.com).

2.1. Struktura kinázové domény superrodiny AGC a její regulace

Mechanismus regulace kináz superrodiny AGC je téměř shodný napříč celou touto skupinou, protože katalytická doména je velice podobná mezi jednotlivými kinázami. Struktura kinázové domény byla poprvé popsána u kinázy PKA. Kinázová doména je složená z velkého laloku (C-lalok) a malého laloku (N-lalok), mezi kterými se nachází ATP-vazebné místo. Velký lalok je tvořen především z alfa-helixů, ale malý lalok je složený hlavně z beta-listů a jednoho alfa-helixu (α C). V blízkosti helixu α C velmi často bývá ještě druhý alfa-helix (α B) (Knighton *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1993). U superrodiny AGC kináz je navíc přítomný hydrofobní motiv (HM), který je velký zhruba 50-60 aminokyselin. Jedná se prodloužení C-terminálního konce kinázové domény, které je specifické pro AGC kinázy. Tento hydrofobní motiv interaguje s hydrofobní částí malého laloku kinázové domény, která je označena jako PIF-kapsa podle „PDK1 interacting fragment“ (Biondi *et al.*, 2000). PIF-kapsa umožňuje alosterickou regulaci u mnoha AGC kináz, která je možná díky flexibilitě sekundárních struktur a dynamickému spojení obou laloků (Obrázek 2).

Regulace fosforylací je velice běžný způsob ovlivňování funkcí molekul napříč různými organismy. AGC kinázy mají celkem tři regulační fosforylační místa: aktivační smyčku, hydrofobní motiv a zipper/turn motiv. Hydrofobní motiv a zipper/turn motiv se nacházejí v C-terminální oblasti kinázové domény a aktivační smyčka je mezi laloky (Leroux, Schulze and Biondi, 2018). Fosforylace aktivační smyčky přispívá k jejímu upevnění k malému a velkému laloku (Nolen, Taylor and Ghosh, 2004). Tak následně dojde k ovlivnění dynamiky mezi těmito laloky. Do určité míry se stabilizují alfa-helixy α C a α B, které jsou součástí PIF-kapsy. Tím je zahájena aktivace kinázy (Frödin *et al.*, 2002; Arencibia *et al.*, 2013). Změna polohy fosforylované aktivační smyčky ovlivňuje i rozpoznání substrátu kinázou. Fosforylace hydrofobního motivu a zipper/turn motivu dále zvyšuje aktivitu AGC kináz, protože zlepšuje jejich schopnost interakce mezi PIF-kapsou a hydrofobním motivem. Tato interakce pak ovlivňuje ATP-vazebné místo spolu s místem pro vazbu substrátu. Vazba mezi fosforylovaným hydrofobním motivem a PIF-kapsou, je charakteristická pro aktivované kinázy (Hauge *et al.*, 2007).



Obrázek 2: Krystalová struktura katalytické domény AGC kináz. Červeně je vyznačena C-terminální extenze, na které se nachází hydrofobní motiv a zipper/turn motiv. Oblast PIF-kapsy, jejíž součástí jsou alfa-helixy αB a αC , je vyznačena modrým ohraničením. Z obrázku je patrné, že hydrofobní motiv se váže do oblasti PIF-kapsy (upraveno podle Arencibia *et al.*, 2013).

3. Rodina PKN

3.1. Terminologie

Terminologie používaná u této rodiny kináz není zcela ustálená. Ve starších publikacích se používá označení PKN α , PKN β a PKN γ (Oishi *et al.*, 1999). V prvních publikacích bylo použité jen označení PKN (Mukai and Ono, 1994; Mukai *et al.*, 1994), ale jednalo se o kinázu PKN α (PKN1/ PRK1). Jiné označení těchto kináz je PRK1, PRK2 a PRK3, podle „protein-kinase-C-related-kinase“ (Palmer, Ridden and Parker, 1995). Další způsob pojmenování kináz z této rodiny je založený na původním značení, jen místo řeckých písmen se používají čísla. Tento způsob značení je použitý i v této práci.

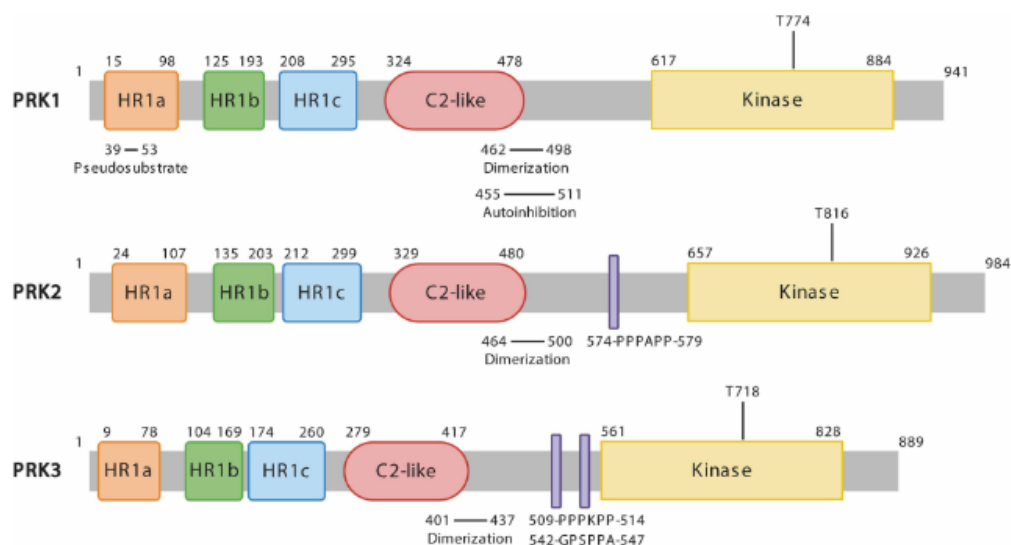
Jednotlivé kinázy z této rodiny mohou tedy být označeny jako PKN1/PKN α /PRK1, PKN2/PKN γ /PRK2 a PKN3/PKN β /PRK3.

3.2. Struktura PKN kináz

Kinázy z rodiny PKN jsou cca 120 kDa velké proteiny a mají navzájem velmi podobnou strukturu (Obrázek 3). C-terminální oblast, ve které se nachází Ser/Thr kinázová doména, má vysokou míru sekvenční homologie s C-terminální doménou protein kinázy C (Mukai and Ono, 1994).

