

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Zuzana Zálešáková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Testování a optimalizace nové metody pro stanovení
aktivity cytidinových deamináz za použití různých
buněčných linií**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Zálešáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: RNDr. Karel Koberna, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Karla Koberny, CSc. a na základě uvedených literárních zdrojů.

Dne 26. 4. 2017

Podpis

SOUHRN

Deaminázy jsou enzymy, které jsou součástí záchranné cesty syntézy nukleotidů. V organismech se vyskytují dva typy těchto enzymů, cytidin deamináza a deoxycytidylát deamináza. Zatímco cytidin deamináza katalyzuje přeměnu cytidinu a 2'-deoxycytidinu na uridin, respektive 2'-deoxyuridin, deoxycytidylát deamináza katalyzuje přeměnu 2'-deoxycytidinmonofosfátu na 2'-deoxyuridinmonofosfát. Velký význam mají tyto enzymy při léčbě nádorových a virových onemocnění cytidinovými analogy, protože velmi často způsobují deaminaci cytidinového analogu na uridinový analog. Tato proměna většinou vede k inaktivaci léčiv a tím ke snížení účinnosti léčby. Mimoto existuje velká variabilita v aktivitě obou deamináz mezi jednotlivými pacienty. To vede k odlišné účinnosti léčby nádorových a virových onemocnění.

V předkládané práci byly vyvinuty a testovány tři nové přístupy pro stanovení aktivity deamináz založené na deaminaci 5-etynyl-2'-deoxycytidinu na 5-etynyl-2'-deoxyuridin a následné inkorporaci vzniklého 5-etynyl-2'-deoxyuridinu do buněčné DNA. První metoda je založena na stanovení signálu inkorporovaného 5-etynyl-2'-deoxyuridinu pomocí fluorescenční mikroskopie, druhá využívá pro detekci signálu peroxidázu a následné stanovení absorbance. Třetí metoda je založena na stanovení signálu pomocí fluorescence měřené pomocí čtečky destiček. Jako nejlepší metoda byla vyhodnocena poslední jmenovaná. Tato metoda byla dále využita k testování deaminační aktivity u vybraných buněčných linií. Výsledkem bylo pozorování odlišných deaminačních aktivit mezi jednotlivými buněčnými liniemi, přičemž se ukázalo, že významnou roli hrají oba enzymy, jak cytidin deamináza tak i deoxycytidylát deamináza, a to v závislosti na konkrétní buněčné linii. Současně se ukázalo, že množství enzymů v buňkách jen částečně souvisí se skutečnou deaminační aktivitou.

SUMMARY

Deaminases are enzymes that take part in the salvage pathway of nucleotide synthesis. In organisms, there are two types of these enzymes, cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase. While cytidine deaminase catalyses the conversion of cytidine and 2'-deoxycytidine to uridine and 2'-deoxyuridine, respectively, deoxycytidylate deaminase catalyses conversion of 2'-deoxycytidinemonophosphate to 2'-deoxyuridinemonophosphate. Both enzymes are very important in the treatment of cancer and viral diseases using cytidine analogues, because they very often cause the deamination of cytidine analogue to uridine analogue. This conversion usually leads to the inactivation of the drugs and thus to the decrease of the effectiveness of the treatment. Moreover, there is a high variability in the activity of both deaminases among particular patients. This variability leads to the different effectiveness of the treatment of the cancer and viral diseases.

In the study presented three new approaches for the determination of deaminases' activity based on the deamination of 5-ethynyl-2'-deoxycytidine to 5-ethynyl-2'-deoxyuridine and the followed incorporation of the created 5-ethynyl-2'-deoxyuridine into cellular DNA were developed and tested. The first method was based on the determination of the signal of the incorporated 5-ethynyl-2'-deoxyuridine using fluorescence microscopy, the second method uses the peroxidase followed by the determination of absorbance. The third method is based on the measurement of the fluorescence signal microplate reader. The third approach was evaluated as the best one. This method was further used to test the deaminase activity in chosen cell lines. The different deaminase activities were observed in different cell lines. Both deaminases played important role in deamination of 5-ethynyl-2'-deoxycytidine. Concurrently, it was shown that the amount of enzymes in cells is only partially connected with the real deaminase activity.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Karlu Kobernovi, CSc. za odborné vedení a konzultace při vypracování práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Anně Ligasové, PhD. za seznámení s laboratorními technikami a metodami analýzy dat a paní laborantce Monice Masopustové za všestrannou pomoc v laboratoři a seznámení s technikami práce s buněčnými liniemi.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1. Metabolismus nukleotidů.....	10
2.1.1. Syntéza <i>de novo</i>	10
2.1.1.1. <i>De novo</i> syntéza pyrimidinů.....	12
2.1.1.2. <i>De novo</i> syntéza purinů.....	13
2.1.1.3. <i>De novo</i> syntéza deoxyribonukleotidů	15
2.1.2. Záchranná cesta syntézy nukleotidů.....	16
2.1.2.1. Záchranná cesta syntézy ribonukleosidtrifosfátů	17
2.1.2.2. Záchranná cesta syntézy deoxynukleosidtrifosfátů	18
2.2. Nukleosidové analogy	19
2.2.1. Význam	19
2.2.2. Transportéry a enzymy ovlivňující účinek nukleosidových analogů	20
2.2.2.1. Transport nukleosidových analogů	20
2.2.2.2. Metabolická aktivace a inaktivace nukleosidových analogů.....	21
2.3. CDD a DCTD deamináza.....	22
2.4. Replikace DNA a metody stanovení	23
3. CÍL PRÁCE	26
4. MATERIÁL A METODIKA	27
4.1. Biologický materiál	27
4.2. Stanovení deaminázové aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie	28
4.2.1. Použité pufrы	28
4.2.2. Značení buněčné linie nukleosidovým analogem.....	28
4.2.3. Test replikace	28
4.2.4. Detekce EdU pomocí 5-FAM azidu.....	29
4.2.5. Mikroskopie a analýza obrazu.....	29
4.3. Stanovení deaminázové aktivity pomocí peroxidázy a spektrofotometrie	30
4.3.1. Příprava pufrů.....	30
4.3.2. Test na průkaz buněčné peroxidázy	30
4.3.3. Fixace buněčných linií	31
4.3.4. Ověření klik reakce mikroskopicky	31
4.3.5. Detekce EdU pomocí biotin-PEG11-azidu	32
4.3.6. Stanovení počtu buněk a kalibrace na počet buněk.....	33

4.3.7. Měření a analýza dat	34
4.4. Stanovení deaminázové aktivity pomocí fluorescence a čtečky destiček	34
4.4.1. Použité pufry	34
4.4.2. Ošetření buněčné linie inhibitorem deamináz	34
4.4.3. Detekce EdU pomocí 5-FAM azidu	35
4.4.4. Měření a analýza dat	35
4.5. Stanovení množství CDD a DCTD metodou Western Blot	36
4.5.1. Použité pufry	36
4.5.2. Protilátky	37
4.5.3. Příprava lyzátů.....	37
4.5.4. Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	37
4.5.5. Western Blot.....	38
5. VÝSLEDKY	40
5.1. Stanovení deaminační aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie	41
5.2. Stanovení deaminační aktivity pomocí peroxidázy a spektrofotometrie.....	45
5.3. Stanovení deaminační aktivity pomocí měření fluorescence čtečkou destiček.....	49
5.4. Stanovení deaminační aktivity u různých buněčných linií.....	51
5.5. Množství CDD a DCTD u různých buněčných linií	59
6. DISKUSE	62
7. ZÁVĚR	69
8. LITERATURA	70
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	75

1. ÚVOD

Deaminázy jsou enzymy účastnící se metabolismu nukleotidů, konkrétně záchranné cesty syntézy nukleotidů. V buňkách se nacházejí dva typy deamináz zaměřených na přeměnu cytosinu, jednak je to cytidin deamináza přeměňující cytidin/2'-deoxycytidin na uridin/2'-deoxyuridin a další je deoxycytidylát deamináza přeměňující 2'-deoxycytidinmonofosfát na 2'-deoxyuridinmonofosfát. To umožňuje využití cytidinu/2'-deoxycytidinu přijatého z extracelulárního prostředí či vzniklého rozkladnými procesy k syntéze uridinu/2'-deoxyuridinu bez nutnosti zahájení energeticky náročné syntézy *de novo*. Kromě jejich biologického významu hrají tyto deaminázy roli i při léčbě nádorových a virových onemocnění pomocí nukleosidových analogů.

Nukleosidové analogy jsou látky svou strukturou odvozené od purinových nebo pyrimidinových nukleosidů a mají obrovské využití zejména při léčbě nádorových, ale také virových onemocnění. Tyto látky se do organismu dostávají ve formě „proléku“. Aby byly biologicky účinné, musí být po přijetí do buňky metabolicky aktivovány. V buňce ovšem probíhají i procesy s opačným účinkem. Cytidinové analogy jsou velmi často deaminované deaminázami na uridinový analog, což většinou vede k jejich inaktivaci a tím i snížení účinnosti léčby. Mimoto existuje velká variabilita v aktivitě obou deamináz mezi jednotlivými pacienty. To vede k odlišné účinnosti léčby nádorových a virových onemocnění.

V předkládané práci byly vyvinuty a testovány tři nové přístupy pro stanovení aktivity deamináz založené na deaminaci 5-etynyl-2'-deoxycytidinu na 5-etynyl-2'-deoxyuridin a následné inkorporaci vzniklého 5-etynyl-2'-deoxyuridinu do buněčné DNA. První metoda je založena na stanovení signálu inkorporovaného 5-etynyl-2'-deoxyuridinu pomocí fluorescenční mikroskopie, druhá využívá pro detekci signálu peroxidázu a následné stanovení absorbance. Třetí metoda je založena na stanovení signálu pomocí fluorescence měřené pomocí čtečky destiček. Současně byl analyzován obsah a aktivita těchto enzymů v několika buněčných liniích.

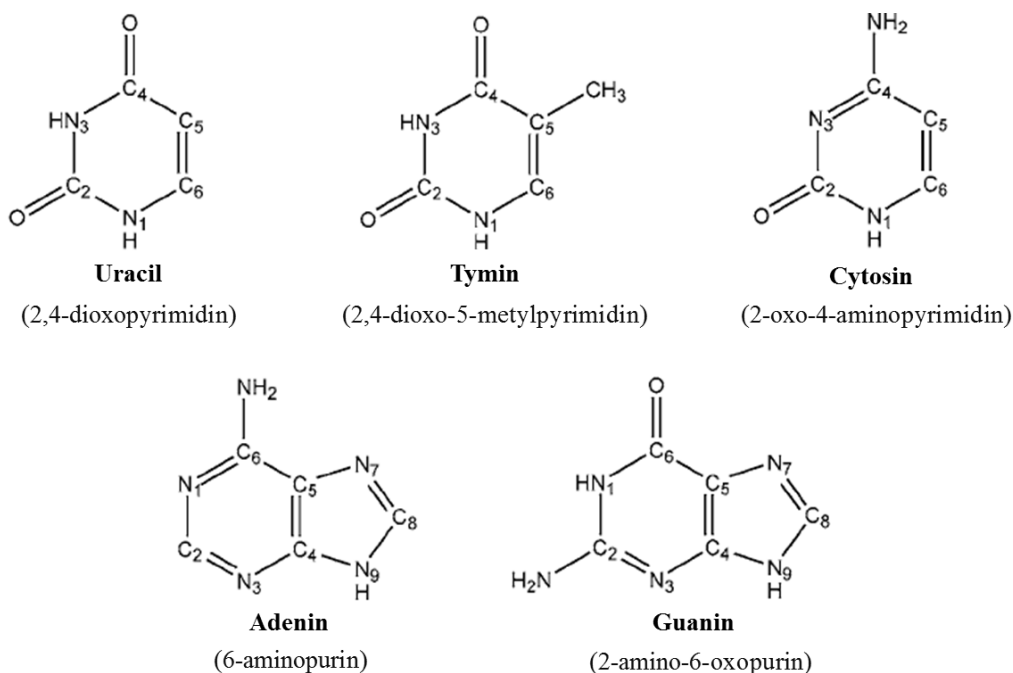
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Metabolismus nukleotidů

2.1.1. Syntéza *de novo*

Nukleotidy představují sloučeniny nezbytné pro život a proliferaci buňky, ať už jako stavební součásti nukleových kyselin či jako funkční komponenty, které se účastní různých metabolických drah, syntéz, signálních drah a v neposlední řadě i oprav DNA.

Nukleové kyseliny se dle svého složení dělí na ribonukleové (RNA) a deoxyribonukleové (DNA) kyseliny. Základní stavební složkou RNA je pětiuhlíkatý monosacharid β -D-ribóza (ribóza), purinová nebo pyrimidinová dusíkatá báze a zbytek kyseliny fosforečné. Mezi purinové báze tvořící RNA se řadí adenin a guanin, mezi pyrimidinové báze pak cytosin a uracil. DNA se svou strukturou od RNA liší přítomností monosacharidu β -D-2'-deoxyribózy (deoxyribóza) a namísto pyrimidinové báze uracilu se zde vyskytuje thymin. Struktura purinových a pyrimidoných bází je vyobrazena na Obr. 1.



Obr. 1: Struktura dusíkatých bází

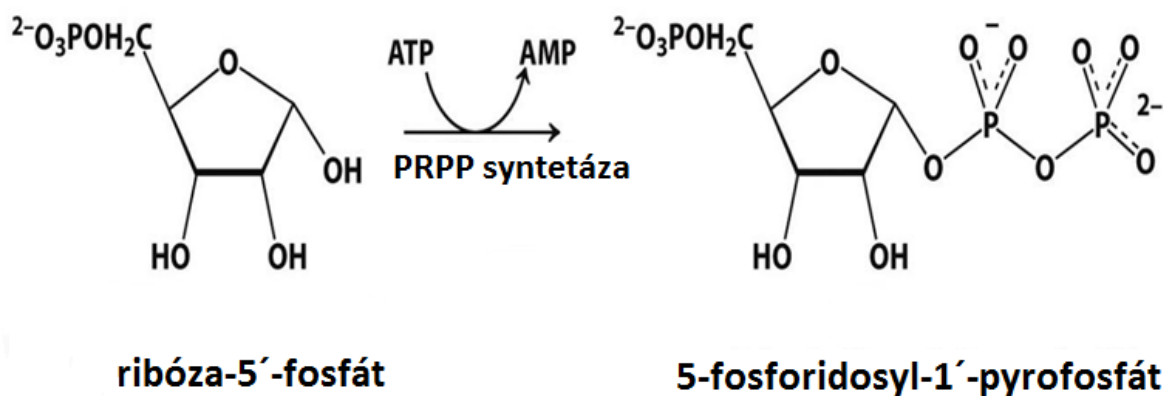
Dusíkaté báze se dělí na purinové, jejichž základem je purinový kruh a pyrimidinové, jejichž základ tvoří pyrimidinový kruh. Mezi purinové báze patří adenin a guanin. Mezi pyrimidinové báze patří cytosin, thymin a uracil. V závorkách jsou uvedeny názvy dle chemického názvosloví. (Roca-Sanjuán a kol., 2016; upraveno).

Dusíkatá báze a ribóza nebo deoxyribóza dohromady vytvářejí nukleosid. Podle příslušné báze a monosacharidu se rozlišuje adenosin (A), guanosin (G), cytidin (C),

tymidin (T) a uridin (U), respektive deoxyadenosin (dA), deoxyguanosin (dG), deoxycytidin (dC), deoxytymidin (dT) a deoxyuridin (dU). Připojením zbytku kyseliny fosforečné k nukleosidu vzniká nukleotid. Syntéza nukleotidů u eukaryot může probíhat dvěma způsoby, *de novo* nebo záchrannou cestou syntézy nukleotidů. Způsobem *de novo* vznikají nukleotidy z menších molekul. Jejich syntéza představuje komplexní proces zahrnující řadu meziproductů a vyžadující aktivitu mnoha enzymů. Základem syntézy je ribóza-5'-fosfát, aminokyseliny a oxid uhličitý (CO₂). Nejprve vzniká ribonukleosidmonofosfát. Ten je dále fosforylován přes ribonukleosiddifosfát až na ribonukleosidtrifosfát. Deoxyribonukleosidtrifosfáty vznikají redukcí ribonukleosiddifosfátů a jejich následnou fosforylací.

V proliferujících buňkách zpravidla převládá právě tento typ syntézy. Důvodem jsou vysoké požadavky buněk na koncentrace jednotlivých nukleotidů v průběhu syntézy DNA a RNA. Záchranné reakce by takto vysoké koncentrace nedokázaly pokrýt. Jednotlivé buněčné typy se svou proliferační aktivitou liší, což se odráží i v odlišné míře syntézy nukleotidů *de novo*. Vysoká syntéza nukleotidů je typická např. pro svalové buňky (Zhao a kol., 2013).

Výchozím a společným krokem pro tvorbu všech ribonukleotidů *de novo* je syntéza ribózy v aktivované podobě, tzv. 5-fosforibosyl-1'-pyrofosfát (PRPP), jenž vzniká z ribóza-5'-fosfátu pomocí enzymu PRPP syntetázy (Obr. 2). Dále se již syntéza pyrimidinů a purinů významně liší (Lane a Fan, 2015).

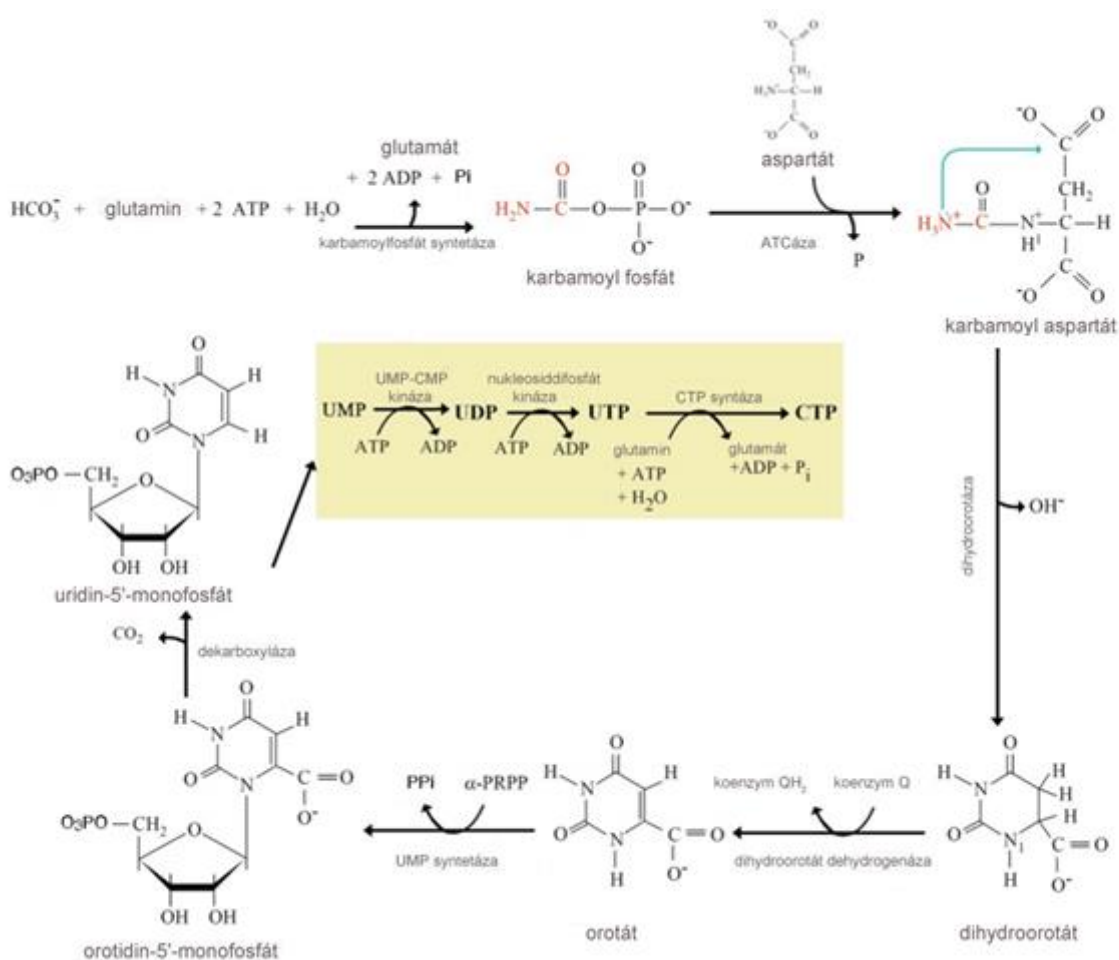


Obr. 2: Syntéza 5'-fosforybozyl-1'-pyrofosfátu

Ribóza v aktivované podobě (PRPP) vzniká z ribóza-5'-fosfátu a adenosintrifosfátu (ATP) za vzniku PRPP a uvolnění adenosinmonofosfátu (AMP) účinkem enzymu PRPP syntetázy (http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/stryer7/CH25/unnumbered_25_p739a.jpg; upraveno).

2.1.1.1. *De novo* syntéza pyrimidinů

Pyrimidinový kruh vzniká sérií reakcí. Nejprve rozkladem glutaminu na amoniak a reakcí amoniaku s aktivovanou kyselinou hydrogenuhličitou vzniká karbamoyl fosfát. Tato reakce je katalyzovaná enzymem karbamoylfosfát syntetázou. Vzniklý fosfát v dalším kroku reaguje s aspartátem za vzniku karbamoyl aspartátu. Reakci katalyzuje aspartát transkarmoyláza. Následně se uzavře pyrimidinový kruh a to za pomoci enzymu dihydroorotázy za vzniku dihydroorotátu. Dihydroorotát se účinkem dihydroorotát dehydrogenázy a koenzymu Q oxiduje na orotát. Na rozdíl od předchozích reakcí, které probíhaly v cytosolu, se dihydroorotát dehydrogenáza nachází na vnitřní mitochondriální membráně, čímž je umožněn okamžitý transport vzniklých elektronů do respiračního (dýchacího) řetězce.