N-terminální oblast PKN kináz obsahuje unikátní struktury typické pro tuto rodinu kináz. Jsou zde 3 homologní oblasti „homology region 1“ (HR1), označené jako HR1a, HR1b a HR1c. Tyto oblasti jsou schopné kontrolovat aktivaci PKN kináz, díky vazbě HR1 s aktivovanými Rho proteiny (Flynn *et al.*, 2000). Na HR1a oblasti se váží GTPázy z rodiny Rho (RhoA, RhoB a RhoC). RhoA se dokáže vázat i na oblast HR1b kinázy PKN1, ale tato vazba je slabší než vazba do oblasti HR1a (Flynn *et al.*, 1998). RhoA, RhoB i RhoC se váží na HR1a oblasti u všech tří kináz z rodiny PKN, ačkoli míra jejich afinity k jednotlivým kinázám se liší (Hutchinson *et al.*, 2013). Po třech HR1 oblastech následuje C2-like doména. Ta má jen nízkou míru homologie s C2 doménou PKC kináz. C2 doména u klasických PKC kináz je závislá na Ca²⁺ a může se vázat na cytoplazmatickou membránu. Oproti tomu je C2-like doména necitlivá vůči Ca²⁺. C2-like zřejmě umožňuje interakci s lipidy a následnou aktivaci PKN kináz (Nalefski and Falke, 1996). Mezi C2-like doménou a kinázovou doménou je u PKN2 jedna polyprolinová oblast. U PKN3 jsou takovéto oblasti dvě. Ve struktuře PKN1 žádné polyprolinové oblasti nejsou (Mukai, 2003). Tyto polyprolinové oblasti mohou vázat

proteiny, které mají ve své struktuře SH3 (Src-homology 3) doménu (Quilliam *et al.*, 1996; Gemperle *et al.*, 2019).



Obrázek 3: Struktura kináz PKN. Na N-terminálním konci se nacházejí 3 HR1 domény a C2-like doména, za kterou se na PKN3 nacházejí 2 polyprolinové oblasti. U PKN2 je tato oblast jen jedna. Ve struktuře PKN1 není žádná polyprolinová oblast. Na C-terminálním konci PKN kináz je kinázová doména. Thr, na kterých probíhá fosforylace, jsou v kinázové doméně na obrázku vyznačené. Oblasti vyznačené na C-terminálním konci C2-like domény se zapojují do vzniku dimerů (Sophocleous, Owen and Mott, 2021).

3.3. Aktivace PKN kináz

Jako první aktivátory PKN kináz, přesněji PKN1, byly identifikovány nenasyčené mastné kyseliny, jako jsou kyselina olejová, kyselina linoleová a především kyselina arachidonová, která má značný vliv na aktivitu PKN1 (Mukai *et al.*, 1994). PKN1 reaguje na aktivaci nenasyčenými mastnými kyselinami nejsilněji z této rodiny kináz. Dochází u ní k několikanásobnému zvýšení kinázové aktivity. Kinázová aktivita PKN2 je po působení nenasyčených mastných kyselin zvýšena zhruba o víc jak polovinu (Yu *et al.*, 1997), což je mnohem méně než u PKN1. Arachidonová kyselina je také schopná odstranit autoinhibici PKN, a zvýšit tak jejich schopnost autofosforylace a aktivace. Tento jev je opět nejvýraznější u PKN1. Vliv arachidonové kyseliny na aktivaci PKN3 je velmi malý (Oishi *et al.*, 1999).

PKN1 může být aktivována i fosfolipidy jako jsou fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃) nebo fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) (Palmer *et al.*, 1995). PKN2 nereaguje na aktivaci pomocí fosfatidylserinu nebo diacylglycerolu (Yu *et al.*, 1997). Na rozdíl od PKC,

kteřá je aktivovaná díky Ca^{2+} , dojde při působení Ca^{2+} na PKN1 k výraznému utlumení její kinázové aktivity o více než 97 %. Utlumení aktivity PKN1 způsobují i Mn^{2+} (Kitagawa *et al.*, 1995). PKN2 je vůči působení Ca^{2+} necitlivá (Yu *et al.*, 1997).

Fosforylace Thr774 (Thr816/PKN2; Thr718/PKN3); pomocí PDK1 v aktivační smyčce PKN1 umožňuje aktivaci její kinázové aktivity (Dong *et al.*, 2000). Počátečním impulzem pro vazbu mezi PKN1 a PDK1 je GTPáza Rho. Aktivovaný protein Rho, který má navázané GTP, interaguje s PKN1 a umožňuje tak následnou vazbu PDK1 (Flynn *et al.*, 2000). Fosforylovaný hydrofobní motiv PKN1 interaguje s PIF-kapsou na PDK1. Tím dojde k její aktivaci a PDK1 je následně schopná fosforylovat threonin v aktivační klíče PKN1. Poté hydrofobní motiv PKN1 interaguje s PIF-kapsou PKN1. Dojde tak k její stabilizaci a plné aktivaci (Arencibia *et al.*, 2013; Sophocleous, Owen and Mott, 2021). Tento model funguje i u kinázy PKN2 (Dettori *et al.*, 2009). Pravděpodobně tímto způsobem bude aktivována i PKN3.

Aktivita kináz PKN je ovlivněná i jejich schopností tvořit dimery. Díky tomu jsou schopné sami sebe inhibovat. Dochází k intermolekulární interakci mezi hydrofobním motivem a PIF-kapsou dvou molekul PKN kináz. Tím vznikne dimer, který neumožňuje navázání PDK1 (Bauer *et al.*, 2012). Dimery PKN kináz mohou být rozrušeny působením Rho GTPáz nebo jiných aktivátorů PKN kináz. Po rozvolnění dimeru je opět umožněna vazba PDK1 a aktivace kinázy PKN.

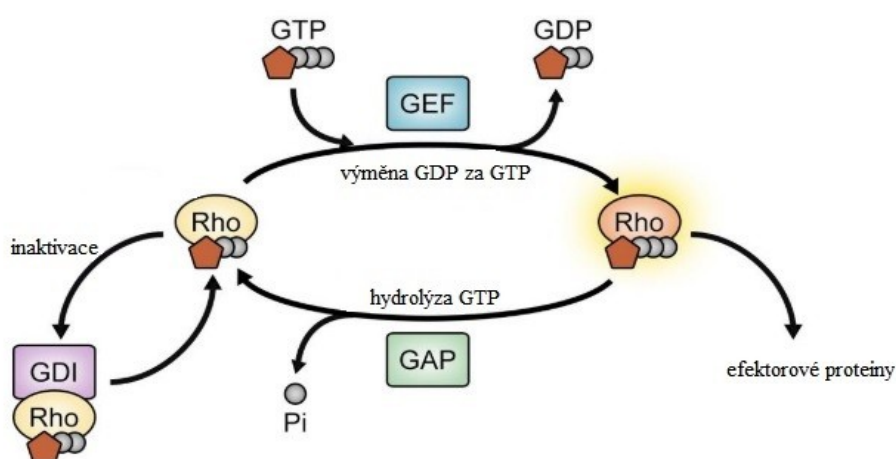
Aktivace PKN kináz je iniciována navázáním Rho GTPáz. Ty se váží na PKN kinázy v oblasti HR1 domén (Hutchinson *et al.*, 2013). Tato vazba zřejmě způsobuje změnu konformace PKN kináz, a je tak následně umožněna jejich aktivace.

3.3.1. Rho GTPázy

Hlavními regulátory aktivace PKN kináz jsou malé Rho GTPázy. Jsou to zhruba 21kDa velké G proteiny, které patří do superrodiny GTPáz Ras. Mezi nejznámější proteiny z rodiny Rho patří Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB a RhoC.