Obr. 3: *De novo* syntéza pyrimidinových nukleotidů

Syntéza pyrimidinů je zahájena rozkladem glutaminu na amoniak a reakcí s aktivovanou kyselinou hydrogenuhličitou. Následuje řada reakcí přes karbamoylfosfát, karbamoylaspartát a dihydroorotát vedoucí ke vzniku orotátu. Orotát následně reaguje s 5-fosforibosyl-1'-pyrofosfátem (PRPP) za vzniku orotidin-5'-monofosfátu. Dekarboxylací vzniká uridin-5'-monofosfát, který je následně fosforylován přes

uridin-5'-difosfát (UDP) až na uridin-5'-trifosfát (UTP). Cytidin-5'-trifosfát vzniká z UTP. ATCáza - aspartát transkarbamoyláza.

(<http://www.biologydiscussion.com/plant-physiology-2/nitrogen-metabolism/nucleotides-metabolism-and-de-novo-synthesis-of-nucleotides/22929>; upraveno).

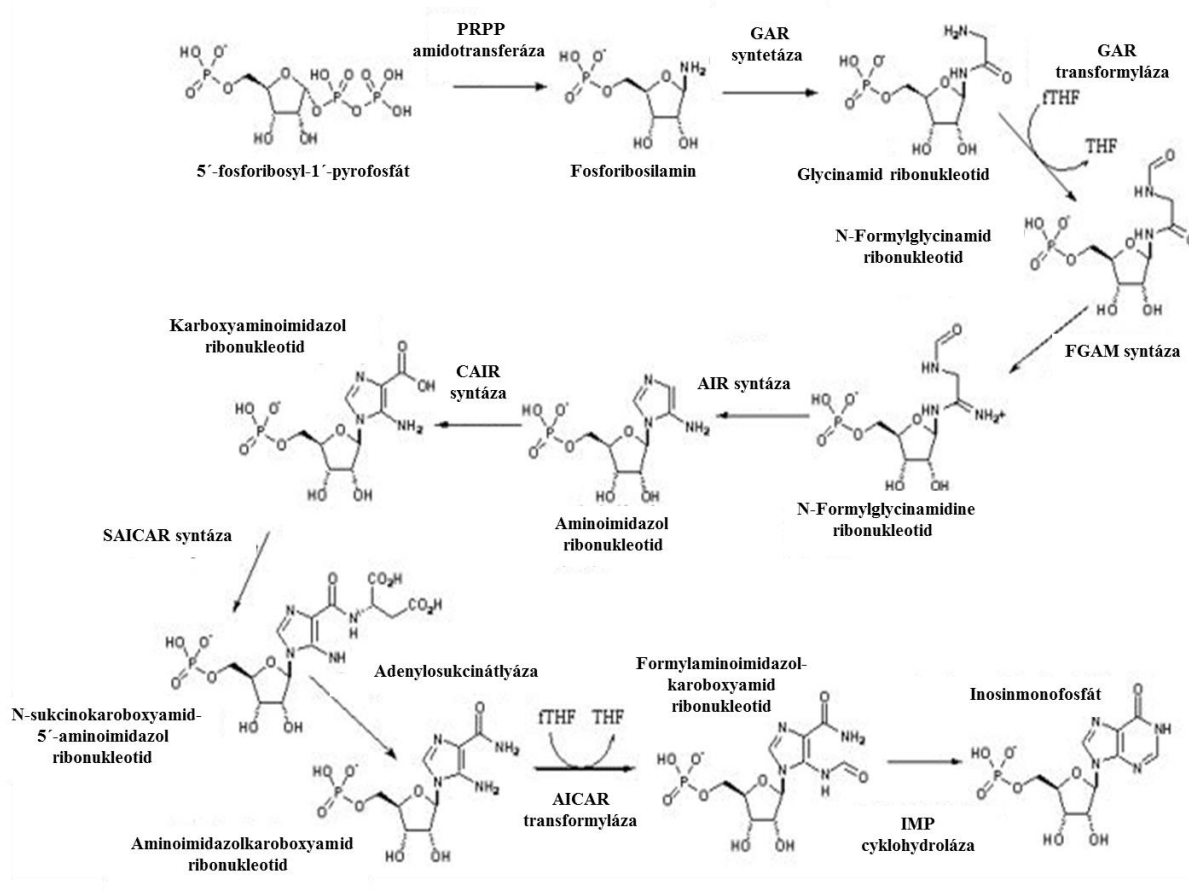
Bifunkční protein UMP syntetáza pak katalyzuje přenos PRPP na orotát za vzniku orotidin-5'-monofosfátu a jeho dekarboxylaci na uridin-5'-monofosfát (UMP). Fosforylaci UMP enzymem UMP-CMP kináza pak vzniká uridin-5'-difosfát (UDP) a následně účinkem nukleosiddifosfát kinázy vzniká uridin-5'-trifosfát (UTP). Syntéza cytidin-5'-trifosfátu (CTP) probíhá z UTP, glutaminu a ATP za účasti CTP syntázy, která katalyzuje přenos dusíku z glutaminu na čtvrtý uhlík UTP. Reakce zahrnuje hydrolýzu glutaminu, fosforylaci UTP a následnou reakci s amoniakem (Evans a Guy, 2004; Obr. 3).

2.1.1.2. *De novo* syntéza purinů

Na rozdíl od syntézy pyrimidinových nukleotidů probíhá syntéza purinových nukleotidů kompletně v cytosolu. Purinový kruh se tvoří postupnou syntézou přímo na PRPP. Donory atomů uhlíku a dusíku jsou molekuly CO₂, glycin, aspartát, glutamin a tetrahydrofolát. Syntézou vzniká nejprve inosinmonofosfát (IMP). IMP je dále přeměněn na AMP nebo guanosinmonofosfát (GMP), které jsou fosforylovány kinázami přes difosfát až na trifosfát.

Syntézy se účastní tzv. „purinosom“, což je shluk šesti enzymů, katalyzujících sled deseti reakcí vedoucích k syntéze IMP. Syntéza je zahájena 5-fosforibosyl-1'-pyrofosfát amidotransferázou, která v první reakci hydrolyzuje glutamin na amoniak a glutamát a přenáší amoniak na PRPP za vzniku β-5-fosforybosilaminu (PRA) a za uvolnění pyrofosfátu. Trifunkční enzym složený z domén glycinamid ribonukleotid syntetázy (GAR syntáza), glycinamid ribonukleotid transformylázy a aminoimidazol ribonukleotid syntázy (AIR syntáza) katalyzuje druhou, třetí a pátou reakci. Nejprve GAR syntetáza katalyzuje vazbu glycinu na PRA za vzniku GAR. GAR transformyláza následně přenáší formylovou skupinu z N¹⁰formyltetrahydrofolátu na GAR za vzniku N-formylglycinamid ribonukleotidu (FGAR). Formylglycinamidin ribonukleotid syntáza (FGAM syntáza) hydrolyzuje glutamin na amoniak a ten reaguje s ketonovou skupinou za vzniku N-formylglycinamidin ribonukleotidu (FGAM). Aminoimidazol ribonukleotid syntáza dokončuje syntézu pětičlenného kruhu purinu za vzniku 5- aminoimidazol ribonukleotidu (AIR). Bifunkční enzym tvořený karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntázou (CAIR syntáza) a sukcinokarboxyamid-5'-aminoimidazol ribonukleotid syntázou (SAICAR

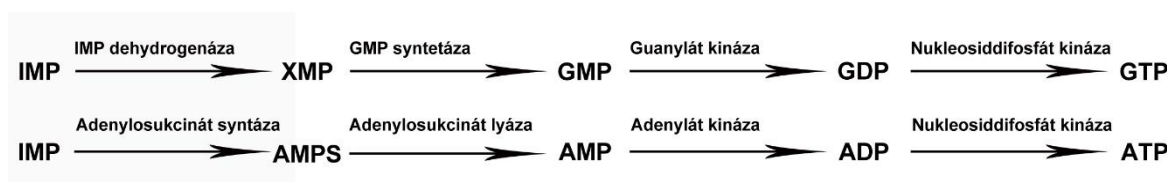
syntáza) katalyzuje nejdříve karboxylaci AIR a následně vazbu karboxylové skupiny vzniklého produktu s aspartátem za vzniku sukcinokarboxamid-5'-aminoimidazol ribonukleotidu (SAICAR). Adenylosukcinát lyáza odštěpuje fumarát ze vzniklého produktu za vzniku aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidu (AICAR). Vznik IMP je katalyzován bifunkčním enzymem tvořeným AICAR transformylázou a IMP cyklohydrolázou. Nejprve se na AICAR opět zabuduje formylová skupina, jejíž donorem je N¹⁰formyltetrahydrofolát, a následně dochází k uzavření druhého šestičlenného kruhu purinu za uvolnění molekuly vody a vzniku IMP (Obr. 4).



Obr. 4: De novo syntéza purinových nukleotidů

PRPP amidotransferáza – 5-fosforibosyl-1'-pyrofosfát amidotransferáza, GAR syntetáza – glycinamid ribonukleotid syntetáza, GAR transformyláza – glycinamid ribonukleotid transformyláza, AIR syntáza – aminoimidazol ribonukleotid syntáza, GAR transformyláza – glycinamid ribonukleotid transformyláza, FGAM syntáza – N-formylglycinamidin ribonukleotid syntáza, AIR syntáza – aminoimidazol ribonukleotid syntáza, CAIR syntáza – karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntáza, SAICAR syntáza – sukcinokarboxamid-5'-aminoimidazol ribonukleotid syntáza, AICAR transformyláza – aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid transformyláza, IMP cyklohydroláza – inosinmonofosfát cyklohydroláza (<http://www1.chem.leeds.ac.uk/MEW/purine.htm>; upraveno).

ATP vzniká z IMP ve dvou krocích. Adenylosukcinát syntáza syntetizuje adenylosukcinát, ze kterého následně za účasti adenylosukcinát lyázy vzniká AMP. Následně je AMP fosforylováno adenylát kinázou na ADP a nukleosiddifosfát kinázou na ATP. Při syntéze guanosintrifosfátu (GTP) dochází nejprve k dehydrogenaci IMP působením inosinmonofosfát dehydrogenázy. Vzniklý xantozin-5'-monofosfát, je následně přeměněn za účasti glutamátu, ATP a GMP syntetázy na GMP. GMP je postupně fosforylován guanylát kinázou a nukleosiddifosfát kinázou na GTP (Zhao a kol, 2013; Standish a kol, 1959; Obr. 5).



Obr. 5: Syntéza adenosintrifosfátu a guanosintrifosfátu

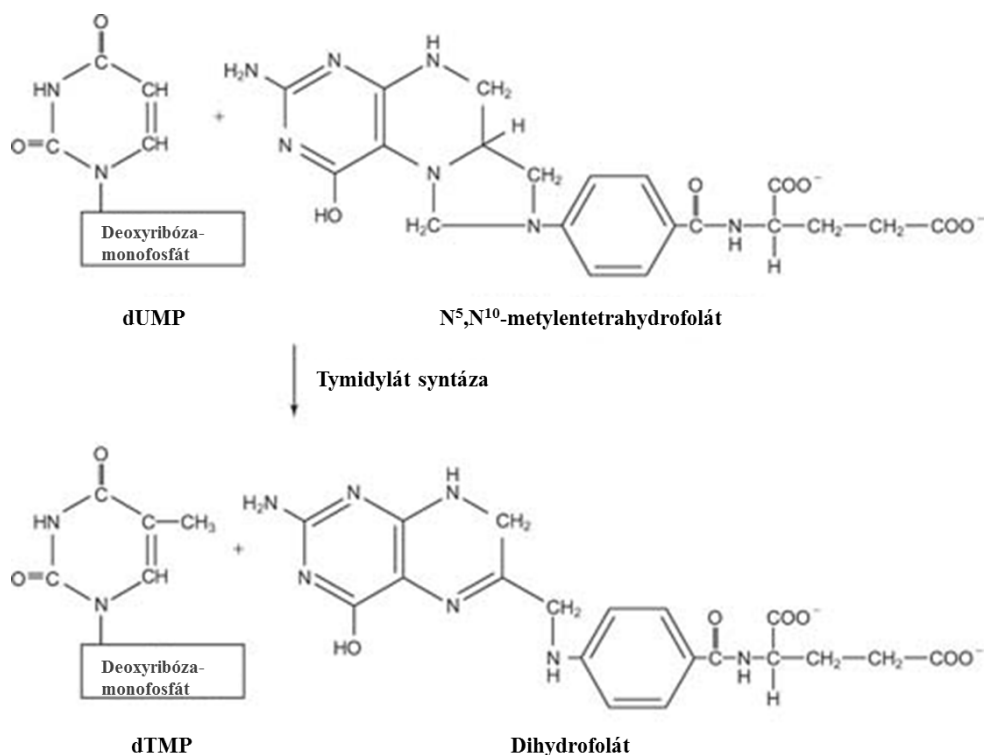
Na obrázku je zobrazena syntéza guanosintrifosfátu (GTP) z inosinmonofosfátu (IMP), přes xantozin-5'-monofosfát (XMP), guanosinmonofosfát (GMP) a guanosindifosfát (GDP). Adenosintrifosfát (ATP) vzniká přes meziproducty adenylosukcinát (AMPS), adenosinmonofosfát (AMP) a adenosindifosfát (ADP; Zhao a kol, 2013; upraveno).

2.1.1.3. *De novo* syntéza deoxyribonukleotidů

Na rozdíl od ribonukleotidů deoxyribonukleotidy vznikají redukcí již vzniklých ribonukleotidů na úrovni jejich difosfátů. Reakce je katalyzována alostericky regulovaným enzymem ribonukleotid reduktázou (RNR). RNR je společným enzymem pro všechny vytvářené deoxyribonukleotidy. Enzym se skládá ze dvou podjednotek a je na základě složité alosterické regulace schopen v odpovědi na potřeby buňky vytvářet požadované deoxyribonukleotidy. Enzym obsahuje místo pro tvorbu radikálu, aktivní místo a místo zodpovědné za specificitu (Nordlund a Reichard, 2006). Aktivní místo rozhoduje o tom, zda bude vůbec probíhat redukce substrátu. Místo je pozitivně regulováno vazbou ATP a negativně vazbou deoxyadenosintrifosfátu (dATP). „Specifické“ místo rozhoduje o druhu substrátu, který bude redukován a je modulováno vazbou jednotlivých deoxynukleosidtrifosfátů. Vazba ATP/dATP do místa zodpovědného za specificitu umožňuje vazbu a redukci UDP a CDP, vazba deoxyguanosintrifosfátu redukcí ADP a vazba deoxytymidintrifosfátu (dTTP) redukcí GDP (Reichard, 2010).

Nukleosiddifosfát kináza následně za přítomnosti ATP přeměňuje deoxynukleosiddifosfát na deoxynukleositrifosfát. Výjimkou je dTTP. Syntéza dTTP zahrnuje nejprve metylaci deoxyuridinmonofosfátu za vzniku deoxytymidinmonofosfátu

(dTMP). Reakci katalyzuje tymidylát syntáza a donor metylové skupiny je N^5,N^{10} -metylentetrahydrofolát. dTMP je pak účinkem deoxytimidin-5'-monofosfát kinázy a nukleosiddifosfát kinázy fosforylován na dTTP (Lane a Fan, 2015; Obr. 6).



Obr. 6: De novo syntéza deoxytimidynmonofosfátu

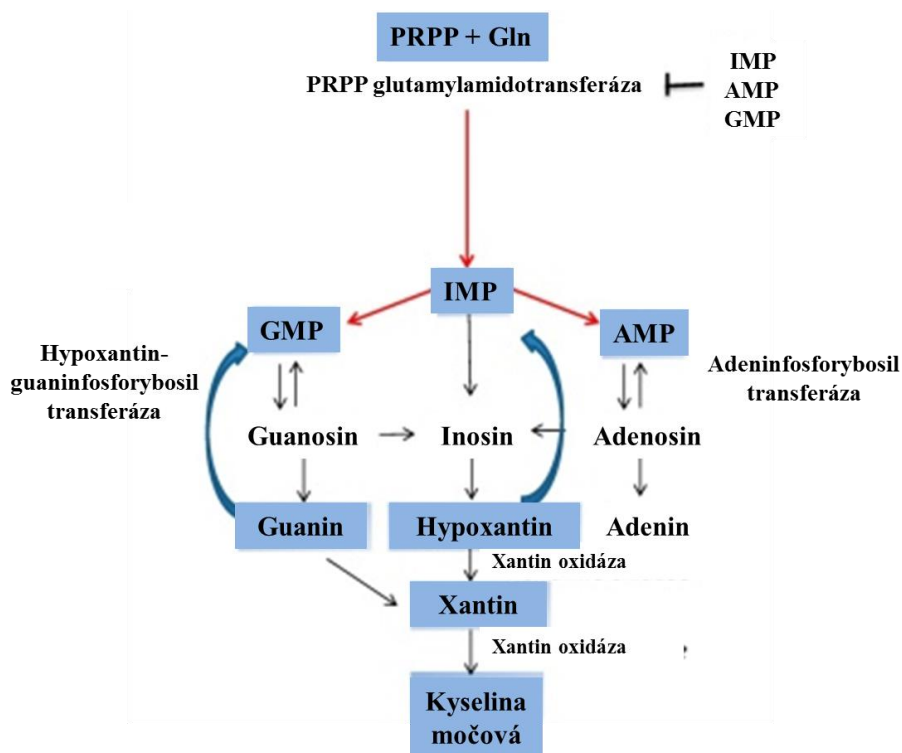
Na obrázku je vyobrazeno schéma syntézy deoxytimidinmonofosfátu (dTMP) z deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) a N^5,N^{10} -metylentetrahydrofolátu působením enzymu tymidylát syntázy. dTMP je jediný nukleotid, jenž vzniká metylací dUMP a nikoliv účinkem ribonukleotid reduktázy z ribonukleotiddifosfátu (<https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/biochemistry-ii/purines-and-pyrimidines/deoxynucleotide-synthesis>; upraveno).

2.1.2. Záchranná cesta syntézy nukleotidů

Syntéza nukleotidů *de novo* je energeticky velmi náročný proces. V buňkách nicméně existuje alternativní způsob syntézy nukleotidů. Jedná se o záchrannou cestu syntézy, která k syntéze nukleotidů využívá jak nukleosidy a volné báze přijímané buňkou z extracelulárního prostředí, tak metabolity vzniklé degradací DNA a RNA. Tento způsob syntézy je specifický pro některé buňky a tkáně, např. pro nervové buňky, mozek, ale i kostní dřeň. Obecně tato alternativní syntéza nukleotidů převažuje u diferencovaných buněk a u buněk v klidovém stadiu, kde záchranná cesta syntézy nukleotidů stačí pokrýt potřebu buňky (Zhao a kol., 2013).

2.1.2.1. Záchranná cesta syntézy ribonukleosidtrifosfátů

Při syntéze ribonukleosidtrifosfátů z volných bazí, musí být báze nejprve spojena s ribózou. Purinové báze hypoxantin, guanin i adenin jsou spojeny s ribózou prostřednictvím hypoxantin-guaninfosforibosyl transferázy a adeninfosforibosyl transferázy, kdy ribózu poskytuje PRPP (Zhao a kol., 2013). Touto reakcí z volných purinových bazí vzniká IMP, GMP nebo AMP. Z IMP se stejně jako u *de novo* syntézy vytváří GMP a AMP. Produkty dráhy inhibují syntézu purinů *de novo* prostřednictvím allosterické inhibice PRPP amidotransferázy. Navíc je touto reakcí spotřebováván i PRPP, substrát PRPP amidotransferázy (Fasullo a Endres, 2015; Obr. 7). V případě uracilu slouží jako zdroj ribózy ribóza-1-fosfát. Reakci katalyzuje uridininfosforyláza. Při reakci vzniká uridin, který je následně fosforylován uridin-cytidinkinázou na UMP (Voorde a kol., 2014).



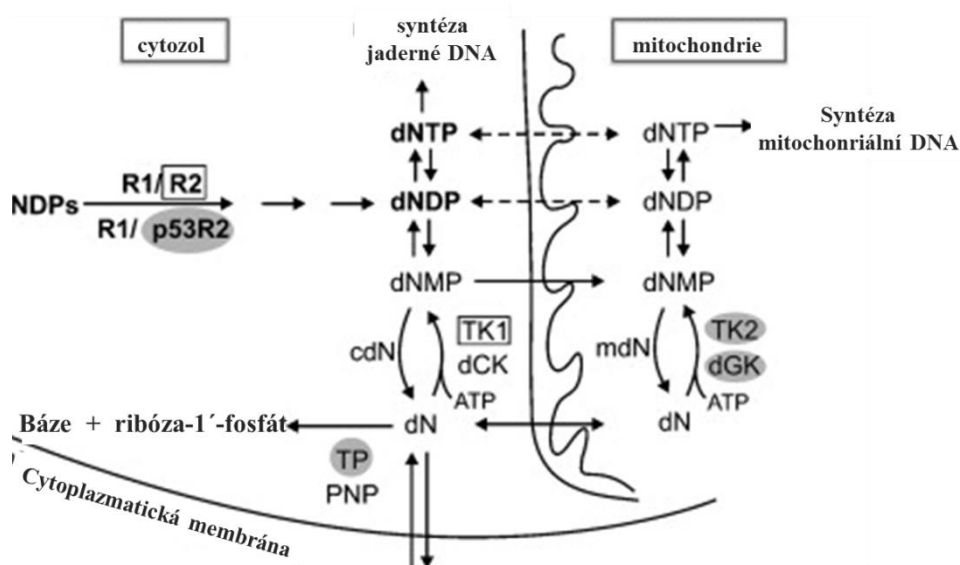
Obr. 7: Metabolismus purinů a záchranná cesta syntézy

Schéma metabolismu purinových nukleotidů, zobrazující *de novo* a záchrannou cestu syntézy nukleotidů a degradaci purinových nukleotidů. Červené šipky naznačují syntézu *de novo* z 5-fosforibosyl-1'-pyrofosfátu (PRPP) a glutaminu (Gln). Modré šipky symbolizují záchrannou syntézu a černé šipky konverzi nukleotidů na nukleosidy a báze a konverzi nukleosidů na nukleotidy. Záchranná cesta guaninu a hypoxantinu je katalyzována hypoxantin-guaninfosforybosil transferázou, záchrannou cestu adeninu katalyzuje adeninfosforybosil transferáza. Fosforibosylpyrofosfát je inhibován adenosinmonofosfátem (AMP), inositolmonofosfátem (IMP) a guanylátfosfátem (GMP; Fasullo a Endres, 2015).