3.3.1.1. Regulace Rho GTPáz

Rho GTPázy fungují jako molekulární přepínače. Jsou aktivovány navázáním GTP, což vede ke změně jejich konformace a schopnosti navázat se na cílový protein. Na regulaci přechodů Rho GTPáz mezi aktivním a inaktivním stavem se podílejí GEF (guanine nucleotide exchange factor), GAP (GTPase-activating protein) a GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) proteiny (Obrázek 4). Aby došlo k aktivaci Rho GTPázy, musí dojít k výměně navázaného GDP za GTP. To je uskutečněno za pomoci GEF proteinů. Aktivované Rho GTPázy s navázaným GTP mohou vstupovat do interakcí s dalšími proteiny a spouštět různé signální kaskády. Naopak GAP proteiny inaktivují Rho GTPázy, protože napomáhají hydrolyze navázaného GTP na GDP. Spolupráce GEF a GAP proteinů je nezbytná pro správnou regulaci aktivity Rho GTPáz (Bishop and Hall, 2000; Zegers and Friedl, 2014; Haga and Ridley, 2016). Aktivaci, respektive inhibici, Rho GTPáz ovlivňují i GDI proteiny, které inhibují Rho GTPázy. GDI proteiny se naváží na Rho GTPázy v cytoplasmě, popřípadě je extrahují z cytoplasmatické membrány a udržují je v cytoplasmě v neaktivním stavu (Garcia-Mata, Boulter and BurrIDGE, 2011).



Obrázek 4: Schéma regulace Rho GTPáz. GEF proteiny aktivují Rho GTPázy výměnou GDP za GTP. Naopak GAP proteiny hydrolyzují navázané GTP na GDP, čímž Rho GTPázy inaktivují. GDI proteiny se váží na Rho GTPázy a udržují je v inaktivovaném stavu (upraveno podle Kim, Lee and Park, 2019).

3.3.1.2. *Vliv Rho GTPáz na pohyb buněk*

Rho GTPázy jsou známé především svým vlivem na regulaci aktinového cytoskeletu. Jsou schopné regulovat formování a dynamiku aktinových vláken. Ovlivňují například Arp2/3 komplex, který umožňuje rozvětvení aktinových vláken (Mullins and Pollard, 1999; Goley and Welch, 2006). Rho GTPázy interagují i s forminy (Watanabe *et al.*, 1997). Ty napomáhají tvorbě a stabilizaci dlouhých nevětvených aktinových vláken (Kühn and Geyer, 2014). To má následně vliv na buněčnou morfogenezi, polaritu a adhezi buněk. V neposlední řadě ovlivňují Rho GTPázy buněčnou migraci (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Rho GTPázy jsou spojené s tvorbou lamelipodií. To jsou struktury, ve kterých dochází k polymeraci aktinu a tvorbě aktinových vláken. Tvorba lamelipodií způsobuje protahování membrány. Vzniklé membránové napětí, spolu se zanikáním původních adhezivních spojů a tvorbou nových, umožňuje pohyb buňky ve směru tvorby lamelipodií (Ridley and Hall, 1992; Farooqui and Fenteany, 2005).

3.3.1.3. *RhoA/RhoB/RhoC a nádory*

Aktivita Rho GTPáz je zvýšená během rozvoje nádorového onemocnění. Jejich zvýšená aktivita může být způsobena změnami v expresi nebo fungování jejich GEF, GAP a GDI regulátorů. RhoA a RhoC byly identifikovány ve větším množství například v nádorech epitelálního původu (Porter, Papaioannou and Malliri, 2016). RhoA i RhoB podporují nádorovou transformaci fibroblastů a zároveň zvyšují schopnost těchto nádorových buněk tvořit metastázy. Exprese RhoC je značně zvýšená v nádorech, které jsou schopné tvořit velké množství metastáz (Van Golen *et al.*, 2000; Wheeler and Ridley, 2004). Naopak u některých typů nádorů, jako jsou nádory plic nebo žaludku, byla zjištěna nižší exprese RhoB než v normální tkáni. Proto zvýšením množství RhoB v těchto nádorových buňkách, bylo možné značně omezit buněčnou proliferaci a migraci buněk (Mazieres *et al.*, 2004). Toto neplatí u všech typů nádorů, protože vyšší exprese RhoB byla zjištěna třeba u nádorů prsu. V těchto nádorech exprese RhoB naopak napomáhá rozvoji nádoru (Fritz *et al.*, 2002; Haga and Ridley, 2016).

3.4. Funkce PKN kináz v buňkách

Nejlépe popsaná je kináza PKN1, která byla objevena a zkoumána jako první z této rodiny kináz. Z toho důvodu je identifikováno nejvíce jejích funkcí, substrátů a také to, jak ovlivňuje buněčné procesy. Naopak nejméně prozkoumaná je PKN3, o které je známo, že se ve většině normálních tkání vyskytuje jen v malém množství, ale zato je výrazně zastoupena v rakovinových buňkách (Oishi *et al.*, 1999).

Funkce kináz z rodiny PKN je velmi rozmanitá, protože se podílejí na mnoha odlišných buněčných procesech. Kinázy z této rodiny se velmi často účastní různých přestaveb cytoskeletu, které pak následně mohou ovlivňovat morfologii a pohyblivost buněk. PKN1 interaguje skrz svou N-terminální doménu s α -aktininen (Mukai *et al.*, 1997), což je protein, který váže vlákna aktinu. α -Aktinin tvoří Z-disky v sarkomerách svalových buněk. V těchto strukturách jsou ukotvena aktinová vlákna. Z-disky tak slouží jako lešení. V buňkách, které netvoří svalovou tkáň se α -aktinin nachází také, jen netvoří Z-disky sarkomer. α -Aktinin je schopný propojovat cytoskelet s transmembránovými proteiny, a tak slouží jako můstek pro přenos signálu z vnějšího prostředí do buňky. Zároveň do jisté míry zajišťuje strukturální stabilitu buněčných spojů a stabilitu adhezivních molekul v rámci cytoplasmatické membrány (Otey and Carpen, 2004). PKN1 sama o sobě není přímo schopná fosforylovat α -aktinin. Po stimulaci PKN1 pomocí kyseliny arachidonové, došlo sice k fosforylaci α -aktinin, ale jen nepatrně (Mukai *et al.*, 1997). PKN1 se bude zřejmě zapojovat do interakcí s dalšími molekulami, které budou ovlivňovat α -aktinin a cytoskelet. Jako substráty pro PKN1 byly také označeny například i kaldesmon a G-aktin. Jejich fosforylace také zřejmě přispívá k přestavbám aktinového cytoskeletu (Mukai *et al.*, 1997). Dalším příkladem vlivu PKN kináz na cytoskelet je, že aktivita PKN kináz spolu s PDK1 vede k reorganizaci a rozpadu aktinových stresových vláken (Dong *et al.*, 2000). PKN kinázy váží a fosforylují i intermediální filamenta a ovlivňují jejich polymerizaci. Jedná se například o fosforylaci head-rod domény vimentinu díky PKN1 a následnému rozpadu vimentinových vláken (Matsuzawa *et al.*, 1997). PKN1 fosforylací v head-rod doméně rozrušuje také neurofilamenta a negativně tím ovlivňuje axonální transport (Mukai *et al.*, 1996; Manser *et al.*, 2008).