2.1.2.2. Záchranná cesta syntézy deoxynukleosidtrifosfátů

Uracil může být kromě přeměny na uridin rovněž přeměněn na deoxyuridin. Reakce je katalyzovaná tymidin fosforylázou, která rovněž katalyzuje přeměnu tyminu na tymidin (Voorde a kol., 2014). Deoxynukleosidy (dN) jsou konvertovány na deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) působením tří enzymů. Nejprve prostřednictvím specifických deoxyribonukleosid kináz se dN aktivují na deoxynukleosidmonofosfát (dNMP) přenosem fosfátové skupiny, jejíž donorem je většinou ATP. Z dNMP specifickými deoxyribonukleosidmonofosfát kinázami vznikají deoxyribonukleosiddifosfáty (dNDP) a z nich pak deoxyribonukleosiddifosfát kinázami dNTP (Rampazzo a kol., 2010).

Existují čtyři druhy deoxyribonukleosid kináz, z nichž tymidin kináza 1 (TK1) a deoxycytidin kináza (dCK) jsou přítomny v cytoplasmě, tymidin kináza 2 (TK2) a deoxyguanosin kináza (dGK) se nachází v mitochondriích. TK1 fosforyluje deoxytymidin (dT) a deoxyuridin (dU). dCK má širokou substrátovou specifitu, dokáže fosforylovat deoxycytidin (dC), deoxyadenosin (dA) a deoxyguanosin (dG). TK2 fosforyluje dT a dC. dGK fosforyluje především dG, ale i dA (Johanson a kol., 2001; Obr. 8).



Obr. 8: Záchranná cesta syntézy deoxyribonukleotidů

Na obrázku je znázorněna záchranná cesta syntézy deoxyribonukleotidů z báze za vzniku deoxyribonukleosidu (dN), deoxynukleosidmonofosfátu (dNMP), deoxynukleosiddifosfátu (dNDP) a deoxynukleosidtrifosfátu (dNTP). Reakce probíhají v cytoplasmě působením enzymů tymidin kinázy 1 (TK1) a deoxycytidin kinázy (dCK) a v mitochondriích za účasti enzymů tymidin kinázy 2 (TK2) a deoxyguanosin kinázy (dGK). V cytoplasmě i v mitochondriích zároveň probíhají opačné kroky, způsobující defosforylaci dNMP a vznik dN. Tyto reakce jsou katalyzovány 5'-deoxynukleotidázou (cdN a mdN). Dále

mohou být dN účinkem nukleosid fosforylázy (TP a PNP) defosforylovány až na bázi. Tučně je vyobrazena syntéza *de novo*. (Rampazzo a kol., 2010; upraveno)

Pro správnou funkci tkání a životaschopnost buněk je důležité, v jaké míře jsou konkrétní dNTP zastoupeny v rámci celkového množství dNTP (tzv. dNTP koncentrace). Nerovnováha v dNTP koncentracích zvyšuje mutace a vede k nestabilitě jaderného, ale i mitochondriálního genomu. K zajištění rovnováhy množství dNTP existují enzymy, které mají opačnou funkci než nukleosid kinázy. Jedná se o 5'-deoxynukleotidázy a nukleosid fosforylázy. 5'-deoxynukleotidáza katalyzuje defosforylaci dNMP na deoxynukleosid. Nukleosid fosforyláza, která jednak katalyzuje syntézu nukleosidů z báze a ribóza-1'-fosfátu, katalyzuje rovněž degradaci dN na bázi a ribóza-1'-fosfát (Rampazzo a kol., 2010).

Reakce udržující dNTP koncentrace zahrnují nejen konverze daných nukleosidů na mono, di a trifosfáty a naopak, ale existuje i konverze jednoho druhu nukleosidu/nukleotidu na jiný. Reakce se týká konkrétně deaminace deoxycytidinu na deoxyuridin a deoxycytidinmonofosfátu na deoxyuridinmonofosfát. Reakce je významná pro *de novo* syntézu deoxytimidinmonofosfátu, který se u eukaryot syntetizuje z dUMP. dUMP se získává buď z deoxyuridintrifosfátu (dUTP) enzymem dUTP pyrofosfatázou nebo právě z deoxycytidinmonofosfátu (dCMP). Reakci kódují cytidin deaminázy, přičemž existují dva druhy. Cytidin deamináza (CDD) katalyzuje hydrolytickou deaminaci deoxycytidinu na deoxyuridin, ale rozeznává i cytidin za vzniku uridinu. Deoxycytidylát deamináza (DCTD) katalyzuje hydrolytickou deaminaci dCMP na dUMP (Voorde, 2014; http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00240).

2.2. Nukleosidové analogy

2.2.1. Význam

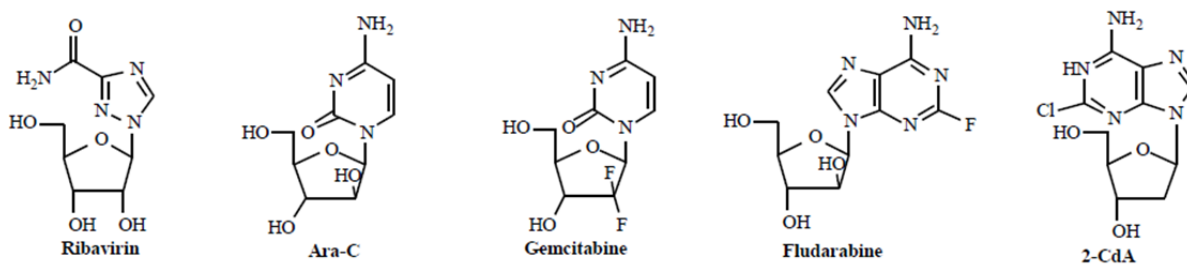
Skupina sloučenin, dnes hojně využívaná především pro terapeutické účely, označovaná jako nukleosidové analogy (NA), zahrnuje sloučeniny odvozené a tedy strukturně podobné purinovým nebo pyrimidinovým nukleosidům. Kromě NA se využívají i analogy volných bází.

Analogy používané v lékařství se vyznačují toxickými účinky na buňku. Mohou se buď inkorporovat do DNA/RNA nebo inhibovat enzymy metabolismu nukleosidů/nukleotidů. Obojí vede k poškození RNA/DNA nebo k narušení jejich syntézy, a v konečném důsledku k buněčné smrti. Tento druh léčby je selektivní jen do jisté míry, jelikož zasahuje i další buňky. Jedná se např. o buňky kostní dřeně, vlasové folikuly, střevní mukózu (Voorde a kol., 2014). Při léčbě nádorů se dnes běžně využívají např.

cladribin (2-chloro-2'-deoxyadenosin, léčba vlasatobuněčné leukémie), fludarabin (2-fluoro-9-β-D-arabinofuranosyladenin, chronická lymfocytární leukémie), cytarabin (1-β-arabinofuranosylcytosin; Ara-C; akutní myeloidní leukémie). Při léčbě rakoviny slinivky, ale i hrudníku, vaječníků, močového měchýře a nemalobuněčného karcinomu plic se využívá gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin, dFdC; Lee a kol., 2013; Obr. 9).

Analogy se využívají i při léčbě některých virových onemocnění. Například k léčbě hepatitidy C se využívá PSI-6130 (β-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-metylcytidin), hepatitida B se léčí pomocí torcitabinu (β-L-2'-deoxycytidin). Lamivudin (2'-deoxy-3'-tiacytidin), zalcitabin (2',3'-dideoxycytidin), zidovudin (3'-azido-2',3'-dideoxytymidin), stavudin (2',3'-didehydro-3'-deoxytymidin) se využívají k léčbě AIDS (Van Rompaya a kol., 2003).

Kromě terapeutických účelů se analogy nukleosidů využívají ke studiu replikační aktivity a buněčného cyklu. Vizualizace replikující se DNA je založena na principu inkorporace nukleosidového analogu do DNA s jeho následnou detekcí. K detekci DNA replikace se využívají především halogenové deriváty tymidinu. Nejčastěji se jedná o 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), který se po inkorporaci do DNA detekuje pomocí specifické protilátky. Tato protilátka může nést např. fluoreskující značku. Dalším NA široce používaným pro detekci syntézy DNA je 5-etynyl-2'-deoxyuridin (EdU). EdU se po inkorporaci do DNA detekuje pomocí klik reakce s fluorescenčně značeným azidem (Salic a Mitchison, 2008).



Obr. 9: Nukleosidové analogy

Struktura vybraných nukleosidových analogů. Ara-C – cytarabin, 2-CdA – 2-chloro-2'-deoxyadenosin (Kong a kol., 2004).

2.2.2. Transportéry a enzymy ovlivňující účinek nukleosidových analogů

2.2.2.1 Transport nukleosidových analogů

Účinek nukleosidových analogů na buňku je podmíněn jejich transportem dovnitř buňky a následnou metabolickou aktivací. Jelikož se jedná o hydrofilní sloučeniny, nedokáží volně procházet cytoplazmatickou membránou. Transport NA je umožněn

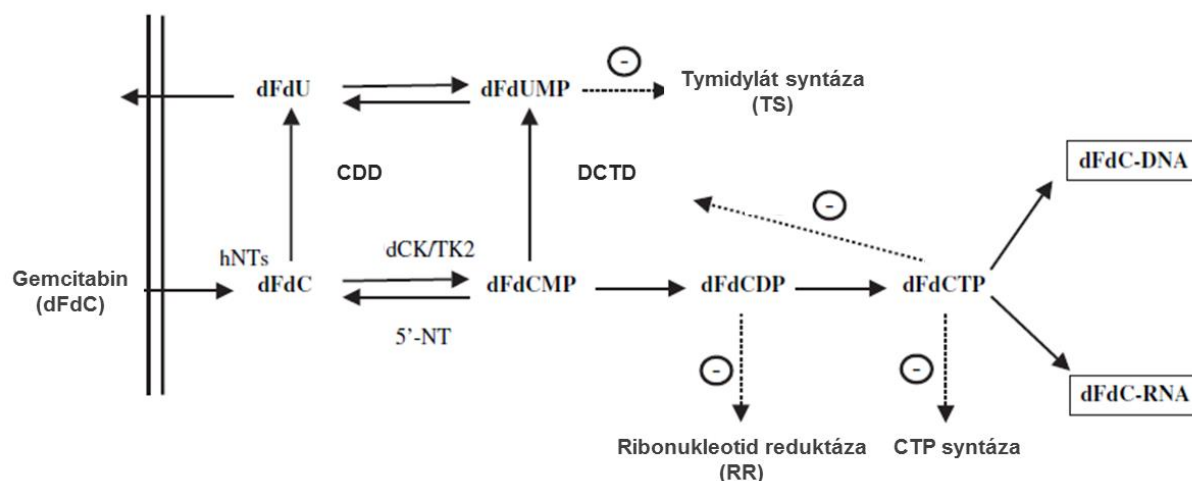
pomocí specifických proteinových transportních systémů, ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) a koncentrativních nukleosidových transportérů (CNT), využívajících dva mechanismy transportu nukleosidů. Transport přes ENT je založen na obousměrném pohybu nukleosidů po koncentračním gradientu, tyto transportéry mají širokou substrátovou specifitu, nicméně nízkou afinitu pro nukleosidy. Transport přes CNT označuje přenos nukleosidů proti koncentračnímu gradientu, je jednosměrný a jako ko-substrát využívá sodné ionty. CNT mají ve srovnání s ENT vyšší afinitu pro nukleosidy. Rozlišují se 4 typy lidských ENT označovaných jako hENT1-4. Lidské CNT zahrnují 3 izoformy hCNT1-3 (Choi a Berdis, 2015).

2.2.2.2. Metabolická aktivace a inaktivace nukleosidových analogů

Poté, co jsou NA transportovány dovnitř buňky, musí podstoupit metabolickou aktivaci. NA jsou v případě, že jejich efekt vyžaduje inkorporaci do DNA, účinné až ve své trifosfátové podobě, což znamená, že musí být fosforylovány pomocí kináz. Jedná se o kinázy záchranné dráhy syntézy nukleosidů. Volné báze musí být nejprve fosforibosyl transferázami (APRT nebo HGPRT) přeměněny na nukleosidy. Fosforylace nukleosidů probíhá postupně přes monofosfát, difosfát až na aktivní trifosfát (Voorde a kol., 2014). Velké množství NA je fosforylováno na monofosfát pomocí dCK, která vykazuje širokou substrátovou specifitu (Lee a kol., 2013). Mitochondriální dGK fosforyluje např. AraG nebo dFdG. TK1 fosforyluje pyrimidinové nukleotidy jako azacytidin a stavudin (Van Rompya a kol., 2003). Druhá fosforylace je zprostředkována UMP-CMP kinázou pro pyrimidinové analogy a adenylát či guanylát kinázou pro purinové analogy. Nukleosiddifosfát kináza pak dokončuje fosforylaci a aktivaci NA (Lee a kol., 2013).

Metabolické procesy buňky mohou působit i obráceně a NA transformovat do neaktivní podoby a eliminovat je. Celá řada studií Na základě nasvědčuje tomu, že většina deoxycytidinových analogů podléhá deaminaci působením CDD na deoxyuridinové analogy, které jsou často relativně neaktivní. Například gemcitabin je téměř z 90% metabolizován na difluorodeoxyuridin. Ten je následně fosforylován na difluorodeoxyuridinmonofosfát, jenž inhibuje tymidylát syntázu a ovlivňuje dNTP koncentrace. Nicméně hlavní účinek dFdC je potlačen (Lee a kol., 2013). Podobný účinek byl zjištěn i pro cytarabin či azacytidin (Serdjebi a kol., 2014). Na deaminaci deoxycytidinových analogů se podílí i další enzym cytidylát demináza (DCTD), jenž katalyzuje deaminaci deoxycytidinmonofosfátového analogu za vzniku deoxyuridinmonofosfátového analogu.

Jiným enzymem, jenž může katabolizovat nukleosidové analogy je 5'-nukleotidáza. 5'-nukleotidáza katalyzuje přeměnu nukleosidových monofosfátů na nukleosidy a reguluje tak množství nukleotidů a nukleosidů. Bylo zjištěno, že nadměrná exprese 5'-nukleotidázy může přispívat k rezistenci vůči gemcitabinu (Jansen a kol., 2010; Obr. 10).



Obr. 10: Metabolismus gemcitabinu

Na obrázku je vyobrazeno schéma zobrazující metabolismus gemcitabinu. Gemcitabin (dFdC) je transportován lidským nukleosidovým transportérem (hNTs) do buňky a následně fosforylován deoxycytidin kinázou (dCK) nebo tymidin kinázou 2 (TK2) na monofosfát (dFdCMP), dále přes difosfát (dFdCDP) až na trifosfát (dFdCTP). Gemcitabin může být v buňce deaminován cytidin deaminázou (CDD) na difluorodeoxyuridin (dFdU) nebo cytidylát deaminázou (DCTD) na difluorodeoxyuridinmonofosfát (dFdUMP) nebo může být defosforylován 5'-nukleotidázou (Mini a kol., 2006; upraveno).

2.3. CDD a DCTD deamináza

CDD je enzym katalyzující deaminaci cytidinu na uridin, nebo deoxycytidinu na deoxyuridin, nachází se od bakterií až po člověka a je součástí mnoha metabolických drah. Lidská CDD je syntetizována především v játrech a placentě, ale i ve zralých neutrofilech. Enzym je velmi často zkoumán ve vztahu k léčbě nádorových onemocnění pomocí cytidinových analogů. Vědci se domnívají, že může být jednou z příčin rezistence vůči léčbě, jelikož většina nukleosidových analogů na bázi cytidinu podléhá deaminaci, přičemž hlavní reakcí je deaminace působením CDD na úrovni nukleosidů (Serdjebi a kol., 2014).

CDD je kódována genem, který se nachází na krátkém raménku chromozomu 1 a je složený ze 4 exonů. Zjistilo se, že gen je velmi polymorfní. Bylo popsáno přibližně 1 000 variací v sekvenci genu. Tato variabilita ovlivňuje funkci a míru exprese CDD a hraje významnou roli při léčbě onemocnění cytidinovými analogy, jelikož někteří jedinci vykazují vůči léčbě rezistenci a jiní jsou naopak natolik senzitivní, že stejná dávka léku pro

ně může být kritická. Výsledky prováděných studií se mezi sebou často liší. Důvodem je jednak velké množství polymorfismů enzymu, etnická příslušnost, ale i nukleosidový analog, se kterým jsou studie prováděny. Například určitá forma CDD může pro některé analogy vykazovat vyšší aktivitu, ale pro jiné analogy může být aktivita enzymu nižší (Serdjebi a kol., 2014).

Například pro gemcitabin, většina léku po transportu do buňky podléhá deaminaci a tím inaktivaci látky, jelikož pro aktivitu je důležitá jeho inkorporace do DNA ve formě trifosfátu. Na druhou stranu, pokud CDD u daného jedince není aktivní, může být za normálních okolností standardní dávka gemcitabinu i letální. Nicméně pacienti s nižší aktivitou enzymu jsou senzitivnější k léčbě a přežívají déle. Naopak pacienti, jenž měli aktivitu CDD velmi vysokou, mají menší pravděpodobnost, že léčba bude účinná a je u nich větší riziko progresivního průběhu choroby. S tím souvisí i nižší toxické působení gemcitabinu na organismus pozorované u těchto pacientů. Podobné působení CDD bylo pozorováno i pro azacytidin/decitabin. Na rozdíl od předešlých léků capecitabin je prostřednictvím CDD přeměněn do aktivní formy, takže zvýšená aktivita CDD způsobuje vysokou toxicitu léku pro organismus (Serdjebi a kol., 2014).

DCTD katalyzuje deaminaci dCMP na dUMP. Enzym je kódovaný DCTD genem, který se nachází na konci dlouhého raménka chromozomu 4 a skládá se z 5 exonů (Weiner a kol., 1995). V jeho sekvenci bylo nalezeno 29 polymorfismů jednoho nukleotidu (SNP). Byl nalezen polymorfismus 172A>G, u něhož byla zjištěna snížená aktivita enzymu, možná proto, že změna aminokyseliny ovlivňuje katalytickou doménu enzymu (Wong a kol., 2009). Nicméně o vlivu enzymu na deoxycytidinové analogy není příliš známo. Obecně se předpokládá, že primární roli v jejich deaminaci hraje CDD.

2.4. Replikace DNA a metody stanovení

Genetická informace eukaryotické buňky je uložena v DNA, přičemž v zájmu zachování její genetické informace, musí být buňka schopna přenášet ji na potomstvo. Replikace DNA je proces, jímž jsou buňky schopny ze své původní molekuly DNA vytvářet její kopii a tu pak následně předávat do nově vznikajících dceřiných buněk. Replikace DNA je semikonzervativní a semidiskontinuální. Vytváří se na základě templátu, což je původní molekula DNA. Vzniknou vždy dvě molekuly, z nichž každá obsahuje jedno původní a jedno nově syntetizované vlákno. Syntéza je obousměrná, ale je možná jen ve směru 5'-3'. Proto jedno vlákno může být syntetizováno kontinuálně, zatímco druhé vlákno se vytváří přerušovaně prostřednictvím tzv. Okazakiho fragmentů. Syntézy se

účastní mnoho faktorů, včetně několika enzymů, počínaje DNA polymerázami, přes helikázu, topoizomerázu, primázu a ligázu. Eukaryotická DNA polymeráza katalyzuje vytvoření fosfodiesterové vazby mezi předchozím a nově přidaným nukleotidem, což vede v postupné prodlužování řetězce na principu komplementarity nově přidávaného nukleosidtrifosfátu a templátového řetězce. Komplementarita je princip párování a vytváření vodíkových vazeb mezi purinovým a pyrimidinovým nukleotidem. Páruje se adenin s thyminem, nebo adenin s uracilem a guanin s cytozinem.

Studium replikace DNA v proliferujících buňkách je obecně založeno na inkorporaci značených prekurzorů DNA do buněčné DNA během S-fáze buněčného cyklu. Značené prekurzory DNA, obvykle pyrimidinové nukleosidy, jsou přidány buňkám do kultivačního média, ty je přeměňují na nukleotidy a v průběhu replikace je vřazují do buněčné DNA. Následně jsou v DNA inkorporované nukleotidy vizualizovány nebo kvantifikovány. Existuje několik cest značení. Nejstarším způsobem je použití radioaktivních nukleosidů, nejčastěji ^3H -tymidinu. Inkorporovaný značený tymidin je detekován autoradiograficky. Kvůli práci s radioaktivním materiálem a časové náročnosti se spíše používají novější metody (Choi a Berdis, 2015).

Další možností značení replikace je použití halogenových nukleosidových analogů, nejčastěji BrdU, méně často 5-chloro-2'-deoxyuridinu nebo 5-jodo-2'-deoxyuridinu. Buňky jsou inkubovány s halogenovým derivátem, např. BrdU. Po metabolické aktivaci na bromdeoxyuridintrifosfát a jeho inkorporaci do DNA se analog detekuje pomocí specifické protilátky. Množství navázané protilátky pak může být kvantitativně stanoveno např. pomocí obrazové nebo průtokové cytometrie. Díky jednoduchosti, rychlosti a dobrému rozlišení se tato metoda stala velmi často používanou. Nevýhodou je nutnost odhalení halogenových derivátů ve struktuře DNA. V opačném případě jsou tyto deriváty maskovány strukturou DNA a nedochází k efektivní reakci s protilátkou. Příkladem demaskování je použití denaturačních činidel typu kyselin nebo zásad. Tyto podmínky však vedou k nevratnému poškození DNA a vzorku (Choi a Berdis, 2015).

Dalším způsobem detekce DNA syntetické aktivity je použití EdU. Na rozdíl od halogenových derivátů jeho detekce nevyžaduje speciální denaturační kroky. EdU je tymidinový analog, jehož metylová skupina je nahrazena alkynem. Po transportu do buňky a vytvoření trifosfátu je inkorporován do DNA proti adeninu stejně jako ^3H -tymidin nebo BrdU. Jeho detekce je ale založena na chemické reakci, tzv. klik reakci, alkylové skupiny s azido skupinou detekční sondy. Jedná se o 3+2 cykloadici terminálního alkynu s azidem katalyzovanou Cu(I) ionty. Azidované sondy např. fluorochromy jsou mnohem menší, než

monoklonální protilátky, tudíž mají lepší přístup k molekule DNA. Vzhledem k vysoké reprodukovatelnosti, jednoduchosti provedení a vysoké rychlosti, tato metoda v současnosti dominuje při stanovení DNA syntetické aktivity (Salic a Mitchinson, 2008). Významnější nevýhodou EdU je pouze jeho vyšší toxicita oproti halogenovým derivátům.

Kromě EdU lze využít i jiné alkylované nukleosidované analogy, např. 5-etylnyl-2'-deoxycytidin. V případě EdC byla pozorována nižší toxicita než v případě EdU. Později bylo ukázáno, že EdC není schopné inkorporace do DNA, ale podléhá rychlé deaminaci za vzniku EdU, přičemž nižší toxicita je vyvolána jen nižší koncentrací produkovaného EdU. Výsledky indikovaly, že v případě EdC a HeLa buněk hraje v přeměně EdC na EdU klíčovou roli CDD (Ligasová a kol., 2016).

V předkládané diplomové práci jsem využila vlastností EdC ke stanovení aktivity CDD a DCTD. Cílem práce bylo vyvinutí a standardizace metody dovolující rychlé stanovení aktivity těchto deamináz pomocí replikační aktivity a porovnání výsledků u různých buněčných linií s úrovní exprese CDD a DCTD.

3. CÍL PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma: Metabolismus nukleotidů a role cytidinových deamináz při metabolismu biologicky aktivních analogů nukleosidů a nukleotidů.
- 2) Optimalizace metod pro stanovení aktivity cytidinových deamináz a vzájemné porovnání výsledků testovaných detekčních systémů z hlediska rychlosti a spolehlivosti těchto systémů.
- 3) Stanovení množství cytidinových deamináz v testovaných buněčných liniích metodou Western Blot.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Biologický materiál

Pro experimenty byly použity následující buněčné linie: HeLa (karcinomové buňky z děložního čípku, dar od Dr. Davida Staňka, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha), 143B (osteosarkom, bez tymidin kinázy 1, Sigma Aldrich), 143B PML BK TK (osteosarkom, exprimují virovou tymidin kinázu, American Culture Tissue Collection), NCI-H2009 (plicní karcinom, dar od doc. Mariána Hajdúcha, Univerzita Palackého, Olomouc), HCT116 (karcinomové buňky z tračníku, dar od doc. Mariána Hajdúcha, Univerzita Palackého, Olomouc), A549 (plicní karcinom, dar od doc. Mariána Hajdúcha, Univerzita Palackého, Olomouc), V79 (transformované plicní buňky z křečka, Sigma Aldrich).

Linie byly kultivovány v kultivačních lahvích při 37°C, v 5% atmosféře CO₂ v inkubátoru Thermo Scientific Steri Cycle (Thermo Fisher Scientific). Linie HeLa, V79 a NCI-H2009 byly kultivovány v Dulbecově modifikovaném Eaglově médiu (DMEM, Gibco) s přídavkem 3,7 g/l hydrogenuhličitanu sodného. Linie 143B byla kultivována v DMEM s přídavkem 48,8 μM BrdU. Linie 143B PML BK TK (143B TK) byla kultivována v DMEM s přídavkem 3,7 g/l hydrogenuhličitanu sodného a HAT (0,1 mM hypoxantin, 400 nM aminopterin a 0,16 mM dT, Sigma Aldrich), linie A549 byla kultivována v médiu F12K (Sigma Aldrich) s přídavkem 1,5 g/l hydrogenuhličitanu sodného a linie HCT116 byla kultivována v McCoyově médiu (Sigma Aldrich) s přídavkem 2,2 g/l hydrogenuhličitanu sodného. Do každého média bylo přidáno fetální bovinní sérum (Gibco) v konečné koncentraci 10 % a gentamicin (Lek Pharmaceuticals) ve finální koncentraci 50 μg/ml. U linie 143B TK bylo týden před experimentem DMEM médium s HAT vyměněno za médium bez HAT. Linie 143B TK byla získána transfekcí linie 143B vektorem obsahujícím pML1 plazmid, sekvenci z BK viru a gen hsv1 TK zaručující expresi virové tymidin kinázy. Transfekovaná linie 143B TK stabilně exprimuje virovou tymidin kinázu (Milanesi, G., et al., 1984).

4.2. Stanovení deaminázové aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie

4.2.1. Použité pufry

10x koncentrovaný fosfátový pufr (10x PBS) – 80g chloridu sodného (NaCl); 1,94 g chloridu draselného; 22,92 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu disodného; 1,916 g dihydrogenfosforečnanu draselného bylo rozpuštěno v 800 ml deionizované vody; pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) na hodnotu 7,4; objem byl doplněn deionizovanou vodou (ddH₂O) na 1 l.

1M Tris-HCl pH 7,5 – 60,57 g Trizma Base; 35,6 ml 35% HCl; objem byl doplněn ddH₂O na 500 ml.

1M Tris-HCl pH 8 při 30°C – 30,285 g Trizma Base; 142,16 ml 1M HCl; objem byl doplněn ddH₂O na 250 ml.

25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl – 25 ml 1M Tris-HCl pH 7,5; 150 ml 1M NaCl; objem byl doplněn ddH₂O na 1 l.

Médium pro pozorování fluorescenčních signálů – 90 ml glycerinu; 5 ml 1M Tris-HCl pH 8; 2,5 g 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanonu (DABCO, Sigma Aldrich); objem byl doplněn ddH₂O na 100 ml.

4.2.2. Značení buněčné linie nukleosidovým analogem

Linie HeLa byla kultivována v 96-jamkové mikrotitrační destičce (Orange Scientific). Kultivace probíhala v inkubátoru Thermo Scientific Steri Cycle po dobu 24 hodin při 37°C, v 5% atmosféře CO₂. Následující den bylo k buňkám přidáno médium s přidavkem alternativně 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10; 50 nebo 250 μM EdU (Carbosynth) nebo 10 μM 5-etynyl-2'-deoxycytidinu (EdC; Jena Bioscience). Buňky byly inkubovány 4 hodiny při 37°C v 5% atmosféře CO₂.

4.2.3. Test replikace

Buněčná linie byla ošetřena 10 μM EdU a fixována. Následně bylo EdU detekováno pomocí 5-fluorescein azidu (5-FAM azid, Lumiprobe) a zároveň byla jádra detekována pomocí 4',6'-diamidin-2-fenylindolu (DAPI, zásobní roztok 10 mM; Life Technologies; viz 4.2.4). Vzorek byl snímán fluorescenčním mikroskopem (viz 4.2.5.) tak, aby objekty byly zcela saturované. Snímky byly vyhodnoceny programem CellProfiler. Na základě signálu naměřeného pro 5-FAM azid a histogramu byla určena frakce nereplikujících buněk a frakce replikujících buněk z celkového množství. Celkové

množství buněk bylo určeno na základě signálu změřeného pro DAPI. Takto byla stanovena replikační aktivita pro konkrétní buněčnou linii a byla využívána pro hodnocení deaminační aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie. Aby bylo minimalizováno riziko špatného odhadu, frakce replikujících a nereplikujících buněk byla snížena o 0,1. Obecně byl počet replikujících (R) a nereplikujících buněk (non-R) stanoven jako $R = (F-0,1)*X$ a $non-R = (0,9-F)*X$, kde F je frakce určená na základě histogramu a X je celkový počet buněk.

4.2.4. Detekce EdU pomocí 5-FAM azidu

Linie HeLa byla ošetřena pomocí EdU a EdC (viz 4.2.2.) a fixována vymraženým 70% etanolem (viz 4.3.3.).

Vzorky byly 3x propláchnuty 200 μ l 1x PBS. Následně bylo do každé jamky přidáno 50 μ l směsi obsahující 100 mM NaCl, 10 mM hydrochinon, 2 mM pentahydrát síranu měďnatého, 20 μ M 5-FAM azid a 10 μ M DAPI. Vzorky byly ve směsi inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. Poté byla směs odsáta pomocí pipety a do jamek bylo přidáno 200 μ l 1x PBS. Po 5-ti minutách byl pufr odstraněn a nahrazen novým. Tento krok byl opakován ještě jednou. Následně byly vzorky 3x promyty 200 μ l deionizované vody. K buňkám bylo přidáno 50 μ l média pro pozorování fluorescenčních signálů. Destička byla uzavřena víkem, utěsněna pomocí parafilmu a do doby mikroskopické analýzy uchována při -20°C. Experiment byl prováděn ve třech nezávislých opakováních.

4.2.5. Mikroskopie a analýza obrazu

Hodnocení a analýza inkorporovaného EdU detekovaného 5-FAM azidem byla založena na snímání vzorků fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81 (Olympus) s kamerou Hamamatsu ORCA II s rozlišením 1344 x 1024 pixelů (Hamamatsu Photonics) a s programem Cell'R (Olympus). Byl použit objektiv UPLFLN, 10x, NA 0,3 (Olympus). Obrazová data byla analyzována pomocí programu na analýzu obrazu CellProfiler. Získaná data byla dále zpracována pomocí programu Microsoft Excel a GraphPad Prism6.

Fluorescenční signál pro 5-FAM azid a pro DAPI byl snímán tak, aby nebylo dosaženo saturace objektů. Signál pro DAPI sloužil ke stanovení množství buněk a rovněž k identifikaci jader. V rámci jednotlivých jader byl pak analyzován signál pro 5-FAM azid, jenž odpovídal množství inkorporovaného EdU. V programu Microsoft Excel byly buňky seřazeny podle velikosti signálu pro 5-FAM azid od největšího po nejmenší. Jak bylo zjištěno při stanovení replikační aktivity (viz 4.2.4.) s jistotou můžeme říct, že 30 % buněk

s nejsilnějším signálem je replikujících a frakce 50 % buněk s nejslabším signálem je nereplikujících. Následně byl vypočítán průměrný signál replikujících buněk a od něj byl odečten průměrný signál nereplikujících buněk (pozadí).

Grafy byly vytvořeny programem GraphPad Prism6. Pro sestavení grafů byla použita funkce nelineární regrese se čtyřmi parametry, rovnice funkce byla $y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \times hill\ slope)}}$, kde x představuje logaritmus použité koncentrace, y naměřenou hodnotu, „top“ a „bottom“ jsou hodnoty představující plató pro stejnou hodnotu jako y , „hillslope“ je „slope“ factor. IC_{50} je polovina maximální inhibiční koncentrace. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka.

4.3. Stanovení deaminázové aktivity pomocí peroxidázy a spektrofotometrie

4.3.1. Příprava pufrů

10x PBS (viz 4.2.1.)

3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) v pufru pro detekci peroxidázové aktivity – na 1 ml pufru bylo přidáno 10 μ l TMB (Sigma Aldrich) a 0,3 μ l 30% peroxidu vodíku.

Pufr pro detekci peroxidázové aktivity pomocí TMB – 5 ml 1M citrát-acetátového pufru; 1 g polyvinylpyrolidonu (Sigma Aldrich); objem byl doplněn ddH₂O na 100 ml; pH 4.

1M citrát-acetátový pufr – 105 g kyseliny citrónové; 61,2 g octanu sodného; objem byl doplněn ddH₂O na 500 ml.

25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl (viz 4.2.1.).

Médium pro pozorování fluorescenčních signálů (viz 4.2.1.).

4.3.2. Test na průkaz buněčné peroxidázy

Buněčná linie HeLa byla kultivována v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Médium bylo odstraněno a buňky byly 2x promyty 200 μ l 1x PBS. Vzorky byly fixovány 100% metanolem a alternativně 70% etanolem (viz 4.3.3.). Po fixaci byly vzorky 2x promyty 200 μ l 1x PBS. Poté byly vzorky stejným způsobem promyty 200 μ l ddH₂O. Na vzorky bylo aplikováno 100 μ l TMB v pufru pro detekci peroxidázové aktivity. Reakce byla zastavena 100 μ l 200 mM HCl. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí čtečky destiček (viz 4.3.7.).

4.3.3. Fixace buněčných linií

- 1) **Fixace 100% metanolem.** Médium bylo odstraněno z mikrotitrační destičky a vzorky byly 2x promyty 1x PBS temperovaným na 37°C. 1x PBS bylo odstraněno a ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l 100% metanolu. Po 10 minutách byl metanol odstraněn a destička byla usušena. Veškeré kroky probíhaly při pokojové teplotě.
- 2) **Fixace 70% etanolem nebo 70% metanolem.** Médium bylo odstraněno z destičky a vzorky byly 2x promyty 1x PBS temperovaným na 37°C. K buňkám bylo přidáno 200 μ l vymraženého 70% etanolu, respektive 70% metanolu. Vzorky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě a následně alternativně **30 minut nebo 24 hodin nebo týden** při -20°C.

Optimalizace fixace:

Buněčná linie HeLa byla kultivována na sklíčku, které bylo uloženo v Petriho misce. Vzorek byl ošetřen 10 μ M EdU (viz 4.2.2.). Poté byl vzorek fixován různými způsoby, viz výše. EdU bylo detekováno pomocí 5-FAM azidu (viz 4.2.5.) nebo biotin-PEG11-azidu a streptavidinu konjugovaného s FITC (viz 4.3.4., byl použit 40 μ M biotin-PEG11-azid; BPS Bioscience) a 10 μ M streptavidin konjugovaný s FITC (Sigma Aldrich). Všechny reakce vzorku probíhaly na „kapce“ tak, že na parafilm umístěný na pracovní plochu byla aplikována 50 μ l kapka roztoku příslušné látky. Na kapku bylo položeno sklíčko a dále bylo přeneseno na kapku další látky dle protokolu. Nakonec bylo sklíčko přeneseno na 3 μ l kapku média pro pozorování fluorescenčního signálu aplikovanou na podložní sklíčko. Vzorky byly mikroskopicky zpracovány s následnou analýzou obrazu a zpracovány v softwaru Microsoft Excel (viz 4.2.6.).

4.3.4. Ověření klik reakce mikroskopicky

Buněčná linie HeLa byla kultivována v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Vzorky byly ošetřeny 10 μ M EdU (viz 4.2.2.). Poté byly vzorky fixovány 100% metanolem (viz 4.3.3.).

Polovina destičky byla označena pomocí 5-FAM-azidu (viz 4.2.4.), druhá polovina destičky byla označena pomocí biotin-PEG11-azidu: Vzorky byly promyty 200 μ l ddH₂O. Následně byly vzorky inkubovány v 50 μ l směsi 100 mM NaCl, 10 mM hydrochinonu, 2 mM pentahydrát síranu měďnatého a 20 μ M biotin-PEG11-azidu (rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO), zásobní roztok byl 10 mM). Inkubace probíhala 60 minut při pokojové teplotě. Směs byla ze vzorků odstraněna a vzorky byly 3x propláchnuty

200 μ l 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mM NaCl. Pufir byl ze vzorků odstraněn a bylo přidáno 50 μ l směsi 20 μ M streptavidinu konjugovaného s FITC a 10 μ M DAPI v 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mM NaCl. Inkubace probíhala 60 minut. při pokojové teplotě. Směs byla ze vzorků odstraněna a vzorky byly 3x promyty 200 μ l 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mM NaCl. Na závěr bylo k buňkám přidáno 50 μ l média pro pozorování fluorescenčních signálů.

Výsledky byly vyhodnoceny mikroskopicky s následnou analýzou obrazu (viz 4.2.6.) a zpracovány v programu Microsoft Excel.

4.3.5. Detekce EdU pomocí biotin-PEG11-azidu

Optimalizace detekce

Buněčná linie HeLa byla kultivována na sklíčku, které bylo uloženo v Petriho misce. Vzorek byl ošetřen 10 μ M EdU (viz 4.2.2.) a fixován vymraženým 70% etanolem 20 minut při pokojové teplotě a následně 30 minut při -20°C (viz 4.3.3.).

- 1) **Biotin-PEG11-azid.** Veškeré reakce vzorku fixovaného na sklíčku probíhaly na 40 μ l „kapce“. Postupovalo se jako u ověření „click“ reakce mikroskopicky (viz 4.3.4.). K detekci byla použita směs obsahující alternativně 20 μ M biotin-PEG11-azid (zásobní 10 mM roztok byl rozpuštěn v DMSO), 40 μ M biotin-PEG11-azid nebo 20 μ M picolylazid-PEG4-biotin (zásobní 10 mM roztok byl rozpuštěn v DMSO; Jena Biosciences). Další kroky a vypracování výsledků byly provedeny dle postupu uvedeného níže v části Detekce.
- 2) **Streptavidin konjugovaný s peroxidázou.** Veškeré reakce vzorku probíhaly rovněž na 40 μ l „kapce“. Postupovalo se dle postupu uvedeného níže v části Detekce. Po inkubaci se směsí obsahující biotin-PEG11-azid a následném vymytí a permeabilizaci byly vzorky inkubovány se směsí streptavidinu konjugovaného s peroxidázou (zásobní roztok 1 mg/ml) ředěného alternativně 500x, 1 000x, 2 000x, 4 000x, 8 000x, 16 000x a 30 000x v pufru 0,1% BSA a 0,05% Tween-20 v 1x PBS. Další kroky a vyhodnocení byly provedeny dle postupu uvedeného níže v části Detekce.

Detekce

Buněčná linie HeLa byla ošetřena pomocí EdU a EdC (viz 4.2.2.) a fixována 70% etanolem (viz 4.3.3.). Fixované vzorky byly až do vyhodnocení skladovány v mrazáku.

Vzorky byly 3x promyty 200 μ l 1xPBS. Ke vzorkům bylo přidáno 50 μ l směsi 100 mM NaCl, 10 mM hydrochinonu, 2 mM pentahydrátu síranu měďnatého a 40 μ M biotin-PEG11-azidu (rozpuštěn v DMSO; zásobní roztok byl 10 mM) v deionizované vodě. Buňky byly se směsí inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. Směs byla následně odstraněna. Do jamek bylo přidáno 200 μ l 1x PBS Po pěti minutách byl pufr odstraněn a nahrazen novým. Tento krok byl ještě jednou opakován. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l 1% BSA v 1x PBS a vzorky byly inkubovány po dobu 60 minut při 37°C. Roztok BSA byl odstraněn a ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l 0,1% BSA, 0,05% Tween-20 v 1x PBS. Roztok byl nahrazen 50 μ l směsí streptavidinu konjugovaného s peroxidázou (0,03 μ g/ml; zásobní roztok 1 mg/ml; Jackson ImmunoResearch) v pufru 0,1% BSA a 0,05% Tween-20 v 1x PBS. Vzorky byly inkubovány 60 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky 3x promyty 200 μ l pufru 0,1% BSA a 0,05% Tween-20 v 1x PBS. Vzorky pak byly 3x promyty 200 μ l 1x PBS a 3x 200 μ l deionizované vody. K buňkám bylo přidáno 100 μ l TMB v pufru pro detekci peroxidázové aktivity. V závislosti na rychlosti reakce a vznikajícím modrém zbarvení byla reakce zastavena přidáním 100 μ l 200 mM HCl. Absorbance byla změřena pomocí čtečky destiček EnVision Plate Reader (Perkin Elmer, USA) při vlnové délce 450 nm.

4.3.6. Stanovení počtu buněk a kalibrace na počet buněk

- 1) **Stanovení počtu buněk.** Buněčná linie HeLa byla kultivována na 96-jamkové mikrotitrační destičce v koncentraci od 0 do 100 % buněk (viz Tab. I). Vzorky byly fixovány 100 % metanolem po dobu 10 minut, poté byl metanol odstraněn a vzorky byly vysušeny. Následně bylo provedeno stanovení celkového proteinu metodou bicinchoninové kyseliny (BCA) pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Postupovalo se dle návodu výrobce. Absorbance byla měřena na čtečce destiček EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA) při vlnové délce 562 nm.

Tab. I: Rozložení vzorků na mikrotitrační destičce s postupně zvyšujícím se počtem buněk v jamce

Jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Koncentrace buněk [%]	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

- 2) **Kalibrace na počet buněk.** Obsah jamek byl po detekci EdU pomocí biotin-PEG11-azidu odstraněn a nahrazen 200 μ l deionizované vody. Tento krok byl opakován ještě 2x. Následně bylo dle návodu výrobce provedeno stanovení celkového proteinu pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay. Absorbance byla změřena pomocí čtečky destiček EnSpire Multimode Plate Reader při vlnové délce 562 nm.

4.3.7. Měření a analýza dat

Data získaná pomocí čtečky destiček byla zpracovávána v programu Microsoft Excel. Každá hodnota absorbance pro TMB byla vydělena odpovídající hodnotou absorbance pro BCA (pro stejnou jamku). Tím byl potlačen vliv odlišného počtu buněk v jednotlivých jamkách. Následně byl vypočten průměr pro jednotlivé vzorky. Od vypočtených hodnot byla odečtena hodnota pozadí vypočtená z jamek bez EdU a EdC. Výsledné grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 6. Pro sestrojení grafů byla použita funkce nelineární regrese (viz 4.2.5).

4.4. Stanovení deaminázové aktivity pomocí fluorescence a čtečky destiček

4.4.1. Použité pufry

25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl (viz 4.2.1.)