S přestavbami cytoskeletu způsobenými PKN kinázami lze také spojit vliv těchto kináz na adhezi buněk (Möpert *et al.*, 2012). PKN3 má zřejmě vliv na glykosylaci adhezivních molekul, jako jsou integriny nebo ICAM-1. Glykosylace adhezivních molekul

jsou potřeba pro správné interakce buněk s okolím (Mukai *et al.*, 2016). Adhezivní interakce mezi nádorovými buňkami jsou zásadní pro uvolnění buněk od primárního nádoru a jejich prostoupení cévním endotelem. Následně mají adhezivní interakce vliv i na extravazaci rakovinových buněk a tvorbu sekundárních nádorových ložisek.

Během studií se prokázalo, že použití 3D kultur při studiu pohybu nádorových buněk umožňuje získání výsledků, které lépe reprezentují fyziologické podmínky v organismu, než použití 2D kultur. Mohla tak například být prokázána spojitost mezi aktivitou PKN3 a invazivitou buněk (Leenders *et al.*, 2004). V další studii bylo zjištěno, že ne jen PKN3, ale i PKN1 a PKN2 jsou zapojené do 3D pohybu buněk a zřejmě se tak, spolu s PKN3, mohou podílet na tvorbě metastáz. Jejich vliv ale není tak výrazný, jako vliv PKN3. Na druhou stranu, na 2D pohyb mají vliv především PKN1 a PKN2, ale už ne PKN3 (Lachmann *et al.*, 2011). Všechny izoformy PKN kináz ovlivňují rakovinové buňky, především pak jejich schopnost migrovat a proliferovat (Sophocleous, Owen and Mott, 2021).

Působení PKN kináz může vést i k remodelaci chromatinu a následně k ovlivnění transkripce (Metzger *et al.*, 2008). Po přijetí signálu přes androgenní receptor, dojde k interakci mezi aktivovaným Rho proteinem a PKN1. PKN1 následně translokuje do jádra a fosforyluje histon H3 na Thr11, což vede k demethylaci Lys9 na stejném histonu. Tím dojde k aktivaci exprese genů spojených s androgenním receptorem. Bylo dokázáno, že spolupůsobení PKN1 a androgenních receptorů má vliv na rozvoj rakoviny prostaty (Metzger *et al.*, 2003, 2008).

Kinázy PKN1 a PKN2 jsou zapojeny také do regulace buněčného cyklu. Jsou schopné fosforylovat, a tak aktivovat, některé molekuly nezbytné pro vstup buňky do mitotické fáze buněčného cyklu. Jedná se například o fosfatázu Cdc25 (Schmidt *et al.*, 2007). Správná funkce PKN2 je také nezbytná během embryonálního vývoje. Během pokusů na myších embryích, ve kterých byla PKN2 inaktivovaná, nebyla taková embrya životaschopná. Docházelo u nich k defektům kardiovaskulárního systému, neurální lišty a ke kolapsu mesodermu. PKN1 ani PKN3 zřejmě nejsou nutné během vývoje, protože jejich inaktivace nezpůsobila fatální změny (Quétier *et al.*, 2016).

3.5. PKN3

3.5.1. Distribuce PKN3 v tkáních

Na rozdíl od PKN1 a PKN2, které jsou v normálních tkáních vcelku hojně exprimované (Kitagawa *et al.*, 1995; Quilliam *et al.*, 1996), je PKN3 v běžných tkáních téměř nedetekovatelná (Oishi *et al.*, 1999). Zato byla exprese PKN3 ve vyšší míře zjištěna v různých nádorových buněčných liniích. Například v HeLa buňkách, v myeloidních buňkách pacientů postižených chronickou myeloidní leukemií (Oishi *et al.*, 1999) nebo také v liniích odvozených z nádorů prsu a prostaty (Leenders *et al.*, 2004; Unsal-Kacmaz *et al.*, 2012). PKN3 je také exprimovaná v osteoklastech a podílí se na remodelaci kostní tkáně (Uehara *et al.*, 2017). Zvýšená exprese PKN3 byla zjištěna i v endoteliálních buňkách, kde zřejmě ovlivňuje permeabilitu endotelu (Aleku *et al.*, 2008; Santel *et al.*, 2010; Möpert *et al.*, 2012).

Uvnitř buněk byla PKN3 detekována v oblasti jádra a Golgiho aparátu. Oproti tomu PKN1 se nachází především v cytoplasmě (Oishi *et al.*, 1999; Unsal-Kacmaz *et al.*, 2012). Na druhou stranu, se PKN3 nachází i v oblastech u cytoplasmatické membrány, ve kterých dochází ke vzniku lamelipodií a invadopodií (Uehara *et al.*, 2017; Gemperle *et al.*, 2019).

3.5.2. PKN3 jako efektor PI3K

Fosfatidylinositol-3-kináza nebo také fosfoinositid-3-kináza (PI3K) patří do skupiny kináz, které jsou schopné fosforylovat hydroxylovou skupinu na třetí pozici na inositolovém kruhu fosfoinositidů. Vznikají tak 3-fosfoinositidy, jako jsou fosfatidylinositol 3-fosfát (PI(3)P), fosfatidylinositol 3,4-bisfosfát (PI(3,4)P₂) a fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát (PI(3,4,5)P₃ nebo zkráceně PIP₃) (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Leever, Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999; Katso *et al.*, 2001). Produkty této kinázy následně slouží jako druzí posílí v buněčné signalizaci. Umožňují amplifikaci signálu přijatého buňkou a spouští signální kaskády, které pak vedou k rozmanitým buněčným jevům. PI3K a její produkty ovlivňují buněčnou proliferaci, růst, apoptózu nebo i buněčný metabolismus (Katso *et al.*, 2001).

Aktivita PI3K je kontrolována pomocí tumor supresoru PTEN. PTEN funguje jako antagonistu PI3K, protože způsobuje defosforylaci produktů PI3K (Maehama and Dixon, 1998). Napomáhá tak k udržení jejich optimální koncentrace v buňce. Pokud ovšem dojde k inaktivaci tumor supresoru PTEN, ke které může dojít například mutací v genu kódujícímu PTEN, zvýší se koncentrace produktů PI3K. To zapříčiní nadměrnou aktivaci signálních drah, do kterých se PI3K, potažmo její produkty, zapojují. Dochází například k nadměrné

proliferaci buněk a nižší citlivosti k navození apoptózy. Ztráta funkce tumor supresoru PTEN v nádorových buňkách, vede ke zvýšení jejich schopnosti tvořit metastáze (Wang *et al.*, 2003). Mutace v tomto tumor supresoru jsou vcelku časté a byly zjištěny v poměrně velkém množství nádorů. Inaktivní PTEN byl zjištěn například u nádorů prostaty, prsu nebo v glioblastomech (Li *et al.*, 1997).