1M Tris-HCl, pH 8 při 30°C (viz 4.2.2.)

4.4.2. Ošetření buněčné linie inhibitorem deamináz

Buněčné linie byly kultivovány v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Kultivace probíhala v inkubátoru Thermo Scientific Steri Cycle po dobu 24 hodin při 37°C, v 5% atmosféře CO₂. K buňkám bylo přidáno médium s přidavkem alternativně 2 nebo 10 μ M EdU nebo EdC a současně byl přidán alternativně 20 μ M tetrahydrouridin (THU; Abcam), 20 μ M 2-(1-beta-D-ribofuranosyl)-3,4-dihydro-1H-1,3-diazepin-2(7H)-on (diazepinon ribosid, dar od Dr. Rosenberga, ÚOCHB AV ČR, Praha) nebo 20 μ M zebularin (Santa Cruz Biotechnology; viz Tab. II). Kontrolní buňky byly inkubovány pouze s EdU a EdC, nebo bez přidavku EdU a EdC. Buňky byly inkubovány 4 hodiny při 37°C 5% atmosféře CO₂.

Tab. II. Typické rozložení aplikovaných látek a jejich koncentrací v 96- jamkové mikrotitrační destičce

Řádek	Sloupec	1	2	3	4	5	Sloupec	6	7	8	9	10	11	12
A		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–
B	EdU (μM)	–	250	50	10	2	EdU (μM)	0,4	0,08	0,016	K	K	K	–
C	EdU (μM)	–	250	50	10	2	EdU (μM)	0,4	0,08	0,016	K	K	K	–
D	EdU s 20 μM THU (μM)	–	10	10	2	2	EdU s 20 μM Diazep. (μM)	10	10	2	2	K	K	–
E	EdC s 20 μM THU (μM)	–	10	10	2	2	EdC s 20 μM Diazep. (μM)	10	10	2	2	K	K	–
F	EdU s 20 μM Zeb. (μM)	–	10	10	2	2	EdC (μM)	10	10	2	2	K	K	–
G	EdC s 20 μM Zeb. (μM)	–	10	10	2	2		K	K	K	K	K	K	–
H		–	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–

THU – tetrahydrouridin; Zeb. – zebularin; Diazep. – diazepinon ribosid; K – kontrola, buňky bez aplikace jakýchkoliv látek

4.4.3. Detekce EdU pomocí 5-FAM azidu

Buněčná linie HeLa byla ošetřena pomocí EdU a EdC (viz 4.2.2.) nebo pomocí EdU a EdC s přidávkem inhibitoru deamináz (viz 4.4.2.) a fixována 70% etanolem (viz 4.2.3.).

Ze zafixovaných vzorků byl odstraněn etanol. Vzorky byly 3x promyty 200 μl 1x PBS a ke vzorkům bylo přidáno 100 μl směsi 10 mM hydrochinonu, 2 mM pentahydrátu síranu měďnatého a 20 μM 5-FAM azidu v deionizované vodě. Vzorky byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Poté byla směs odstraněna. Vzorky byly následně 3x promyty 200 μl 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μl 1 μM DAPI ve 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, a 150 mM NaCl. Destička byla zapečetěna parafilmem a inkubována 30 minut na třepačce Thermomixer comfort (Eppendorf) při pokojové teplotě a 300 rpm. Poté byl roztok DAPI odstraněn, buňky byly 10 minut promývány 200 μl 0,2% Tween-20 v 1x PBS na třepačce při pokojové teplotě a 500 rpm. Tento krok byl opakován ještě 3x. K buňkám bylo následně přidáno 120 μl proteinázy K (Thermo Scientific; 0,1 mg/ml v 50 mM Tris-HCl, pH 8 při 30°C). Buňky byly inkubovány 60 minut na třepačce při 37°C a 450 rpm. Z destičky pak bylo přeneseno 100 μl směsi obsahující proteinázou K ovlivněné vzorky do černé 96-jamkové mikrotitrační destičky. Do každé jamky černé destičky bylo dále přidáno 20 μl 10% dodecylsíranu sodného (SDS) a obsah byl dobře promíchán opatrným pipetováním. Na čtečce destiček Infinite M200pro (Tecan) byl změřen fluorescenční signál odpovídající DAPI a 5-FAM azidu. Pro DAPI probíhalo měření při excitační vlnové délce 355 ± 4 nm a emisní vlnové délce 460 ± 10 nm. Pro 5-FAM azid probíhalo měření při excitační vlnové délce 488 ± 4 nm a emisní vlnové délce 520 ± 10 nm.

4.4.4. Měření a analýza dat

Data byla zpracována programem Microsoft Excel. Nejprve byla vypočtena průměrná hodnota pozadí pro jamky bez vzorků měřené pro vlnovou délku DAPI. Tato hodnota byla odečtena od signálů DAPI změřeny v jamkách obsahujících buňky. Vliv počtu buněk na množství inkorporovaného EdU byl potlačen vydělením signálu změřeného pro 5-FAM azid signálem změřeným pro DAPI. Od vypočtených hodnot bylo následně odečteno pozadí a byl spočítán průměr ze dvou opakování. Pozadí představovala průměrná hodnota získaná z jamek s buňkami, které neobsahovaly přísady žádných látek. Výsledné hodnoty byly následně přepočteny na procenta. To výrazně zjednodušilo možnost vzájemného porovnání průběhu jednotlivých grafů a naměřených parametrů. Jelikož 50 μM koncentrace EdU nejčastěji poskytovala nejvyšší signál, byla veškerá další měření vztažena k této koncentraci a její hodnota byla stanovena jako hodnota 100%. Grafy byly vytvořeny a analyzovány programem GraphPad Prism6. Pro jejich vytvoření a analýzu byla použita rovnice nelineární regrese (viz 4.2.5).

4.5. Stanovení množství CDD a DCTD metodou Western Blot

4.5.1. Použité pufrы

1M Tris-HCl, pH 7,5 – 60,57 g Trizma Base; 35,6 ml 35% HCl; objem byl doplněn ddH₂O na 500 ml.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – 3,026 g Trizma Base; 23,86 ml 1M HCl; objem byl doplněn deionizovanou vodou na 50 ml.

10x Tris glycine running buffer (TGS) – 30 g Trizma Base; 144 g glycinu; 10 g dodecylsírany sodného; objem byl doplněn ddH₂O na 1 l.

5X Laemmliho vzorkovací pufr – 0,5 g SDS; 3,75 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4,5 ml glycerolu; 0,5 ml 0,25% bromfenolové modře (rozpuštěna v deionizované vodě); 1,25 ml β -merkaptoetanolu; objem byl doplněn ddH₂O na 10 ml.

Transferový pufr (modifikovaný Towbinův pufr) – 6 g Trizma Base; 28,8 g; 300 ml metanolu; objem byl doplněn ddH₂O na 2 l.

Ponceau S – 1,25 g ponceau S; 2,5 ml kyseliny octové, objem byl doplněn ddH₂O na 250 ml.

10x Tris buffered saline (TBS) – 24,2 g Trizma Base; 80 g NaCl; pH bylo upraveno 1M HCl na pH 7,6; objem byl doplněn ddH₂O na 1 l a zředěn na pracovní koncentraci 1x TBS.

TBS/T pufr – 1 ml Tween-20; 1 l pufru 1x TBS.

Blokovací pufr – 1g sušeného odtučněného mléka Blotto (Santa Cruz Biotechnology); objem byl doplněn na 20 ml pufrem TBS/T.

Primární protilátka v 0,05% Tween-20 a 5% mléce v 1x TBS – 0,15 g sušeného odtučněného mléka Blotto; 1,5 μ l Tween-20; 3 μ l primární protilátky (viz 4.5.2.); objem byl doplněn na 3 ml pufrem 1x TBS.

Sekundární protilátka v 5% mléce v TBS/T – 1 g sušeného odtučněného mléka Blotto; 2 μ l sekundární protilátky (viz 4.5.2.); objem byl doplněn na 20 ml pufrem TBS/T.

RIPA pufr – Protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich; rozpuštěn v 10 ml deionizované vody); 0,5 g deoxycholátu sodného; 0,1 g SDS; 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8; 1 ml 100 mM fenylmetansulfonylfluoridu (Sigma Aldrich); 0,021 g fluoridu sodného (rozpuštěno ve 40 ml deionizované vody); 15 ml 1M NaCl; 1 ml Triton X-100 (Sigma Aldrich); objem byl doplněn na 90 ml. RIPA byl rozpipetován a zamražen bez inhibitoru. Inhibitor byl přidán těsně před použitím v poměru 1:9.

4.5.2. Protilátky

Primární monoklonální protilátka proti CDA (Santa Cruz Biotechnology), primární monoklonální protilátka proti DCTD (Santa Cruz Biotechnology), sekundární polyklonální protilátka Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch).

4.5.3. Příprava lyzátů

Buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích (75 cm²). Následně byl pomocí mikroskopické stanice vybavené CCD kamerou určen přibližný počet buněk v lahvi. Z lahví bylo pipetou odsáto médium a vzorky byly promyty vychlazeným 1x PBS. Do lahví byl přidán lyzační pufr RIPA. Na každý milión buněk byl přidán 1 ml pufru. Buňky byly seškrabány a suspenze byla přenesena do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledu a následně centrifugovány 10 minut při 20 000x g a 4°C. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky.

Použitím kitu Pierce BCA Protein Assay Kit byla stanovena koncentrace celkového proteinu v lyzátech. Postupovalo se podle návodu výrobce.

4.5.4. Denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro SDS-PAGE byla použita vertikální elektroforetická aparatura a polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm. Pro přípravu gelu byl použit kit TGX Stain-

Free FastCast Acrylamide (Bio-Rad). Při přípravě gelu se postupovalo podle návodu výrobce. Mezi skla byl nejdříve nanesen „rozdělovací“ gel a na něj zaostřovací gel. Po ztuhnutí byly gely vloženy do sestavené aparatury a byly zality 1x TGS pufrem.

K 25 μ l lyzátu bylo přidáno 6,25 μ l 5x Laemmliho vzorkovacího pufru. Lyzáty byly inkubovány 10 minut na 95°C a následně byly zchlazeny na pokojovou teplotu. Na gel byl nanesen molekulový standard a 10 μ g proteinu z každého vzorku. Separace probíhala 5 minut při konstantním napětí 100 V, poté bylo napětí zvýšeno na 120 V. Separace probíhala přibližně 1,5 hodiny. Průběh byl kontrolován pomocí molekulového standardu. Po ukončení separace byla aparatura odpojena. Skla s gelem byly rozebrány, z gelu byla odřezána horní zaostřovací část a gel byl namočen do transferového pufru přibližně na 10 minut.

4.5.5. Western blot

Nitrocelulózová membrána 0,2 μ m (Bio-Rad) byla aktivována inkubací v transferovém pufru po dobu přibližně 5 minut. Nádoba blotovacího přístroje byla naplněna vychlazeným transferovým pufrem. Houby na blotování i blotovací papír byly předem na chvíli namočeny do transferového pufru. Do kazety na Western Blot byla vložena nejprve houba, na tu byl položen blotovací papír, nitrocelulózová membrána, gel, následoval další blotovací papír a poslední vrstvu tvořila opět houba. Případné bubliny byly vytlačeny. Kazeta byla vložena do nádoby blotovacího přístroje. Nádoba byla přikryta víkem a připojena ke zdroji. Přenos probíhal 1 hodinu při konstantním napětí 75 V. Roztok byl po celou dobu mírně promícháván pomocí magnetického míchadla na magnetické míchačce.

Po ukončení přenosu byla aparatura rozebrána, membrána byla vyjmuta a promyta v 1x TBS pufru za stálého třepání 1 minutu. 1x TBS pufr byl nahrazen blokovacím pufrem. Blokace membrány probíhala za stálého třepání 1 hodinu. Membrána byla promyta pufrem TBS/T za stálého třepání po dobu 15 minut. Pufr byl v průběhu inkubace vždy po pěti minutách vyměněn za čerstvý. Následně byla membrána opatrně vyndána z vaničky a vložena do uzavíratelného igelitového sáčku. Membrána byla převrstvena 3 ml roztoku primární protilátky (1:1 000) ředěné v mléce a 1x TBS. Případné bublinky byly vytlačeny. Inkubace probíhala přes noc za stálého míchání při 4°C. Následující den byla membrána promyta pufrem TBS/T za stálého třepání po dobu 15 minut, pufr byl v průběhu inkubace vždy po pěti minutách vyměněn za čerstvý. Po promytí bylo aplikováno 20 ml roztoku sekundární protilátky (1:10 000) ředěné v mléce a TBS/T. Protilátka byla následně

vymývána 20 minut v TBS/T pufru za stálého míchání, pufr byl vždy po pěti minutách vyměněn za čerstvý. Membrána byla následně krátce inkubována s 2 μ l Luminata Forte (Merck Millipore). Chemiluminiscence byla snímána HCD kamerou na přístroji ChemiDoc, pro snímání bylo použito nastavení pro chemiluminiscenci při vysokém rozlišení a expoziční čas byl automaticky stanoven podle nejintenzivnějšího „bandu“. V programu pro přístroj ChemiDoc byla rovněž provedena analýza identifikovaných „bandů“. Intenzita signálu odpovídající koncentraci sledovaných proteinů jednotlivých buněčných linií byla následně normalizována na linii s nejintenzivnějším signálem. Tato hodnota byla rovna 100%. Data byla vyhodnocena programem Microsoft Excel. Experimenty byly provedeny v pěti opakováních.

5. VÝSLEDKY

Hlavním cílem práce byl vývoj systému pro rychlé posouzení deaminační aktivity v buňkách bez nutnosti jejich destrukce. Pro vývoj přístupu bylo využito stanovení replikační aktivity pomocí inkorporace nukleosidového analogu. Vyvíjený postup byl založen na nález, že EdC není efektivně inkorporován do buněčné DNA, naopak je efektivně deaminován na EdU, který je následně fosforylován buněčnými kinázami a inkorporován do buněčné DNA (Ligasová a kol., 2015). Míra inkorporace EdU je pak funkcí deaminační aktivity. V této diplomové práci byla testována možnost použití EdC a následného stanovení EdU v DNA pro stanovení deaminační aktivity. Současně byla testována možnost použít tento přístup pro vzájemné porovnání deaminační aktivity u různých buněčných linií.

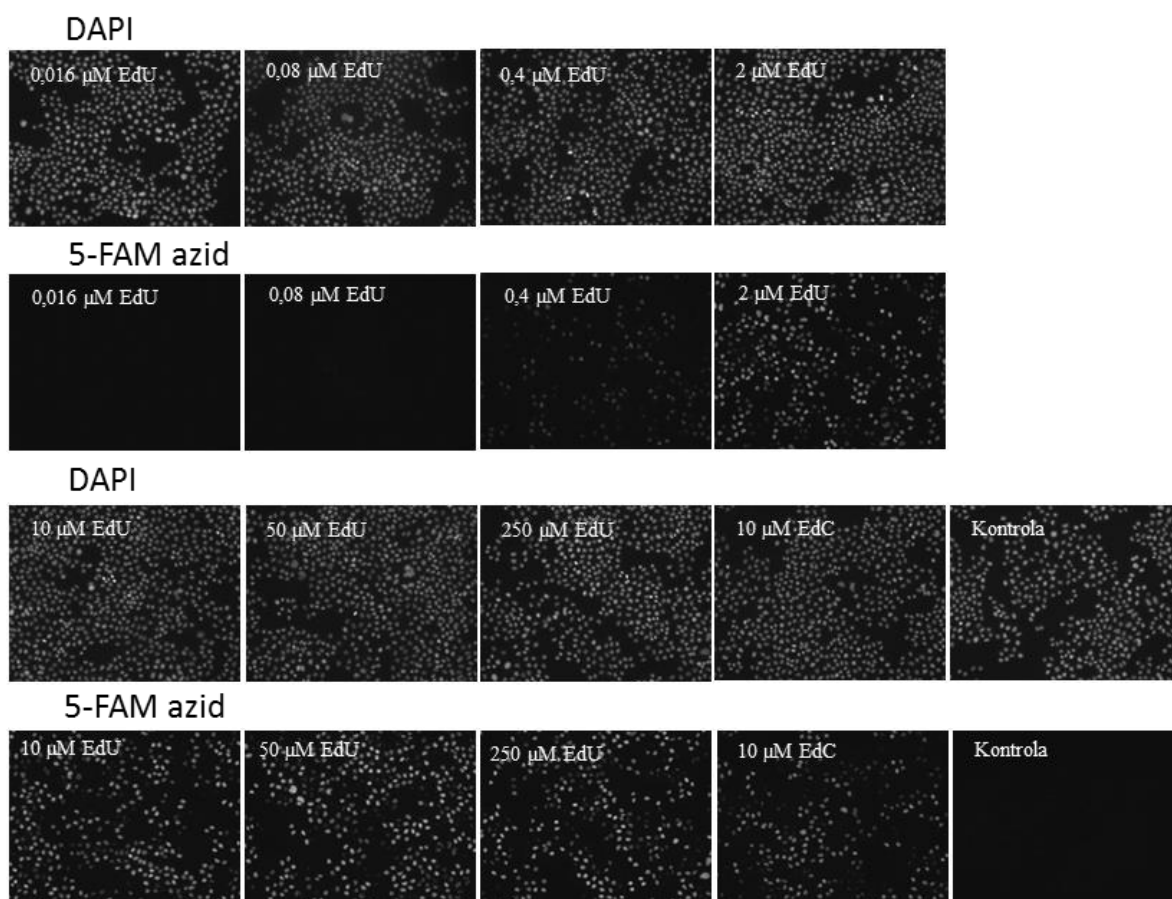
Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi EdU a EdC a následně byl stanoven signál poskytovaný inkorporovaným EdU třemi různými metodami. Důvodem současného stanovení EdU bylo pozorování, že rozdílné buněčné linie inkorporují EdU s různou účinností a rovněž se liší jejich replikační aktivita (Ligasová a kol., 2015). V experimentech byly buňky inkubovány s 0; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10; 50 nebo 250 μM EdU nebo s 10 μM EdC po dobu 4 hodin a následně byly 20 minut fixovány vymraženým 70% etanolem při pokojové teplotě a následně 60 minut při -20°C .

Pro vzájemné porovnání použitých přístupů byla použita buněčná linie HeLa. Tato linie velice efektivně inkorporuje EdU a vykazuje silnou deaminační aktivitu, která je nutná pro proměnu EdC na EdU. První testovaný přístup byl založen na detekci EdU pomocí tzv. „click“ reakce s azidovaným 5-FAM (Salic a Mitchison, 2008) a následném vyhodnocení signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Druhý přístup byl založen na detekci EdU pomocí „click“ reakce s azidovaným biotinem a následné detekci biotinu pomocí avidinu konjugovaného s peroxidázou. Jako substrát byl použit TMB. Následně byla stanovena absorbance při vlnové délce 450 nm pomocí čtečky destiček. Poslední přístup byl podobně jako první přístup založen na „click“ reakci s 5-FAM, ovšem pro stanovení fluorescenčního signálu byla použita čtečka destiček.

5.1. Stanovení deaminační aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie

Jak již bylo výše zmíněno, první přístup pro detekci EdU byl založen na „click“ reakci s azidovanou fluorescenční molekulou a vyhodnocení fluorescenčních signálů pomocí fluorescenčního mikroskopu s následnou analýzou obrazu (viz 4.2.). Nespornou výhodou této metody je rychlost zpracování vzorku. Vzorky po inkorporaci EdU a fixaci byly promyty pufrům a inkubovány ve směsi s azidovanou fluorescenční molekulou, v tomto případě 5-FAM, reagující pomocí klik reakce s EdU. Reakce byla katalyzována jednomocnými ionty mědi. Následovalo důkladné promytí vzorků, kdy byly odstraněny nenavázané fluorescenční molekuly. Na závěr byly vzorky zality do média pro pozorování fluorescenčních signálů. Médium obsahující glycerin a DABCO umožňuje zachování fluorescenčních signálů a brání vyhasínání fluorochromů. Vzorky byly vyhodnoceny okamžitě po zpracování nebo byly skladovány v mrazáku a následně vyhodnoceny. Celá procedura trvala 7 hodin, přičemž 4 hodiny trvalo značení pomocí EdU, fixace cca 1 hodinu, a samotná detekce inkorporovaného EdU trvala 2 hodiny.

Nespornou výhodou této metody byla její přesnost. Jelikož buňky byly kromě azidovaného 5-FAM rovněž inkubovány s DAPI, která po navázání na dvouvláknovou molekulu DNA silně fluoreskuje (Kapuściński J., Szer W., 1979), bylo tudíž možné měřit fluorescenci výhradně v oblasti buněčných jader. Pomocí mikroskopu a kamery byly pořízeny digitální snímky buněk (Obr. 11).



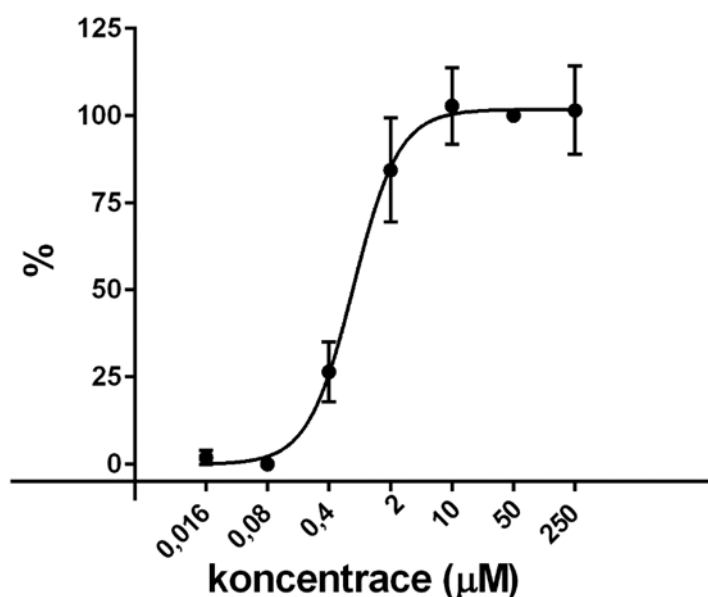
Obr. 11: Stanovení deaminační aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie u linie HeLa.

K buňkám byly přidány různé koncentrace EdU nebo 10 μM EdC. Kontrolní vzorky byly inkubovány v čistém médiu. Inkorporované EdU bylo následně konjugováno s azidovaným 5-FAM. DNA buněk byla značena fluorescenční molekulou DAPI. Snímky zobrazují míru inkorporace EdU, vyšší koncentrace EdU vykazovaly vyšší fluorescenční signál. 10 μM EdC poskytovalo výrazně menší signál než 10 μM EdU.

Následně byla pomocí značení 10 μM EdU a analýzy obrazu určena frakce replikujících buněk. Tato frakce byla následně snížena o 10 % (viz 4.2.3.). Snížená frakce nejvyšších naměřených signálů poskytovaných EdU pak sloužila pro analýzu vzorků z hlediska množství inkorporovaného EdU. Velkou nevýhodou této metody byla pracnost a časová náročnost vyhodnocení fluorescenčních signálů. Každý vzorek byl přítomen v šesti opakováních (respektive ve 12 opakováních pro vzorky s EdC). Z každé jamky mikrotitrační destičky obsahující vzorek byly pořízeny dva snímky. Takto vzniklo dohromady 12 (respektive 24 snímků) na jeden vzorek (celkem 9 vzorků), jež byly podrobeny analýze softwarem CellProfiler (Carpenter a kol., 2006; Kamensky a kol., 2011). Poté byly naměřené hodnoty zpracovány softwarem Microsoft Excel a následně byly ze získaných dat sestrojeny grafy programem GraphPad Prism6. Produkce EdU z EdC

byla vypočítána pomocí nelineární regrese dat ze seriálního ředění EdU. Pro tyto měření byla použita rovnice $y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \times hill\ slope)}}$, kde x představuje logaritmus použité koncentrace, y naměřenou hodnotu, „top“ a „bottom“ jsou hodnoty představující plató pro stejnou hodnotu jako y, „hillslope“ je „slope“ faktor. Hodnoty koncentrací produkovaného EdU z 10 μ M EdC jsou uvedeny v tabulce IX. Navíc součástí přístupu bylo stanovení frakce replikujících buněk. Tento krok sice zpřesňuje výsledky, nicméně současně zvyšuje časovou náročnost celé procedury. Vyhodnocení jedné destičky se stanovením frakce replikujících buněk představovalo přibližně 5 hodin.

Výsledkem stanovení deaminační aktivity byla sigmoidní křivka zobrazující závislost fluorescenčního signálu na logaritmu koncentrace EdU (viz Obr. 12).



Obr. 12: Graf zobrazující závislost relativního signálu na logaritmu koncentrace EdU detekovaného pomocí fluorescenční mikroskopie

HeLa buňky byly inkubovány s odlišnými koncentracemi EdU, které bylo následně detekováno „click“ reakcí s 5-FAM azidem. Data byla normalizována na signál poskytovaný 50 μ M EdU. Tato koncentrace byla rovna 100 %. Koncentrace EdU při poloviční hodnotě maximálního signálu (EC_{50}) byla rovna $0,76 \pm 0,06$ μ M EdU. Pro vzorky inkubované s 10 μ M EdC odpovídal signál asi 61,58 % signálu 50 μ M EdU. To odpovídalo cca 0,98 μ M koncentraci EdU. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba měření.

Pro hodnoty 0,016 a 0,08 nebyl zaznamenán signifikantní signál. Přibližně od 10 μ M koncentrace nastává fáze plató a při 250 μ M koncentraci specifický signál začíná slábnout. Důvodem je pravděpodobně toxické působení EdU. Pro potřeby grafu byla hodnota signálu u 250 μ M EdU stanovena na 100 %. Hodnota EC_{50} , tj. koncentrace EdU,

kteřá produkovala fluorescenční signál o velikosti 50 % maximálního signálu, byla $0,76 \pm 0,06 \mu\text{M}$. Z grafu byla rovněž určena koncentrace EdU, při níž je fluorescenční signál roven signálu $10 \mu\text{M}$ EdC. Tato hodnota pak byla použita pro porovnání deaminační aktivity různých linií. U HeLa buněk $10 \mu\text{M}$ EdC představoval naměřený signál 61,58 % signálu naměřeného ve vzorcích inkubovaných s $50 \mu\text{M}$ EdU a což odpovídalo $0,98 \mu\text{M}$ EdU. Obecně by mělo platit, že vyšší hodnota znamená i vyšší deaminační aktivitu.

V souhrnu lze konstatovat, že výhodou stanovení deaminázové aktivity pomocí fluorescenční mikroskopie je její přesnost, dále jednoduchost a časová nenáročnost detekce EdU, jelikož trvala pouhé 2 hod. Naopak, samotné vyhodnocení vzorků a zpracování dat je pracné a zdlouhavé. Vyžaduje nafočení celé destičky, analýzu snímků programem a zpracování naměřených dat a stanovení frakce replikujících buněk. Celková doba vyhodnocení trvala nejméně 5 hod. Pro rutinní stanovení deaminační aktivity je tato metoda příliš pracná a zdlouhavá. Proto byl testován systém založený na vyhodnocení pomocí čtečky destiček. Tento systém měl urychlit zejména proces vyhodnocení.

5.2. Stanovení deaminační aktivity pomocí peroxidázy a spektrofotometrie

Nejprve byl testován systém, který k detekci inkorporovaného EdU využívá biotin-PEG11-azid. Biotin-PEG11-azid reaguje pomocí „click“ reakce s etynylovou skupinou EdU stejně jako 5-FAM azid. Na rozdíl od 5-FAM azidu biotin-PEG11-azid není možné využít pro přímé měření fluorescence ani absorbance bez následné detekce biotinu. Pro detekci biotinu byl použit streptavidin konjugovaný s peroxidázou. Teoretickou výhodou detekce pomocí peroxidázy je možnost amplifikace signálu, kdy peroxidáza přeměňuje substrát za vzniku zpravidla barevného produktu. Jako substrát byl použit TMB. Po přidání peroxidu vodíku peroxidáza redukuje peroxid vodíku na vodu, přičemž donorem vodíku je chromogenní TMB, který se přeměňuje na modrý 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin diimin. Množství vznikajícího 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin diiminu je úměrné množství inkorporovaného EdU a lze ho měřit pomocí čtečky destiček stanovením absorbance vzorku (Josephygg, Elingg, Mason, 1982). Pro zastavení reakce byl použit roztok kyseliny. Tím současně došlo k terminální oxidaci a ke změně původně modrého zbarvení na žluté. Koncentrace produktu byla následně stanovena pomocí měření absorbance při 450 nm.

Vlastní detekce EdU je u tohoto systému podobná jako u fluorescenční mikroskopie. Po inkubaci vzorku s EdU, respektive EdC a fixaci následovalo vymytí fixáží a inkubace se směsí obsahující biotin-PEG11-azid (viz 4.3.). I zde musela být směs

důkladně vymyta. Poté byly buňky permeabilizovány pomocí BSA a Tween-20. Následně byly vzorky inkubovány s peroxidázou konjugovanou se streptavidinem. Následovalo vymytí nenavázané peroxidázy, které se ukázalo jako velmi kritický krok. Důvodem je fakt, že peroxidáza se nespecificky váže na stěny mikrotitrační destičky, způsobuje tím falešnou pozitivitu a zvyšuje absorbanci vzorku. Proto byla peroxidáza vymývána ve třech krocích, nejprve pomocí BSA a Tween-20 v PBS, následně pomocí PBS a nakonec pomocí deionizované vody. I přes pečlivé vymývání nenavázané peroxidázy výsledky vykazovaly vysoké odchylky.

Aby bylo vyloučeno, že buňky produkují vlastní peroxidázu, která by způsobovala falešnou pozitivitu, byl proveden test na obsah buněčné peroxidázy. V tomto případě byly HeLa buňky fixovány 100% metanolem, fixáž byla vymyta a ke vzorkům bylo přidáno TMB v pufru pro detekci peroxidázové aktivity (viz 4.3.2.). Tento experiment ukázal, že buňky vlastní peroxidázu neprodukují nebo je její aktivita extrémně nízká. Dále byla testována efektivita detekce. HeLa buňky byly značeny pomocí 10 μM EdU a fixovány 100% metanolem. Inkorporované EdU bylo v prvním kroku detekováno pomocí „click“ reakce s biotin-PEG11-azidem, v dalším kroku pomocí streptavidinu konjugovaného s fluorescenční molekulou FITC a vzorky byly vyhodnoceny (viz 4.3.4.). Výsledky byly porovnány s detekcí EdU pomocí 5-FAM azidu. Výsledky ukázaly, že signál pro biotin-PEG11 azid byl velmi slabý, cca 3x menší než pro 5-FAM azid (viz Tab. III).

Tab. III: Porovnání fluorescenčního signálu pro EdU detekovaný pomocí 5-FAM azidu a biotin-PEG11-azidu

	5-FAM azid	Biotin-PEG11-azid
Fluorescenční signál	0,2303 \pm 0,0025	0,076 \pm 0,0677

V další fázi byly testovány modifikace protokolu a jejich vliv na výšku specifického signálu. Nejdříve byl zkoumán vliv použitého fixačního činidla. Byla porovnávána fixace 100% metanolem a ledovým 70% etanolem (viz 4.3.3.). V tomto experimentu byla linie HeLa inkubována s 10 μM EdU a k detekci byl použit biotin-PEG11-azid v kombinaci se streptavidinem konjugovaným s fluorescenční molekulou FITC. Pro vyhodnocení byl použit fluorescenční mikroskop. Pro srovnání byl k detekci použit i 5-FAM azid. Výsledky ukázaly, že vzorky po fixaci etanolem, zejména při detekci pomocí biotin-PEG11-azidu, prokazatelně vykazovaly vyšší specifický signál (viz Tab. IV).

Tab. IV: Porovnání fluorescenčního signálu po fixaci 100% metanolem nebo 70% etanolem pro EdU detekovaný pomocí 5-FAM azidu a Biotin-PEG11-azidu

	100% metanol	70% etanol
5-FAM azid	0,2585 ± 0,0341	0,3463 ± 0,0078
Biotin-PEG11-azid	0,144 ± 0,0039	0,3481 ± 0,0027

Dále byla testována fixáž ledovým 70% metanolem. Tato fixáž poskytovala přibližně stejný signál jako fixáž vymraženým 70% etanolem. Rovněž byl testován vliv doby fixace vzorků. Vzorky byly fixovány 70% etanolem, uloženy do mrazáku na dobu 30 minut, 24 hodin nebo jeden týden. Signál v případě použití biotin-PEG11-azidu s delší dobou fixace se postupně snižoval. To ovšem neplatilo pro 5-FAM azid, kde délka fixace neměla vliv na intenzitu specifického signálu (viz Tab. V).

Tab. V: Vliv délky fixace 70% etanolem na intenzitu fluorescenčního signálu pro EdU detekovaný pomocí 5-FAM azidu a Biotin-PEG11-azidu

	30 min	24 hod	1 týden
5-FAM azid	0,3509 ± 0,0055	0,3209 ± 0,0606	0,3632 ± 0,0259
Biotin-PEG11-azid	0,2539 ± 0,0132	0,1148 ± 0,0145	0,0303 ± 0,0167

Kromě vlivu fixáže byl testován vliv použití dvojnásobné koncentrace biotin-PEG11-azidu na velikost specifického signálu (viz 4.3.4.). Byla testována 40 µM koncentrace biotin-PEG11-azidu namísto 20 µM koncentrace. Kromě biotin-PEG11-azidu byl testován i alternativní biotinylovaný azid – picolylazid-PEG4-biotin a to v koncentraci 20 µM. V případě zvýšení koncentrace biotin-PEG11-azidu došlo k téměř dvojnásobnému zvýšení specifického signálu (viz Tab. VI).

Tab. VI: Vliv koncentrace Biotin-PEG11-azidu a použití Picolylazid-PEG4-biotinu na intenzitu fluorescenčního signálu pro EdU

	40 µM Biotin-PEG11-azid	20 µM Picolylazid-PEG4-biotin	20 µM Biotin-PEG11-azid
Signál	0,1823	0,3164	0,0931
Pozadí	0,096	0,1143	0,1196
Poměr signál/pozadí	1,899	2,7682	0,7784

Signál v jádrech však nebyl rovnoměrný, uprostřed jader byl nejnižší a směrem k buněčné membráně se zvyšoval. Nerovnoměrný signál v jádrech mohl být způsoben nedostatečným průchodem streptavidinu do buněčného jádra. Picolylazid-PEG4-biotin je chemická sloučenina, která ve své struktuře obsahuje Cu^+ , což usnadňuje a zrychluje „click“ reakci (Uttamapinant a kol., 2012). Experimenty však neprokázaly zvýšení

specifického signálu při použití picolylazid-PEG4-biotinu. Naopak, bylo pozorováno vysoké pozadí.

Jelikož byl u 40 μM koncentrace biotin-PEG11-azidu pozorován nerovnoměrný signál, byl dále používán v koncentraci 20 μM (viz 4.3.5.). Rovněž byl testován vliv ředění streptavidinu konjugovaného s peroxidázou. Vzorčky byly inkubovány s 10 μM EdU a následně byly fixovány 70% etanolem. Streptavidin konjugovaný s peroxidázou byl použit v koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ (ředěn 500x), 1 $\mu\text{g/ml}$ (ředěn 1 000x), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (ředěn 2 000x). Koncentrace komplexu streptavidinu s peroxidázou v zásobním roztoku byla 1mg/ml. Z rychlosti vzniku a intenzity zabarvení bylo zřejmé, že veškeré testované koncentrace jsou příliš vysoké a v jejich důsledku je výrazně zvýšena i nespecifická reakce. Podle očekávání v rámci daného experimentu probíhala reakce nejpomaleji u 2 000x zředěného enzymu.

V následujícím experimentu byly při téže podmínkách použity tyto koncentrace komplexu streptavidin-peroxidáza: 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,125 $\mu\text{g/ml}$ a 0,0625 $\mu\text{g/ml}$. Po zmodrání, což trvalo méně než 10 min, byla reakce zastavena 100 μl 200 mM HCl a byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Byl proveden ještě třetí experiment, kde byla použita koncentrace komplexu 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (souhrnné výsledky obou experimentů viz Tab. VII).

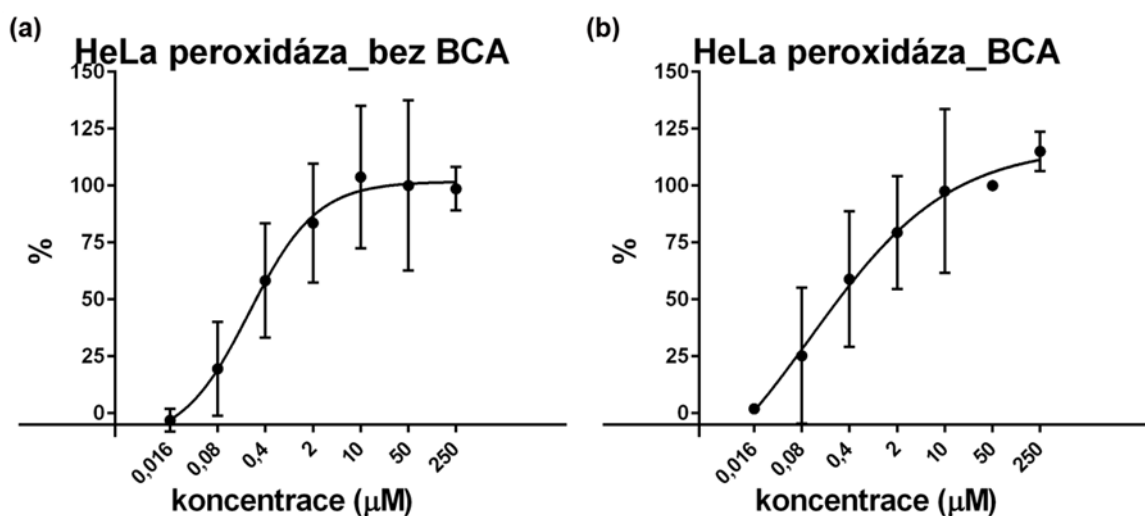
Tab. VII: Vliv ředění peroxidázy konjugované se streptavidinem na absorbanci TMB

Ředění	2 000x	4 000x	8 000x	16 000x	30 000x
A vzorku	2,24	1,89	1,98	1,79	1,92
A pozadí	1,22	1,08	0,28	1,29	0,23
Poměr A vzorek/pozadí	1,8	2,3	7	3,6	8,53

Z výsledku bylo patrné, že nejvyšší poměr signál/pozadí poskytla nejnižší koncentrace streptavidinu konjugovaného s peroxidázou.

Na základě obdržených výsledků byl optimalizován postup detekce EdU následovně: vzorky byly fixovány 70% etanolem, detekce EdU byla provedena ve směsi obsahující 40 μM koncentraci biotin-PEG11-azidu a následně byl biotin-PEG11-azid detekován pomocí 0,03 $\mu\text{g/ml}$ streptavidinu konjugovaného s peroxidázou. Pomocí čtečky destiček byla změřena absorbance a data byla vyhodnocena v programu Microsoft Excel a GraphPad Prism6. Výsledkem byla stejně jako v případě použití fluorescenční mikroskopie křivka sigmoidního charakteru, ovšem její průběh se lišil od průběhu křivky získané pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 13a). Navíc bylo patrné, že data z jednotlivých měření vykazovala výrazné odchylky. Již při 0,08 μM koncentraci EdU byl naměřen

signál, který dosahoval téměř 25% signálu 50 μM koncentrace EdU. EC_{50} bylo v případě použití této metody $0,23 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Signál změřený pro 10 μM EdC odpovídal cca 0,6 μM EdU. Aby byl eliminován vliv různého počtu buněk v jamkách mikrotitrační destičky, absorbance byla vztažena na počet buněk. K tomu bylo využito stanovení celkového množství proteinů v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky metodou BCA za předpokladu, že celkové množství proteinů je přímo úměrné množství buněk v jednotlivých jamkách. Jak je patrné z Obr. 13b, výsledky se ještě více lišily od výsledků naměřených pomocí fluorescenční mikroskopie.



Obr. 13: Grafy zobrazující závislost relativního signálu na logaritmu koncentrace EdU detekovaného pomocí peroxidázy a čtečky destiček

HeLa buňky byly inkubovány s odlišnými koncentracemi EdU, které bylo detekováno pomocí peroxidázy a TMB. Data byla normalizována na signál poskytovaný 50 μM EdU. Signál u 50 μM EdU byl roven 100 %. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba měření.

(a) Měření bez vztažení signálu na počet buněk. Hodnota EC_{50} byla rovna $0,23 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Pro vzorky inkubované s 10 μM EdC odpovídal signál 66,96 % signálu naměřeném ve vzorcích, které byly inkubovány s 50 μM EdU. To odpovídalo signálu naměřenému ve vzorku s inkubovaném s 0,6 μM EdU.

(b) Měření se vztažením signálu na počet buněk pomocí BCA. Hodnota EC_{50} byla rovna $0,11 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Pro vzorky inkubované s 10 μM EdC odpovídal signál 50,46 % signálu, který byl naměřen ve vzorcích inkubovaných s 50 μM EdU. To odpovídalo signálu naměřenému ve vzorku inkubovaném s 0,3 μM EdU.

Přístup založený na použití peroxidázy byl ve srovnání s mikroskopickým přístupem jednodušší z hlediska vyhodnocení signálu. Na druhou stranu proces detekce byl delší a pracnější. Detekce trvala přibližně 5,5 hod, vyžadovala přesné pipetování a pečlivé vymytí peroxidázy. Přestože je proces vyhodnocení a analýzy dat ve srovnání s metodou využívající fluorescenční mikroskopii velmi jednoduchý a rychlý (měření a analýza dat

trvala přibližně jen 30 minut), vzhledem k velké variabilitě naměřených dat, tato metoda nepředstavovala vhodnou alternativu k metodě založené na fluorescenční mikroskopii.

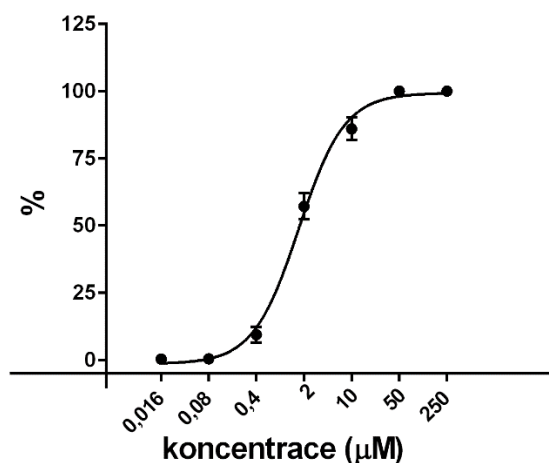
5.3. Stanovení deaminační aktivity pomocí měření fluorescence čtečkou destiček

Třetí testovaná metoda pro stanovení deaminační aktivity buněk představovala jistou variaci metody založené na fluorescenční mikroskopii. Metoda je také založena na stanovení intenzity fluorescenčního signálu, ten je ovšem měřen pomocí čtečky destiček. Ve srovnání s postupem pro fluorescenční mikroskopii se tato metoda lišila rovněž průběhem značení a obnášela speciální kroky související s detekcí pomocí čtečky destiček (viz 4.4.). Značení prostřednictvím EdU a fixace nebyla změněna. Po fixaci následovala detekce EdU pomocí 5-FAM azidu a detekce DNA pomocí DAPI. Inkubace s těmito fluorescenčními molekulami probíhaly v oddělených krocích. Délka obou značení byla zkrácena jen na půl hodiny, což se jevílo jako dostatečné i při použití vyšších ředění 5-FAM azidu (10 μ M) a DAPI (1 μ M). Po důkladném vymytí nenavázaného 5-FAM azidu a DAPI byly vzorky inkubovány s proteinázou K. Vzorky ošetřené proteinázou K byly přeneseny do černé mikrotitrační destičky a následně byl přidán roztok 10% SDS v množství, aby jeho konečná koncentrace byla 1,6 %. Následně byl u vzorků měřen fluorescenční signál pomocí čtečky destiček.