Aktivace PI3K ovlivňuje expresi i aktivitu PKN3. Hyperaktivace PI3K vede ke zvýšení exprese PKN3. Kinázová aktivita PKN3 je nepřímo ovlivněna působením PI3K, protože PKN3 není přímým efektozem PI3K (Leenders *et al.*, 2004). PKN3 je stejně jako PKN1 a PKN2 aktivovaná pomocí PDK1 (Dong *et al.*, 2000). PDK1 se dokáže vázat na PIP₃, který je produktem PI3K. Tato vazba následně umožňuje PDK1 vstupovat do dalších interakcí a ovlivňovat tak další efektorové molekuly (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Mezi nimi mohou být i kinázy PKN, které jsou také aktivované po vazbě PDK1, ačkoli to není jediný způsob jejich aktivace, jak už bylo zmíněno výše (Dong *et al.*, 2000).

3.5.3. Vliv PKN3 na invazivitu nádorových buněk

Všechny kinázy z rodiny PKN jsou exprimované v nádorových buňkách, kde ovlivňují různé fyziologické procesy, mezi kterými je například buněčná proliferace a polarizace, angiogeneze nebo tvorba metastáz (Leenders *et al.*, 2004; Mukai *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2020). Právě schopnost nádoru tvořit metastáze je velice nebezpečná a značně snižuje naději pacienta na přežití. Buňky, které se odloučí od primárního nádoru, se dostávají z místa jeho vzniku do okolních tkání a pronikají do krevního řečiště. Následně jsou krevním řečištěm roznášeny do celého těla, kde po extravazaci zakládají v okolní tkáni sekundární nádorová ložiska.

K tomu, aby mohlo dojít k uvolnění buněk z primárního nádoru, je nutné, aby došlo ke změnám ve vlastnostech těchto buněk. K uvolnění buněk je potřeba rozvolnění jejich spojů s okolními buňkami a extracelulární matrix. Mezi molekuly, které ovlivňují buněčnou adhezi patří například kadheriny, které zprostředkovávají interakce mezi buňkami, a integriny, které propojují buňky s extracelulární matrix (Hanahan and Weinberg, 2000). Inaktivace funkce E-kadherinu v rakovinových buňkách vede ke zlepšení jejich schopnosti odlučovat se od ostatních buněk, pronikat do okolních tkání a tvořit metastáze (Vleminckx *et al.*, 1991). Změny v expresi integrinů umožňují nádorovým buňkám jejich uvolnění v rámci extracelulární matrix. Nádorové buňky dovedou utlumit expresi jednoho typu integrinů, a naopak zvýšit expresi jiného typu. Nově produkované integriny jim umožňují jiné vlastnosti

v kontextu rozvoje nádoru. Mohou tak vést k indukci migrace, proliferace nebo angiogeneze (Guo and Giancotti, 2004). Samotný pohyb buněk je pak zprostředkován přestavbami aktinového cytoskeletu, které vedou k formování stresových vláken a lamelipodií. Tyto přestavby jsou ovlivňovány působením Rho GTPáz (Ridley and Hall, 1992; Nobes and Hall, 1995; Roymans and Slegers, 2001).

S PKN3 mohou interagovat GTPázy RhoA, RhoB i RhoC, ale preferenčně interaguje s RhoC (Unsal-Kacmaz *et al.*, 2012). Jiná studie ale tvrdí, že se PKN3 především váže s RhoB (Hutchinson *et al.*, 2013). Projevy zvýšené exprese PKN3 v nádorových buňkách jsou podobné spíše projevům GTPázy RhoC než RhoB (Hakem *et al.*, 2005). Vazba s RhoC, a následně i s PDK1, značně zvyšuje kinázovou aktivitu PKN3. Komplex PKN3 a RhoC podporuje maligní projev rakoviny prsu (Unsal-Kacmaz *et al.*, 2012). Samotná exprese RhoC je zvýšená během rozvoje rakoviny prsu, prostaty a slinivky břišní. Nadměra RhoC se následně projevuje zvýšením invazivity nádorových buněk a zvýšením tvorby metastáz (Suwa *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2002; Hakem *et al.*, 2005; Iizumi *et al.*, 2008). Stejně jako RhoC, i PKN3 ovlivňuje tvorbu metastáz a pohyb buněk (Leenders *et al.*, 2004). Inhibice PKN3 ani RhoC nemá zásadní vliv na vývoj, ani na funkci tkání (Hakem *et al.*, 2005; Mukai *et al.*, 2016), proto jsou ideálním cílem, pro boj s maligními nádory. V tomto smyslu snížení množství PKN3 v primárním nádoru vedlo i k omezení tvorby metastáz (Leenders *et al.*, 2004). PKN3 není nezbytná pro angiogenezi, protože její výpadek je zřejmě vykompenzován působením PKN1 a PKN2 (Mukai *et al.*, 2016). Neplatí ale, že by PKN1 nebo PKN2 dokázaly kompletně vykompenzovat inhibici PKN3. Pokud dojde k takovéto inhibici, dojde ke značnému snížení tvorby metastáz a pohybu buněk (Leenders *et al.*, 2004).

Rho GTPázy jsou regulátory PKN3, ale i sama PKN3 dokáže zpětně regulovat aktivitu Rho GTPáz. PKN3 se přímo váže i s ARHGAP18 (Rho GTPase Activating Protein 18) a fosforyluje ho (Dibus, Brábek and Rösel, 2020). ARHGAP18 dokáže regulovat aktivitu GTPázy RhoA tím, že utlumuje její aktivitu a zabraňuje tak tvorbě stresových vláken. ARHGAP18 je lokalizován v oblasti vedoucího okraje buňky. Zde zřejmě svým vlivem na aktivitu RhoA ovlivňuje protahování buněčné membrány (Maeda *et al.*, 2011). Fosforylace ARHGAP18 vede k aktivaci jeho GAP domény, což má za následek snížení množství aktivního RhoA. PKN3 je tedy schopná svým působením regulovat aktivitu molekuly, která může být jeho vlastním aktivátorem (Dibus, Brábek and Rösel, 2020).

PKN3 se nachází také v invadopodiích a lamelipodiích, což jsou oblasti bohaté na aktin (Uehara *et al.*, 2017; Gemperle *et al.*, 2019). Tyto struktury mají vliv na buněčnou adhezi a buněčný pohyb. S tím je spojeno, že PKN3 se podílí na reorganizacích aktinového cytoskeletu, tvorbě stresových vláken a na buněčné adhezi (Möpert *et al.*, 2012). Ve spojitosti s tím, bylo prokázáno, že PKN3 může přímo interagovat s p130Cas/BCAR1 (p130 Crk-associated substrate/breast cancer anti-estrogen resistance 1), díky své polyprolinové doméně a SH3 (Src homology3) doméně ve struktuře p130Cas/BCAR1 (Mukai, 2003; Camacho Leal *et al.*, 2015; Gemperle *et al.*, 2017). p130Cas/BCAR1 má prokázaný vliv na migraci buněk a tvorbu metastáz (Defilippi, Di Stefano and Cabodi, 2006; Tikhmyanova, Little and Golemis, 2010; Gemperle *et al.*, 2019). PKN3 kolokalizuje s p130Cas/BCAR1 v invadopodiích a lamelipodiích, a dokáže p130Cas/BCAR1 přímo fosforylovat. Navíc interakce mezi PKN3 a p130Cas/BCAR1 je nezbytná pro agresivnější maligní projev rakoviny prsu (Gemperle *et al.*, 2019).