Ve srovnání s fluorescenční mikroskopií, u které zpracování trvalo pouhé 2 hod, je tento postup časově o něco náročnější. Zpracování trvalo přibližně 4 hod. Ve srovnání s detekcí pomocí peroxidázy, kdy postup trval přibližně 5,5 hod, byl však tento postup kratší a jednodušší. Metoda se na rozdíl od metody založené na peroxidáze ukázala být jen velice málo citlivá k nepřesnostem pipetování a vymývání činidel. V případě některých buněčných linií bylo nutné pracovat při fixáži velmi opatrně, aby nedošlo k odstranění buněk. Na druhou stranu vzhledem k současně provedenému stanovení počtu buněk a citlivosti metody, byl často vliv částečného odstranění buněk eliminován. Díky faktu, že množství buněk je stanovováno současně s fluorescenčním signálem pro 5-FAM azid, je dosaženo významného zjednodušení a zrychlení celé metody.

Naměřená data byla vyhodnocena programem Microsoft Excell a GraphPad Prism6. Na rozdíl od fluorescenční mikroskopie nebyla stanovována replikační aktivita linií. Významným a naprosto zásadním zlepšením oproti mikroskopickému vyhodnocení je jednoduchost měření a vyhodnocení fluorescenčních signálů. Jedna destička vyžaduje pro

změření a následné vyhodnocení přibližně 1 hod. To je oproti stanovení pomocí fluorescenční mikroskopie časová úspora asi 3,5 hod. Výsledkem stanovení byla sigmoidní křivka zobrazující závislost hodnoty fluorescenčního signálu na koncentraci EdU. Průběh se velmi podobá fluorescenční mikroskopii. EC_{50} bylo rovno 1,68. Fáze plató je dosaženo až při 50 μM koncentraci EdU. Signál 10 μM EdC je 48,74 %, což odpovídá 1,67 μM koncentraci EdU (viz Obr. 14). Tato metoda je tedy velmi vhodná jako náhrada za fluorescenční mikroskopii, je spolehlivá, jednoduchá na provedení i vyhodnocení a poměrně přesná. Spolehlivost metody je patrná rovněž z nízké variability jednotlivých měření a to dokonce i ve srovnání s mikroskopickým měřením (pro srovnání viz Obr. 12-14).



Obr. 14: Graf zobrazující závislost relativního signálu na logaritmu koncentrace EdU detekované pomocí fluorescence a čtečky destiček.

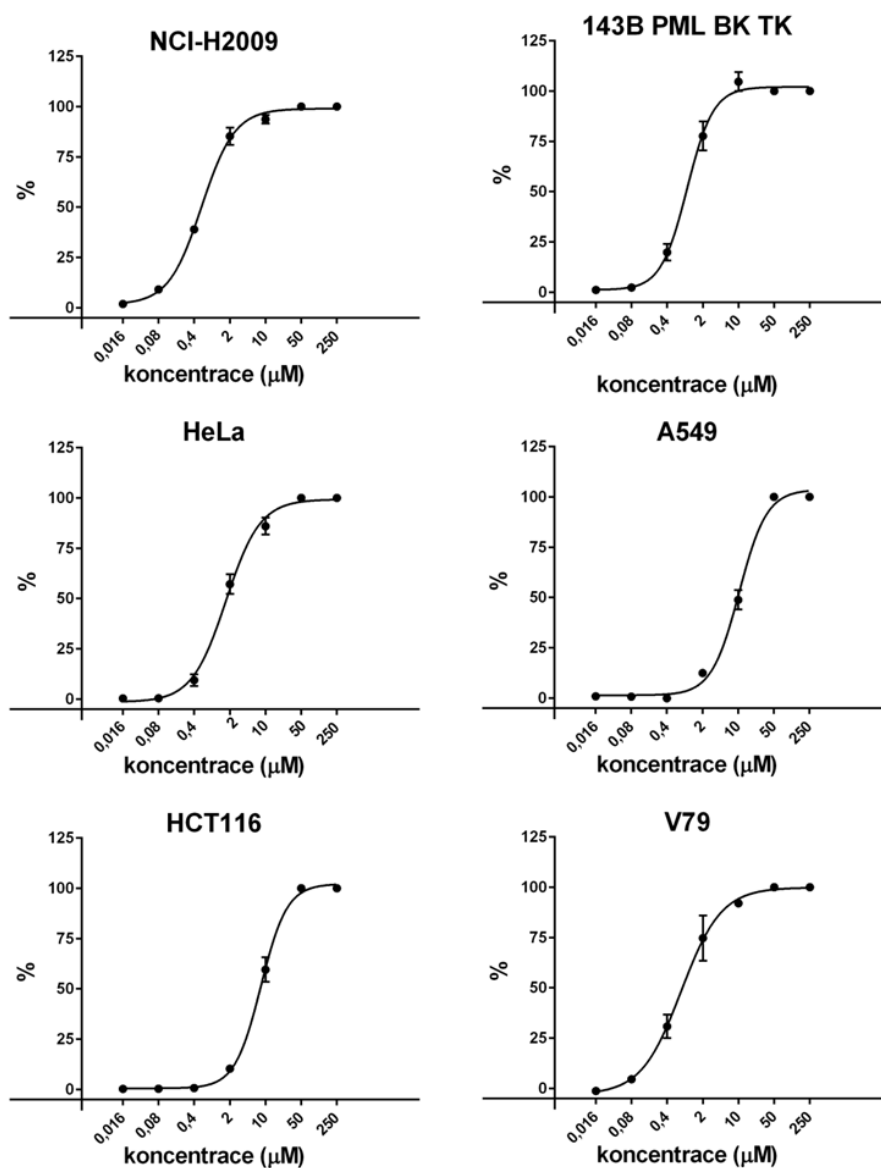
HeLa buňky byly inkubovány s odlišnými koncentracemi EdU, které bylo detekováno pomocí 5-FAM azidu. Data byla normalizována na signál poskytovaný 50 μM EdU. Signál u 50 μM EdU byl roven 100 %. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba měření. $EC_{50} = 1,68 \pm 0,21 \mu\text{M}$. Pro 10 μM EdC byl signál 48,74 %, což odpovídalo 1,67 μM EdU. Pro hodnoty 0,016 a 0,08 nebyl zaznamenán signifikantní signál.

5.4. Stanovení deaminační aktivity u různých buněčných linií

Dalším cílem diplomové práce bylo provést stanovení deaminační aktivity za použití různých buněčných linií a vztáhnout případné rozdíly k množství CDD a DCTD. Bylo analyzováno 7 různých linií, z nichž většina pocházela z lidských nádorových tkání (viz 4.1.). Jednalo se o linii HeLa z karcinomu děložního čípku, dále linii HCT116 z karcinomu tlustého střeva, linie 143B a 143B PML BK TK z osteosarkomu, linie NCI-H2009 a A549 z karcinomu plic a linie V79 z plic křečka. Pro stanovení deaminační

aktivity byla vybrána metoda využívající fluorescenci měřenou pomocí čtečky destiček, která jako jediná byla dostatečně rychlá a rovněž vykazovala nízkou variabilitu obdržených výsledků. Navíc byla jednoduchá z hlediska vyhodnocení. K buňkám byly kromě EdU a EdC přidány rovněž tři látky s inhibujícími účinky na testované deaminázy (viz 4.4.2.). Alternativně byl použit zebularin, tetrahydrouridin a diazepinon ribosid, ve 2 a 10 μM koncentraci. Fluorescenční signály byly měřeny čtečkou destiček a vyhodnoceny programem Microsoft Excell a GraphPad Prism6 (viz 4.4.3.).

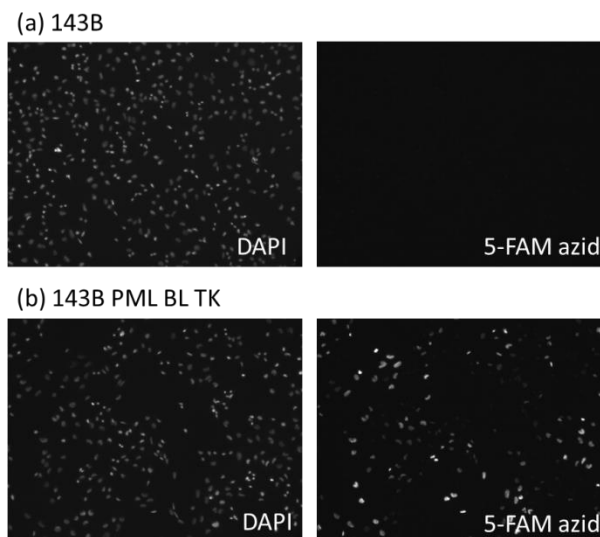
Z grafů zobrazujících závislost fluorescenčního signálu na koncentraci EdU byly mezi některými liniemi pozorovány výrazné rozdíly mezi schopností inkorporace EdU do DNA (viz Obr. 15).



Obr. 15: Závislost fluorescenčního signálu na logaritmu koncentrace EdU pro jednotlivé linie.

Grafy ukazují průběh závislosti fluorescenčního signálu pro jednotlivé koncentrace EdU u linií NCI-H2009, 143B PML BK TK, HeLa, A549, HCT 116 a V79. Odlišný průběh křivek odráží rozdílnou schopnost jednotlivých linií inkorporovat EdU. Hodnoty EC_{50} pro jednotlivé linie byly: NCI-H2009: $EC_{50} = 0,56 \pm 0,05 \mu\text{M}$; 143B PML BK TK: $EC_{50} = 0,65 \pm 0,06 \mu\text{M}$; HeLa: $EC_{50} = 1,68 \pm 0,21 \mu\text{M}$; A549: $EC_{50} = 10,4 \pm 1,27 \mu\text{M}$; HCT 116: $EC_{50} = 8,11 \pm 0,42 \mu\text{M}$; V79 $EC_{50} = 0,75 \pm 0,05 \mu\text{M}$. Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba měření.

Podle hodnot EC_{50} velmi dobře inkorporovala EdU linie NCI-H2009 ($EC_{50} = 0,56 \mu\text{M}$), 143B PML BK TK ($EC_{50} = 0,65 \mu\text{M}$) a V79 ($EC_{50} = 0,75 \mu\text{M}$). Naopak velmi slabě pak inkorporovala EdU linie HCT116 ($EC_{50} = 8,11 \mu\text{M}$) a A549 ($EC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$). Linie HeLa v porovnání s ostatními liniemi inkorporovala EdU průměrně ($EC_{50} = 1,38 \mu\text{M}$). Linie 143B nebyla schopna inkorporovat EdU vůbec nebo jen v extrémně slabém množství. Důvodem byla zjevně absence tymidin kinázy. U této linie bylo provedeno značení $10 \mu\text{M}$ EdU a detekce fluorescenční mikroskopií. Bylo pozorováno, že poskytovaný signál signifikantně nepřevyšoval pozadí (viz Obr. 16). Stanovení replikační aktivity pomocí vyhodnocení obdržných dat potvrdilo, že linie 143B není schopna dostatečné inkorporace EdU a tudíž ji touto metodou nelze hodnotit (viz Tab. VIII).



Obr. 16: Inkorporace EdU detekovaná 5-FAM azidem a fluorescenční mikroskopií

Buňky 143B a 143B PML BL TK byly inkubovány 4 hodiny s $10 \mu\text{M}$ EdU, které bylo následně detekováno pomocí 5-FAM azidu. (a) U linie 143B, jenž neobsahuje tymidin kinázu, nebyl pozorován signifikantní signál. (b) Linie 143B PML BK TK obsahující virovou tymidin kinázu produkovala silný signál.

Tab. VIII: Replikační aktivita linií 143B PML BK TK a 143B

Linie	R	non-R	R/non-R
143B TK	0,2435	0,0585	4,1647
143B	0,0614	0,0541	1,1353
Kontrola 143B TK	0,0581	0,053	1,0964
Kontrola 143 B	0,0565	0,0529	1,0678

R: průměrný signál v replikujících buňkách, non-R: průměrný signál v nereplikujících buňkách

Současně se závislostí inkorporace EdU na jeho koncentraci bylo provedeno stanovení signálu inkorporovaného EdU po inkubaci buněk se 2 nebo 10 μM EdC. Inkorporace EdU po přidání EdC se mezi jednotlivými liniemi výrazně lišila. Např. pro linii HeLa signál 10 μM EdC odpovídal 1,67 μM EdU, zatímco u linie NCI-H2009 odpovídal 2,58 μM EdU a u linie V79 jen 0,07 μM EdU. Aby bylo možné porovnat míru deaminace EdC mezi jednotlivými liniemi, byla měřena produkce EdU z EdC pomocí nelineární regrese dat ze seriálního ředění EdU (dle rovnice viz 5.1.). Hodnoty koncentrací produkovaného EdU z 10 μM EdC jsou uvedeny v tabulce IX.

Tab. IX: Deaminační aktivita linií HeLa, NCI-H2009, V79, HCT116, A549 a 143B PML BK TK

10 μM EdC	$\approx \mu\text{M}$ EdU	%
NCI-H2009	2,58	100
143B PML BK TK	1,91	74,03
HeLa	1,67	63,73
A549	2,15	83,33
HCT116	1,61	62,4
V79	0,07	0,07

2 μM EdC poskytlo do jisté míry podobné výsledky jako 10 μM EdC. V případě linie HCT116, která vykazovala poměrně nízkou schopnost inkorporovat EdU, byl signál u 2 μM EdC však tak slabý, že byl pod úrovní kalibračních hodnot EdU. Rovněž linie V79 dosahovala v případě 2 μM EdC velice nízkých hodnot. Pouze v jediném případě a to u linie NCI-H2009 se hodnota signálu u 10 mM EdC přiblížila saturačním hodnotám, nicméně jich nedosáhla. Dle těchto výsledků je tedy lepší použít 10 μM EdC, aby se zamezilo riziku, že při použití 2 μM EdC nebudou hodnoty dosahovat hodnot kalibrační řady.

Nejvyšší schopnost přeměňovat EdC na EdU vykazovala linie NCI-H2009 (hodnota signálu odpovídala inkorporaci cca 2,58 μM EdU). Pro lepší možnost porovnání byla tato hodnota normalizována na hodnotu 100 % a další hodnoty k ní vztaženy. U line

A549 pak byla tato hodnota cca 83 %, u linie 143B PML BK TK 74 %, u linie HeLa 64 %, u linie HCT116 62 % a u line V79 0,1 % (tabulka IX).

Rovněž byl studován vliv inhibitorů na deaminaci EdC. Jako inhibitory deaminační aktivity byl použit tetrahydouridin, dále diazepinon ribosid a zebularin. U tetrahydouridinu je známo, že specificky inhibuje účinek CDD. U zbývajících dvou látek je mechanismus účinku širší a předpokládá se, že inhibují jak CDD tak i DCTD a tím deaminaci deoxycytidinu na deoxyuridin, i dCMP na dUMP.

Nejprve bylo podobně jako v případě stanovení deaminační aktivity působící na EdC stanoveno množství inkorporovaného EdU. Údaje byly normalizovány pro hodnotu inkorporovaného EdU po kultivaci s 10 μ M EdC na hodnotu rovnající se 100 %. Podobně byly normalizovány údaje pro hodnotu inkorporovaného EdU po kultivaci s 10 μ M EdU na hodnotu rovnající se 100 %. Pro stanovení skutečného podílu deaminační aktivity na pokles inkorporace EdU způsobené inhibicí deaminační aktivity jednotlivými inhibitory, byla následně vydělena procentuální hodnota obdržená po inkubaci s EdU hodnotou po inkorporaci s EdC. Tato hodnota byla úměrná inhibičnímu vlivu jednotlivých inhibitorů. Hodnoty rovné nebo nižší než jedna indikovaly, že inhibitory nevykazovaly žádný inhibiční vliv. Hodnoty vyšší než jedna ukazovaly, kolikrát byl signál očištěný o vliv inhibitoru na vlastní inkorporaci EdU nižší než bez přidání inhibitorů. Vypočtené údaje jsou uvedeny v tabulce X.

Tab. X: Deaminační aktivita u linií HeLa, NCI-H2009, V79, HCT116, A549 a 143B PML BK TK při použití 10 μ M EdC. Vliv inhibitorů na 10 μ M EdC a na 10 μ M EdU.

NCI-H2009						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	2,58	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	1,25	48,44961	EdU+THU	4,03	40,3	0,831792
EdC+diazepin.	0,56	21,70543	EdU+diazepin.	2,85	28,5	1,313035714
EdC+zebularin	1,25	48,44961	EdU+zebularin	12,49	124,9	2,577936

143B PML BK TK						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	1,91	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	2,11	110,4712	EdU+THU	6,6	66	0,597440758
EdC+diazepin.	1,49	78,01047	EdU+diazepin.	8,82	88,2	1,13061745
EdC+zebularin	1,66	86,91099	EdU+zebularin	4,23	42,3	0,486704819

HeLa						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	1,67	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	0,2	7,751938	EdU+THU	8,16	81,6	10,5264
EdC+diazepin.	0,12	4,651163	EdU+diazepin.	6,23	62,3	13,3945
EdC+zebularin	0,42	16,27907	EdU+zebularin	5,6	56	3,44

A549						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	2,15	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	1,62	75,34884	EdU+THU	13,49	134,9	1,790339506
EdC+diazepin.	1,86	86,51163	EdU+diazepin.	12,61	126,1	1,457607527
EdC+zebularin	1,95	90,69767	EdU+zebularin	12,02	120,2	1,325282051

HCT116						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	1,61	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	0,57	35,40373	EdU+THU	12,86	128,6	3,632385965
EdC+diazepin.	0,62	38,50932	EdU+diazepin.	15,3	153	3,973064516
EdC+zebularin	0,69	42,85714	EdU+zebularin	12,02	120,2	2,804666667

V79						
10 μ M EdC	$\approx \mu$ M EdU	%	10 μ M EdU	$\approx \mu$ M EdU	%	%EdU / %EdC
EdC	0,07	100	EdU	10	100	1
EdC+THU	0,03	42,85714286	EdU+THU	5,28	52,8	1,232
EdC+diazepin.	0,03	42,85714286	EdU+diazepin.	2,58	25,8	0,602
EdC+zebularin	0,1	142,8571429	EdU+zebularin	2,93	29,3	0,2051

U linie NCI-H2009 byl signál 10 μ M EdC účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 48 %, účinkem diazepinon ribosidu na 22 % a zebularinu na 48 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 40 %, účinkem diazepinon ribosidu na 28 % a účinkem zebularinu byl zvýšen na 125 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že

tetrahydrouridin nemá inhibiční vliv a vliv diazepinon ribosidu je jen nízký. Naproti tomu zebularin snižuje signál 2,6x.

U linie 143 PML BK TK byl signál 10 μ M EdC účinkem tetrahydrouridinu zvýšen na cca 110 %, zatímco účinkem diazepinon ribosidu byl snížen na 78 % a účinkem zebularinu na 87 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 66 %, účinkem diazepinon ribosidu na 88 % a účinkem zebularinu na 42 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že žádný z testovaných inhibitorů nemá významný vliv na přeměnu EdC na EdU.

Signál 10 μ M EdC byl u linie HeLa účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 8 %, účinkem diazepinon ribosidu na 5 % a účinkem zebularinu na 16 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 8 %, účinkem diazepinon ribosidu na 6 % a účinkem zebularinu na 5 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že tetrahydrouridin a diazepinon ribosid velice silně inhibují přeměnu EdC na EdU. Zebularin tento inhibiční vliv vykazuje rovněž, ovšem není tak vysoký jako u ostatních inhibitorů. V tomto ohledu tetrahydrouridin snižuje signál cca 10,5x, diazepinon ribosid dokonce 13,4x a zebularin 3,4x.

U linie A549 byl signál 10 μ M EdC účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 75 %, účinkem diazepinon ribosidu na 87 % a účinkem zebularinu na 91 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem všech inhibitorů zvýšen. U tetrahydrouridinu tomu bylo na cca 135 %, účinkem diazepinon ribosidu na 126 % a účinkem zebularinu na 120 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že ačkoli inhibitory vykazují inhibiční účinek na deaminaci EdC, není tak významný jako v případě HeLa buněk. Tetrahydrouridin snižuje signál cca 1,8x, diazepinon ribosid 1,5x a zebularin 1,3x.

U linie HCT116 byl signál 10 μ M EdC účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 35 %, účinkem diazepinon ribosidu na 39 % a účinkem zebularinu na 43 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem všech inhibitorů zvýšen. U tetrahydrouridinu tomu bylo na cca 129 %, účinkem diazepinon ribosidu na 153 % a účinkem zebularinu na 120 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že všechny inhibitory vykazují poměrně silný inhibiční účinek na deaminaci EdC, tetrahydrouridin snižuje signál cca 3,6x, diazepinon ribosid 4x a zebularin 2,8x.

Signál 10 μ M EdC byl u linie V79 účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 43 %, účinkem diazepinon ribosidu na 43 %, avšak účinkem zebularinu byl zvýšen na 143 %. Signál 10 μ M EdU byl účinkem tetrahydrouridinu snížen na cca 53 %, účinkem diazepinon

ribosidu na 26 % a účinkem zebularinu na 29 %. Podíl % EdU k EdC naznačuje, že ani jeden z inhibitorů nevykazuje výraznější vliv na deaminaci.