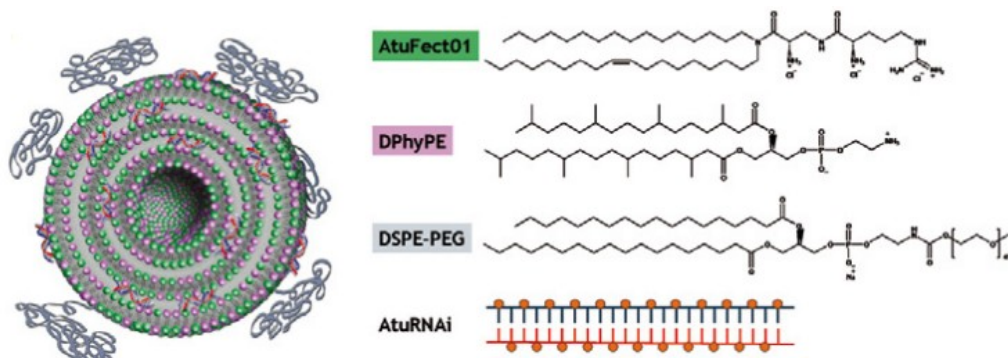
PKN3 ovlivňuje i adhezivní molekuly, které jsou nutné pro průnik nádorových buněk přes endotel a dál do tkání. Aktivita PKN3 nepřímo ovlivňuje glykosylaci některých endoteliálních povrchových adhezivních molekul jako jsou ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), integrin $\beta 1$ a integrin $\alpha 5$. Defekty v glykosylaci těchto adhezivních molekul byly zjištěny na modelu PKN3 knockout (KO) myši, ve které byl inaktivován gen kódující PKN3. Tyto defekty glykosylací mohou mít následně vliv na možnost přechodu nádorových buněk přes endotel. Tím dojde k zamezení jejich průniku do okolní tkáně a inhibici tvorby metastáz (Mukai *et al.*, 2016). Ke tvorbě metastáz, tak zřejmě přispívá i exprese PKN3 v tělních tkáních. Během pokusů s PKN3 KO myšmi byly tyto myši infikovány buňkami melanomu. Po 14 dnech byly myši zabity a ukázalo se, že PKN3 KO myši měli v plicích mnohem méně metastáz než myši, ve kterých nebyla PKN3 inaktivovaná (Mukai *et al.*, 2016).

3.5.4. Využití inhibice PKN3 v protinádorové terapii

Expres PKN3 je značně zvýšená v nádorových buňkách (Oishi *et al.*, 1999) a výsledky studií ukazují, že je nezbytná pro tvorbu metastáz (Leenders *et al.*, 2004; Aleku *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu se objevily pokusy s inaktivací PKN3, které by mohly být využity v terapii nádorových onemocnění.

Jedním z použitých přístupů bylo indukované snížení exprese PKN3 pomocí shRNA (short hairpin RNA) interference. Toto snížení exprese mělo za následek značný pokles tvorby metastáz u PC-3 buněk (lidská buněčná linie rakoviny prostaty). Tato inhibice ale neměla nijak výrazný vliv na primární nádor (Leenders *et al.*, 2004).

Na principu RNA interference funguje i Atu027. To je léčebný přípravek, cílený přímo proti PKN3. Atu027 je liposomální částice, ve které je uložena siRNA (short interfering RNA) cílená proti expresi PKN3 (Obrázek 5). Působením Atu027 pravděpodobně dochází k zamezení průchodu nádorových buněk přes cévní endotel. Inhibice exprese PKN3 pomocí Atu027 zřejmě nemá vliv na proliferaci buněk, ale zato výrazně omezuje tvorbu metastáz (Aleku *et al.*, 2008). V rámci testování Atu027 byly myším do těla vpraveny nádorové buňky melanomu. U myší, kterým byl podáván přípravek Atu027, bylo zjištěno velmi výrazné snížení množství plicních metastáz. Atu027 by mohlo také sloužit jako podpůrný prostředek proti spontánní tvorbě metastáz po provedení resekce (Santel *et al.*, 2010). Atu027 prošlo první fází klinického testování, kterého se zúčastnilo 34 pacientů s velmi pokročilým stádiem rakoviny. Jednalo se především o pacienty s rakovinou prsu, slinivky břišní a tlustého střeva. Zhruba u 52 % pacientů došlo ke stabilizaci jejich nemoci. Ve skutečnosti došlo ke stabilizaci ve zhruba 41 % případů, protože 9 pacientů nedostalo plný počet dávek přípravku, z důvodu zhoršení jejich zdravotního stavu. Tato studie také ukázala, že Atu027 zřejmě nemělo žádné závažné vedlejší účinky na organismus pacientů (Schultheis *et al.*, 2014). Atu027 bylo v další fázi testováno v kombinaci s gemcitabinem u pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní. Gemcitabin je cytostatický lék, který se používá při léčbě rakoviny močového měchýře, plic, vaječnicků nebo slinivky břišní. I během této studie se ukázalo, že Atu027 zřejmě není toxický pro lidský organismus. Použití Atu027 během této studie, zřejmě zapříčinilo stabilizaci onemocnění, jako v předchozí studii. Bylo také pozorováno, že u pacientů došlo ke snížení množství onkogenních markerů (Schultheis *et al.*, 2020).



Obrázek 5: Struktura částice Atu027. AtuFect01, DPhyPE a DSPE-PEG jsou lipidy, které tvoří obal, ve kterém je uložena siRNA cílená proti PKN3. Takovýto lipidový obal umožňuje propojení částice s cytoplasmatickou membránou, její průnik do buňky a následné uvolnění siRNA (Shaikh *et al.*, 2017).

4. Závěr

Rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Ročně na rakovinu zemřou miliony lidí po celém světě. Nejčastěji se jedná o rakoviny prsu, prostaty, plic, tlustého střeva, kůže a mnoho dalších. Na rozvoj nádorového onemocnění má vliv mnoho faktorů. Od životního stylu, přes genetické predispozice, po působení chemikálií a vnějších vlivů na lidský organismus.

Některá nádorová bujení mohou být neškodná. Příkladem jsou třeba bradavice nebo tvorba nezhoubného tukového nádoru, lipomu. Naopak velmi nebezpečné jsou maligní nádory, za jejichž zhoubné vlastnosti je zodpovědná jejich schopnost zakládat po těle pacienta sekundární ložiska (metastáze). Metastáze poškozují tkáň a značně snižují pacientovu naději na uzdravení. Toto je důvod, proč je nezbytné hledat vhodné molekuly nebo interakce molekul, proti kterým by mohla být vyvinuta cílená léčba. Taková, která by zabránila růstu nádoru, tvorbě metastáz, anebo by nádor přímo cíleně zničila. Mezi takovými molekulami je i kináza PKN3, která má prokázaný vliv na vznik metastáz. Je také vhodným terapeutickým cílem, protože její inhibice zřejmě nemá negativní vliv na normální tělní tkáň. Zato bylo prokázáno, že inhibice PKN3 značně omezuje tvorbu metastáz.

Kinázy z rodiny PKN se zapojují do mnoha buněčných procesů, ale přesné mechanismy jejich působení nejsou zcela objasněny. Stejně jako nejsou zcela známy jejich substráty nebo jejich interakce s dalšími molekulami. Další prohlubování znalostí o působení PKN kináz v buňkách, jejich vlivu na rozvoj rakoviny a dalších patologií, na které mají PKN kinázy vliv, by bylo přínosem nejen z pohledu biologie, ale i z pohledu medicíny.

5. Zdroje

(review jsou označeny hvězdičkou)

Aleku, M. *et al.* (2008) ‘Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression’, *Cancer Research*, 68(23), pp. 9788–9798.

Amano, M. *et al.* (1996) ‘Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N’, *Science*, 271(5249), pp. 648–650.

*Arencibia, J. M. *et al.* (2013) ‘AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases’, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. *Biochim Biophys Acta*, pp. 1302–1321.

Bauer, A. F. *et al.* (2012) ‘Regulation of protein kinase C-related Protein Kinase 2 (PRK2) by an intermolecular PRK2-PRK2 interaction mediated by its N-terminal domain’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), pp. 20590–20602.

Biondi, R. M. *et al.* (2000) ‘Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA’, *EMBO Journal*, 19(5), pp. 979–988.

*Bishop, A. L. and Hall, A. (2000) ‘Rho GTPases and their effector proteins’, *Biochemical Journal*, pp. 241–255.

*Camacho Leal, M. del P. *et al.* (2015) ‘P130Cas/BCAR1 scaffold protein in tissue homeostasis and pathogenesis’, *Gene*. Elsevier B.V., pp. 1–7.

*Defilippi, P., Di Stefano, P. and Cabodi, S. (2006) ‘p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks’, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, pp. 257–263.

Dettori, R. *et al.* (2009) ‘Regulation of the interaction between protein kinase C-related protein kinase 2 (PRK2) and its upstream kinase, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), pp. 30318–30327.

Dibus, M., Brábek, J. and Rösel, D. (2020) ‘A screen for pkn3 substrates reveals an activating phosphorylation of arhgap18’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), pp. 1–17.

Dong, L. Q. *et al.* (2000) ‘Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp. 5089–5094.

*Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) ‘Rho GTPases in cell biology’, *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 629–635.

Farooqui, R. and Fenteany, G. (2005) ‘Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement’, *Journal of Cell Science*, 118(1), pp. 51–63.

Flynn, P. *et al.* (1998) ‘Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the HR1 repeat motif’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), pp. 2698–2705.

Flynn, P. *et al.* (2000) ‘Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), pp. 11064–11070.

Fritz, G. *et al.* (2002) ‘Rho GTPases in human breast tumours: Expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters’, *British Journal of Cancer*, 87(6), pp. 635–644.

Frödin, M. *et al.* (2002) ‘A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation’, *EMBO Journal*, 21(20), pp. 5396–5407.

*Garcia-Mata, R., Boulter, E. and Burridge, K. (2011) ‘The “invisible hand”: Regulation of RHO GTPases by RHOGDIs’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access, pp. 493–504.

Gemperle, J. *et al.* (2017) ‘Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners’, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–18.

Gemperle, J. *et al.* (2019) ‘The interaction of p130Cas with PKN3 promotes malignant growth’, *Molecular Oncology*, 13(2), pp. 264–289.

Van Golen, K. L. *et al.* (2000) ‘RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype’, *Cancer Research*, 60(20), pp. 5832–5838.

*Goley, E. D. and Welch, M. D. (2006) ‘The ARP2/3 complex: An actin nucleator comes of age’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 713–726.

- *Guo, W. and Giancotti, F. G. (2004) 'Integrin signalling during tumour progression', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 816–826.
- *Haga, R. B. and Ridley, A. J. (2016) 'Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology', *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc., pp. 207–221.
- Hakem, A. *et al.* (2005) 'RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis', *Genes and Development*, 19(17), pp. 1974–1979.
- *Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *Cell*. Elsevier, pp. 57–70.
- Hauge, C. *et al.* (2007) 'Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation', *EMBO Journal*, 26(9), pp. 2251–2261.
- Hutchinson, C. L. *et al.* (2013) 'Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB', *Biochemistry*, 52(45), pp. 7999–8011.
- Iizumi, M. *et al.* (2008) 'RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer', *Cancer Research*, 68(18), pp. 7613–7620.
- *Katso, R. *et al.* (2001) 'Cellular function of phosphoinositide 3-Kinase: Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer', in *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 615–675.
- *Kim, K., Lee, S.-A. and Park, D. (2019) 'Emerging Roles of Ephexins in Physiology and Disease', *Cells*, 8(2), p. 87.
- Kitagawa, Michinori *et al.* (1995) 'Purification and characterization of a fatty acid-activated protein kinase (PKN) from rat testis', *Biochemical Journal*, 310(2), pp. 657–664.
- Kitagawa, M. *et al.* (1995) 'Purification and characterization of a fatty acid-activated protein kinase (PKN) from rat testis', *Biochemical Journal*, 310(2), pp. 657–664.
- Knighton, D. R. *et al.* (1991) 'Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase', *Science*, 253(5018), pp. 407–414.
- *Kühn, S. and Geyer, M. (2014) 'Formins as effector proteins of rho GTPases', *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc.

Lachmann, S. *et al.* (2011) 'Regulatory domain selectivity in the cell-type specific PKN-dependence of cell migration', *PLoS ONE*, 6(7), p. 21732.

Leenders, F. *et al.* (2004) 'PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase', *EMBO Journal*, 23(16), pp. 3303–3313.

*Leevers, S. J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. (1999) 'Signalling through phosphoinositide 3-kinases: The lipids take centre stage', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), pp. 219–225.

*Leroux, A. E., Schulze, J. O. and Biondi, R. M. (2018) 'AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development', *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, pp. 1–17.

Li, J. *et al.* (1997) 'PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer', *Science*, 275(5308), pp. 1943–1947.

Maeda, M. *et al.* (2011) 'ARHGAP18, a GTPase-activating protein for RhoA, controls cell shape, spreading, and motility', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by J. C. Adams, 22(20), pp. 3840–3852.

Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998) 'The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate', *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), pp. 13375–13378.

Manser, C. *et al.* (2008) 'Deregulation of PKN1 activity disrupts neurofilament organisation and axonal transport', *FEBS Letters*, 582(15), pp. 2303–2308.

Matsuzawa, K. *et al.* (1997) 'Domain-specific phosphorylation of vimentin and glial fibrillary acidic protein by PKN', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234(3), pp. 621–625.

Mazieres, J. *et al.* (2004) 'Loss of RhoB Expression in Human Lung Cancer Progression', *Clinical Cancer Research*, 10(8), pp. 2742–2750.

Metzger, E. *et al.* (2003) 'A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: Implications for PRK in prostate cancer', *EMBO Journal*, 22(2), pp. 270–280.

Metzger, E. *et al.* (2008) 'Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel

- chromatin mark for transcriptional regulation', *Nature Cell Biology*, 10(1), pp. 53–60.
- Möpert, K. *et al.* (2012) 'Depletion of protein kinase N3 (PKN3) impairs actin and adherens junctions dynamics and attenuates endothelial cell activation', *European Journal of Cell Biology*, 91(9), pp. 694–705.
- Mukai, H. *et al.* (1994) 'Activation of PKN, a Novel 120-kDa Protein Kinase with Leucine Zipper-like Sequences, by Unsaturated Fatty Acids and by Limited Proteolysis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204(1), pp. 348–356.
- Mukai, H. *et al.* (1996) 'PKN associates and phosphorylates the head-rod domain of neurofilament protein', *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), pp. 9816–9822.
- Mukai, H. *et al.* (1997) 'Interaction of PKN with α -actinin', *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), pp. 4740–4746.
- Mukai, H. (2003) 'The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC', *Journal of Biochemistry*, 133(1), pp. 17–27.
- Mukai, H. *et al.* (2016) 'PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice', *Scientific Reports*, 6.
- Mukai, H. and Ono, Y. (1994) 'A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: Its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase c', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(2), pp. 897–904.
- Mullins, R. D. and Pollard, T. D. (1999) 'Rho-family GTPases require the Arp2/3 complex to stimulate actin polymerization in *Acanthamoeba* extracts', *Current Biology*, 9(8), pp. 405–415.
- *Nalefski, E. A. and Falke, J. J. (1996) 'The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity', *Protein Science*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2375–2390.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995) 'Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia', *Cell*, 81(1), pp. 53–62.
- *Nolen, B., Taylor, S. and Ghosh, G. (2004) 'Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation', *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 661–675.

Oishi, K. *et al.* (1999) 'Identification and characterization of PKN β , a novel isoform of protein kinase PKN: Expression and arachidonic acid dependency are different from those of PKN α ', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3), pp. 808–814.

*Otey, C. A. and Carpen, O. (2004) ' α -actinin revisited: A fresh look at an old player', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, pp. 104–111.

Palmer, R. H. *et al.* (1995) 'Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: A comparison with protein kinase C isotypes', *Journal of Biological Chemistry*, 270(38), pp. 22412–22416.

Palmer, R. H., Ridden, J. and Parker, P. J. (1995) 'Cloning and Expression Patterns of two Members of A Novel Protein-kinase-C-related Kinase Family', *European Journal of Biochemistry*, 227(1–2), pp. 344–351.

Patel, H. *et al.* (2020) 'Novel roles of PRK1 and PRK2 in cilia and cancer biology', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12.

Porter, A. P., Papaioannou, A. and Malliri, A. (2016) 'Deregulation of Rho GTPases in cancer', *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc., pp. 123–138.

Quétier, I. *et al.* (2016) 'Knockout of the PKN Family of Rho Effector Kinases Reveals a Non-redundant Role for PKN2 in Developmental Mesoderm Expansion', *Cell Reports*, 14(3), pp. 440–448.

Quilliam, L. A. *et al.* (1996) 'Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), pp. 28772–28776.

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992) 'The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors', *Cell*, 70(3), pp. 389–399.

*Roymans, D. and Slegers, H. (2001) 'Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression', *European Journal of Biochemistry*. Eur J Biochem, pp. 487–498.

Santel, A. *et al.* (2010) 'Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models', *Clinical Cancer Research*, 16(22), pp. 5469–5480.

Schmidt, A. *et al.* (2007) ‘Rho GTPases regulate PRK2/PKN2 to control entry into mitosis and exit from cytokinesis’, *EMBO Journal*, 26(6), pp. 1624–1636.

Schultheis, B. *et al.* (2014) ‘First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors’, *Journal of Clinical Oncology*, 32(36), pp. 4141–4148.

Schultheis, B. *et al.* (2020) ‘Safety, efficacy and pharmacokinetics of targeted therapy with the liposomal RNA interference therapeutic atu027 combined with gemcitabine in patients with pancreatic adenocarcinoma. A randomized phase Ib/IIa study’, *Cancers*, 12(11), pp. 1–13.

Shaikh, M. H. *et al.* (2017) ‘Can gene editing and silencing technologies play a role in the treatment of head and neck cancer?’, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, pp. 9–19.

*Sophocleous, G., Owen, D. and Mott, H. R. (2021) ‘The structure and function of protein kinase C-related kinases (PRKs)’, *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd., pp. 217–235.

Suwa, H. *et al.* (1998) ‘Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas’, *British Journal of Cancer*, 77(1), pp. 147–152.

*Tikhmyanova, N., Little, J. L. and Golemis, E. A. (2010) ‘CAS proteins in normal and pathological cell growth control’, *Cellular and Molecular Life Sciences*. NIH Public Access, pp. 1025–1048.

Uehara, S. *et al.* (2017) ‘Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling’, *Science Signaling*, 10(494).

Unsal-Kacmaz, K. *et al.* (2012) ‘The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth’, *Molecular Oncology*, 6(3), pp. 284–298.

Vanhaesebroeck, B. *et al.* (1997) ‘Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers’, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends, pp. 267–272.

*Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. (2000) ‘The PI3K-PBK1 connection: More than just a road to PKB’, *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, pp. 561–576.

Vleminckx, K. *et al.* (1991) ‘Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role’, *Cell*, 66(1), pp. 107–119.

Wang, S. *et al.* (2003) 'Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer', *Cancer Cell*, 4(3), pp. 209–221.

Watanabe, N. *et al.* (1997) 'p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin', *EMBO Journal*, 16(11), pp. 3044–3056.

*Wheeler, A. P. and Ridley, A. J. (2004) 'Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility', *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc., pp. 43–49.

Yu, W. *et al.* (1997) 'Isolation and characterization of a structural homologue of human PRK2 from rat liver: Distinguishing substrate and lipid activator specificities', *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), pp. 10030–10034.

*Zegers, M. M. and Friedl, P. (2014) 'Rho GTPases in collective cell migration', *Small GTPases*, 5(3).

Zheng, J. *et al.* (1993) 'Crystal Structure of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with MgATP and Peptide Inhibitor', *Biochemistry*, 32(9), pp. 2154–2161.

Zdroj obrázku 1:

CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.. <https://www.cellsignal.com/> [online]. [cit. 28.4.2021].

Dostupný na WWW: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/agg-protein-kinase-group>