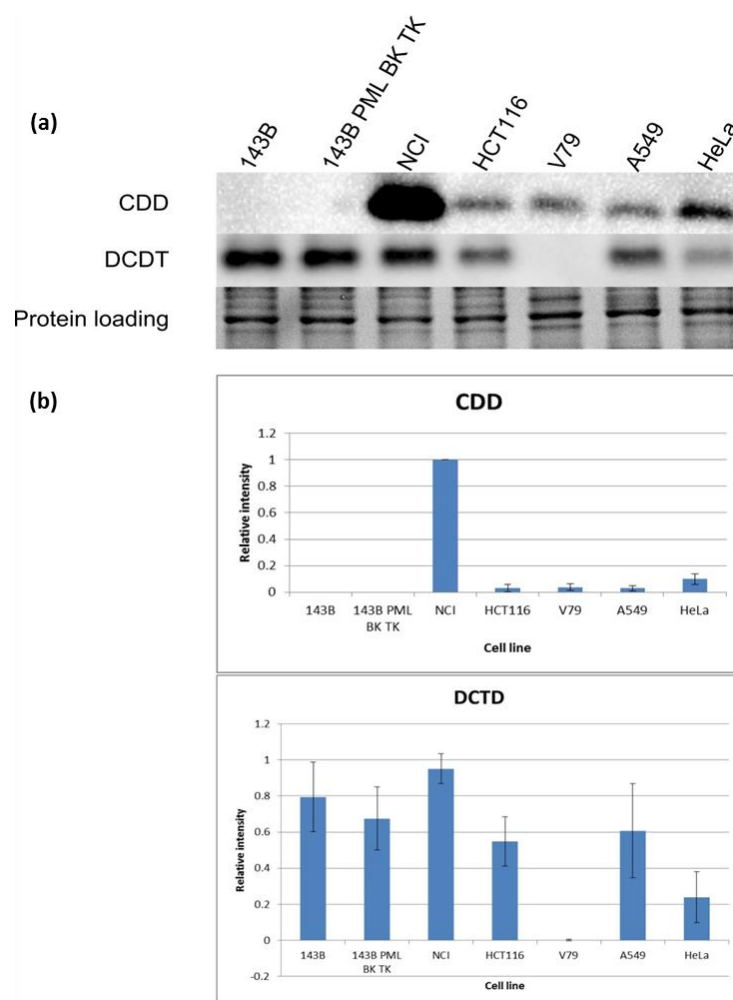
5.5. Množství CDD a DCTD u různých buněčných linií

V předchozích kapitolách byly uvedeny různé metody ke stanovení deaminační aktivity, z nichž metoda využívající fluorescenci v kombinaci s vyhodnocením pomocí čtečky destiček představovala z hlediska rychlosti a spolehlivosti nejlepší alternativu. Pomocí této metody byla testována deaminační aktivita u různých linií. Nicméně, jak již bylo uvedeno, v buňce existují dva enzymy s deaminační aktivitou CDD a DCTD. CDD deaminuje přímo deoxycytidin (a jeho analogy) na deoxyuridin. DCTD působí na dCMP (a jeho analogy) a deaminuje jej na dUMP. Aby bylo možné porovnat výsledky naměřené deaminační aktivity s obsahem těchto enzymů provedla jsem analýzu obsahu obou proteinů pomocí SDS-PAGE a western blotů (viz 4.5.). Experimenty byly provedeny po přípravě buněčných lyzátů daných linií. K identifikaci enzymů byly použity specifické primární monoklonální protilátky z myši namířené proti CDD a DCTD a sekundární polyklonální protilátka z myši Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (4.5.2.).

Linie byly inkubovány v kultivačních lahvích o velikosti 75 cm². Pomocí mikroskopu Olympus IX81 s kamerou Hamamatsu ORCA II a softwarem Cell[^]R za použití objektivu UPLFLN 10x, NA 0,3 bylo stanoveno množství buněk v láhvích. Podle množství buněk byl přidán lyzační pufr RIPA a byly zhotoveny lyzáty příslušných linií (4.5.3) SDS-PAGE byla provedena za použití vertikální elektroforetické aparatury Hoefer SE260. Polyakrylamidový gel o tloušťce 1,5 mm byl zhotoven pomocí kitu TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit a aparatury pro nalití gelu Dual Gel Caster SE245. Lyzáty povařené na 95°C 5 minut s Laemmliho vzorkovacím pufrem v koncentraci 1x byly aplikovány na gel v množství 10 µg proteinu. Koncentrace celkového proteinu byla stanovena pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay Kit. Pro separaci byl použit 1x TGS pufr v koncentraci 1x. Separace probíhala 5 minut při konstantním napětí 100 V a následně cca 1,5 hodiny při 120 V pomocí zdroje EV261 Concoart.

Western blot byl proveden prostřednictvím aparatury Hoefer TE22 a zdroje napětí jako u elektroforézy. Byla použita 0,2 µm nitrocelulózová membrána. Gel byl 10 minut vymýván v transferovém pufru, aby neobsahoval SDS. Jako transferový pufr byl použit modifikovaný Towbinův pufr, jelikož snížené množství metanolu na 15% (z 20%) a bez přídavku SDS je optimálnější pro transfer menších proteinů. Transfer probíhal 60 minut při konstantním napětí 75 V. Po transferu byla membrána opláchnuta TBS/T pufrem a

blokována pomocí mléka 60 minut. Mléko bylo důkladně vymyto v pufru TBS/T a následně byla aplikována primární protilátka, přičemž inkubace probíhala přes noc při -4°C za stálého třepání. Následující den byla protilátka vymyta a byla aplikována sekundární protilátka, inkubace probíhala 60 minut za stálého třepání. Po důkladném vymytí byl aplikován luminiscenční substrát Luminata a následně byla snímána chemiluminiscence HCD kamerou na přístroji ChemiDoc a byl vyhodnocen chemiluminiscenční signál. Bylo prováděno 5 experimentů pro stanovení relativního množství CDD i DCTD, z nichž byl vypočítán průměrný signál dané linie. Získaná data byla zpracována programem Microsoft Excel. Aby bylo možné porovnat jednotlivá množství enzymu mezi použitými liniemi, byla provedena normalizace na linii s nejvyšším signálem. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 17.



Obr. 17: Western Blot analýza CDD a DCTD u buněčných linií HeLa, NCI-H2009, V79, HCT116, A549, 143B a 143B PML BK TK

(a) Identifikace CDD, DCTD metodou Western Blot a ověření nanášky proteinu mezi jednotlivými vzorky.
 (b) Grafy relativních intenzit enzymů CDD a DCTD u jednotlivých linií. Normalizace byla provedena na linii s největším signálem (NCI-H2009).

Linie NCI-H2009 podle Western Blotu obsahuje oba deaminační enzymy stejně jako linie HCT116, HeLa, A549 i V79. Nicméně množství DCTD u linie V79 je nepatrné. Linie 143B a 143B PML BK TK buď CDD neobsahují, nebo jen ve velice nízkých množstvích. Naopak obě linie obsahují ve srovnání s ostatními liniemi ve velkém množství DCTD.

Největší množství CDD mezi jednotlivými liniemi obsahovala linie NCI-H2009, tato hodnota byla stanovena jako 100 %. U linie HCT116 činilo množství CDD $3 \% \pm 3\%$, u linie V79 $3\% \pm 1 \%$, u linie A549 $3 \% \pm 2 \%$ a u linie HeLa $10 \% \pm 4 \%$ vzhledem k množství CDD u linie NCI-H2009. Největší množství DCTD bylo v průměru opět u linie NCI-H2009, což bylo stanoveno jako cca 100 %. U linie 143B a 143B PML BK TK byl enzym přítomen rovněž ve velkém množství, hodnota činila $77 \pm 27 \%$ a $82 \pm 20 \%$ vzhledem k množství DCTD u linie NCI-H2009. U linií HCT116 byla hodnota $70 \pm 21 \%$, u linie A549 $67 \pm 26 \%$, u linie HeLa $44 \pm 18 \%$ a u linie V79 byl signál zanedbatelný, činil $4,3 \pm 7 \%$ vzhledem k množství CDD u linie NCI-H2009.

6. DISKUSE

V této diplomové práci byla vyvinuta a testována metoda pro stanovení aktivity cytidinových deamináz v buněčných kulturách. Oproti dosud používaným přístupům, které vyžadují přípravu buněčných lyzátů s uchovanou deaminační aktivitou nebo izolaci DNA, případně jsou použity postupy, které vyžadují oprávnění pro práci s radioaktivními látkami (Jamieson a kol., 1987; Jansen a kol., 2010; Peters a kol., 2014), vyvinutá metoda nevyžadovala ani jeden z těchto postupů.

V průběhu práce byly testovány tři přístupy, všechny založené na značení buněk pomocí EdC a klik reakci. Bylo využito dříve publikované pozorování, že EdC je v buňkách deaminováno na EdU a následně inkorporováno do DNA, přičemž EdC se do DNA neinkorporuje (Ligasová a kol., 2016). Množství inkorporovaného EdU tudíž vzrůstá s deaminací EdC. Všechny testované přístupy vyžadovaly vytvoření kalibrační řady pro stanovení množství přeměněného EdU pomocí různých koncentrací EdU. Důvodem je fakt, že různé linie inkorporují EdU s různou intenzitou (Ligasová a kol., 2015). EdU bylo v buňkách detekováno buď pomocí fluorescenčních molekul a vyhodnoceno fluorescenčním mikroskopem, nebo pomocí čtečky destiček, anebo bylo EdU detekováno pomocí peroxidázy založené na měření absorbance.

Výsledky ukázaly, že stanovení aktivity deamináz pomocí fluorescenční mikroskopie je velmi spolehlivá a přesná metoda, jejíž přesnost spočívá v měření fluorescenčního signálu EdU pouze v buněčných jádrech, která byla identifikována pomocí DAPI. Navíc signál je měřen jen ve frakci replikujících jader. Tyto dva rysy společně s faktem, že lze poměrně spolehlivě určit frakci replikujících jader je hlavní výhodou metody. Pozadí je díky tomu tvořeno výhradně složkou, která pochází z nereplikujících jader a lze ho tudíž spolehlivě korigovat. Z hlediska zpracování vzorků je metoda velmi jednoduchá a rychlá. Zjednodušeně obnáší značení vzorků pomocí EdC, fixaci, inkubaci vzorků s DAPI a 5-FAM azidem, následované vymytím nenavázaných fluorescenčních molekul a aplikací média pro pozorování fluorescenčních signálů.

Následné vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu je však pracné a zdlouhavé. Náročnost lze demonstrovat na zpracování 96-jamkové mikrotitrační destičky. Jedna destička přitom obsahuje jednu buněčnou linii a je třeba provést alespoň 3 opakování. Pro každou buněčnou linii musí být vytvořena kalibrační řada pro stanovení množství přeměněného EdU. Současně destička obsahuje vzorky, které byly inkubovány s EdC a rovněž vzorky, které nebyly inkubovány ani s EdU ani s EdC. V rámci jednoho

stanovení bylo provedeno 6 opakování vzorků inkubovaných s EdC, aby byly výsledky co nejpřesnější. Po provedené detekci EdC v DNA jsou jednotlivé vzorky snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Snímky je pak nutné zpracovat v programu na analýzu obrazu. Pro vzorky reprezentující odlišné linie je nutné předem stanovit replikační aktivitu buněk, jelikož pozitivní signál je měřen pouze v replikujících buňkách. To sice vede ke zpřesnění metody, ovšem současně celou proceduru prodlužuje. Sběr dat a následné vyhodnocení jedné 96-jamkové mikrotitrační destičky trvalo přibližně 5 hodin při 2 snímcích z jedné jamky. Celková doba tvořená zpracováním, sběrem dat a vyhodnocením trvala dohromady 7 hod. V případě snímání vyššího počtu snímků, což je žádoucí v případě nižšího nebo nestejnomyšného nárůstu buněk, by tato doba byla i výrazně vyšší. Tato doba nezahrnuje dobu inkubace s EdU a EdC a dobu fixace vzorku. Tato doba je v případě všech tří metod stejná. Navíc je možné po fixaci vzorky uchovat v mrazáku a provést následné kroky později.

Stanovení aktivity deamináz pomocí peroxidázy a měření absorbance čtečkou destiček bylo vyvíjeno jako alternativa pro snadnější a rychlejší vyhodnocení. Nicméně postup je ve srovnání s fluorescenční mikroskopií poměrně dlouhý a náročný. V průběhu práce se ukázalo, že přístup vyžaduje přesné pipetování a pečlivé vymývání činidel. Naprosto zásadní je promývání po inkubaci s peroxidázou. Je to zjevně způsobeno faktem, že použitý detekční systém založený na použití azidovaného biotinu vykazuje nízký poměr signál/šum. Hlavním faktorem nízkého poměru signál/šum byla pravděpodobně nízká úroveň reakce azidovaného biotinu s EdU v DNA a/nebo jeho následná reakce s komplexem streptavidinu a peroxidázy. Ačkoli se jedná obecně o sensitivní technologii, což ukázal i fakt, že požadované ředění komplexu streptavidinu s peroxidázou bylo velice vysoké (požadovaná koncentrace komplexu byla asi 0,033 $\mu\text{g/ml}$), právě nízký poměr signál/šum vedl k vysoké variabilitě obdržených výsledků. Postup včetně vyhodnocení trval přibližně 5 hod. V případě, že byl použit přepočít na množství buněk vyžadující speciální krok, postup trval až cca 6 hodin. Poměrná množství buněk byla vypočtena pomocí stanovení celkového proteinu metodou stanovení BCA. Pro stanovení poměrné deaminační aktivity bez závislosti na množství buněk byla absorbance způsobená přeměnou TMB vydělena absorbcí BCA. Změření celé destičky pomocí čtečky destiček a její vyhodnocení sice netrvalo déle než 1 hodinu, nicméně celkově metoda nepřináší časovou úsporu ve srovnání s fluorescenční mikroskopií. Obě metody trvaly přibližně 7 hodin. Navíc výsledky obdržené pomocí peroxidázy, jak již bylo uvedeno, vykazovaly

velkou variabilitu v rámci jednotlivých opakování a poměrně výrazně se lišily od výsledků obdržených pomocí fluorescenční mikroskopie.

Stanovení aktivity deamináz pomocí fluorescence vyhodnocené čtečkou destiček se ukázalo jako nejlepší metoda. Tak jako u peroxidázy je vyhodnocení podstatně jednodušší a rychlejší. Vyhodnocení spočívá pouze v měření fluorescenčních signálů pomocí čtečky destiček a v jednoduchém a rychlém zpracování dat. Výhodou ve srovnání s peroxidázou je provedení kalibrace na počet buněk současně s měřením specifických signálů. Současně je postup detekce kratší a jednodušší. Další výhodou je malá odchylka při opakování experimentů a vyšší přesnost stanovení. Metoda poskytuje velmi podobné výsledky jako fluorescenční mikroskopie. U obou metod je kromě detekce EdU pomocí 5-FAM azidu, detekována i DNA. Mírné odchylky ve výsledcích mohou být způsobeny odlišným hodnocení a nemožností stanovit signál pouze v replikujících jádrech a tudíž nutností stanovení pozadí pouze pomocí buněk, které nejsou inkubovány s EdC nebo EdU. Podobně je měřen celkový fluorescenční signál DAPI ve vzorku a nelze ho omezit pouze na buněčná jádra jako u fluorescenční mikroskopie. Proto je velmi důležité důkladné vymytí nenavázané DAPI, což ovšem vede k prodloužení celkové doby postupu. Následně jsou vzorky ještě inkubovány s proteinázou K a pak již přeneseny do černé mikrotitrační destičky vhodné pro měření fluorescence čtečkou destiček. Ke vzorkům je následně přidáno SDS. Nicméně i přesto tato metoda přináší ve srovnání s fluorescenční mikroskopií časovou úsporu, jelikož detekce trvá cca 4 hodiny a vyhodnocení necelou 1 hodinu. Celá metoda trvala cca 5 hodin, což je o 2 hodiny méně než u předchozích dvou metod.

Analýza množství EdU v DNA odhalila u linií HeLa, 143B TK, 143B, NCI-H2009, A549, V79 a HCT116 významné odlišnosti. Již dříve bylo zjištěno, že míra inkorporace EdU se mezi různými buněčnými liniemi liší (Ligasová a kol., 2015). V dané studii byly pomocí fluorescenční mikroskopie testovány tři buněčné linie, HeLa, HCT116 a 143B TK. Nejvyšší schopnost inkorporace EdU měla linie 143B TK, méně inkorporovala linie HeLa a nejméně linie HCT116, hodnoty EC_{50} byly v tomto pořadí: 0,278 μ M, 0,429 μ M a 7,249 μ M. Podle výsledků předkládané práce bylo pozorováno, že nejvyšší schopnost inkorporace EdU vykazuje linie NCI-H2009, hodnota EC_{50} byla 0,56 μ M. Vysokou míru inkorporace EdU vykazovaly i linie 143B TK a V79, hodnota EC_{50} byla 0,65 μ M a 0,75 μ M. Pro linii HeLa byla hodnota EC_{50} rovna 1,38 μ M. Velmi slabě inkorporovaly EdU linie HCT116 a A549, hodnoty EC_{50} byly 8,11 μ M a 10,4 μ M. Linie 143B neinkorporovala EdU vůbec. Výsledky z hlediska schopnosti inkorporace EdU byly tudíž

podobné výsledkům z výše citované studie. Rozdíly mezi EC_{50} publikovanými v uvedené studii a EC_{50} vypočtenými v předkládané práci mohou být důsledkem jiného použitého metodického přístupu a rovněž mírně odlišného chování buněčných linií způsobené např. postupnou klonální selekcí u uvedených linií.

Schopnost buněk inkorporovat EdU je ovlivněna různými buněčnými procesy. Buňky musí EdU nejprve přijmout prostřednictvím nukleosidových transportérů. Následně působením enzymů musí být EdU fosforylováno a pomocí buněčných polymeráz inkorporováno do DNA replikující se buňky. Jedná se o komplexní proces ovlivněný různými metabolickými drahami syntézy a katabolismem nukleotidů. Různé úrovně inkorporace mohou rovněž souviset s opravnými mechanismy DNA. Z výsledků je patrné, že ani zdánlivá příbuznost linií nemusí nutně znamenat stejnou úroveň inkorporace EdU. Např. linie NCI-H2009 a A549, ačkoliv jsou původem z karcinomu stejné tkáně, inkorporují EdU extrémně odlišně. NCI-H2009 inkorporují nejvíce, zatímco A549 nejméně. Tyto rozdíly zřejmě vyplývají z rozdílných vlastností rakovinotvorných buněk a z rozdílných mutací, které u nich nastaly.

Význam tymidin kinázy pro inkorporaci EdU byl patrný u linií 143B a 143B TK, které se vzájemně liší právě přítomností tymidin kinázy. U linie 143B, která neobsahuje kromě mitochondriální tymidin kinázy žádnou další, nebyla pozorována žádná nebo pouze velice nízká inkorporace EdU. Na druhou stranu linie 143B TK obsahující virovou tymidin kinázu, inkorporovala EdU velice silně a to i v porovnání s ostatními liniemi. Tymidin kináza je nutná pro fosforylaci dT na dTMP, ale i dU na dUMP a rovněž EdU na EdUMP. Antagonisticky působí enzym 5'-nukleotidáza, jenž defosforyluje dUMP na dU a EdUMP na EdU a tento enzym, přesněji vzájemný poměr aktivit mezi TK a 5'-nukleotidázou hraje významnou roli při inkorporaci EdU do DNA. Z výsledků bylo tudíž patrné, že právě u linie 143B TK může být poměr mezi aktivitami obou enzymů posunut ve prospěch fosforylační aktivity, což může znamenat, že virová TK je vysoce aktivní, případně, že tato linie má pouze nízkou aktivitu enzymu defosforylujícího EdUMP.

Z hlediska stanovení aktivity deamináz ukazují tyto rozdílné výsledky na nutnost provedení kalibrace inkorporace EdU pomocí seriálního ředění EdU a následného stanovení míry přeměny EdC pomocí vypočtené kalibrační křivky. Současně tato kalibrační křivka dovoluje zvolit optimální koncentrace EdC pro vzájemné porovnání schopnosti jednotlivých linií přeměnit EdC na EdU a tedy deaminační aktivity.

Výsledky ukázaly, že nejvyšší deaminační aktivitu vykazovala linie NCI-H2009. V případě, že hodnota deaminační aktivity byla u NCI-H2009 buněk rovna 100 %, pak

linie A549 vykazovala cca 83 %, linie 143B TK 74 %, linie HeLa 64 %, linie HCT116 62 % a linie V79 0,1 % deaminační aktivity oproti NCI-H2009 linii. Tato aktivita je dána součtem deaminázové aktivity CDD a DCTD. Jak již bylo uvedeno v teoretické části, deaminační aktivita buněk souvisí s jejich proliferační aktivitou. Deaminace je součástí záchranné cesty syntézy nukleotidů a převládá zpravidla u méně proliferujících buněk. Např. zvýšené množství CDD je charakteristická pro jaterní buňky. Nicméně aktivita deamináz je ovlivněna i polymorfismy a liší se nejen mezi tkáněmi ale i jedinci. Není proto překvapivé, že aktivita CDD je rovněž ovlivněna druhem substrátu. Bylo pozorováno, že Ara-C a dFdC jsou deaminovány v odlišné míře (Baker a kol., 2013). To by znamenalo, že ačkoliv např. NCI-H2009 přeměňují EdC ze všech linií nejlépe, nemusí to platit pro jiné cytidinové analogy.

Současně se stanovením aktivity deamináz byly buňkám aplikovány tři různé inhibitory obou deamináz. Zatímco tetrahydrouridin a diazepinon ribosid inhibují podle výsledků některých studií pouze aktivitu CDD, zebularin inhibuje jak CDD tak DCTD (Ludek a kol., 2009; Carlow a Wolfenden, 1998; Stoller a kol., 1977). Aplikace inhibitorů sloužila jako kontrola a rovněž pro možnost porovnání vlivu CDD a DCTD na deaminaci EdC. Nicméně inhibitory mohou mít vliv i na jiné buněčné procesy a v konečném důsledku mohou ovlivňovat buněčnou proliferaci. Proto byly inhibitory aplikovány i společně s EdU. Tímto krokem a následným vzájemným porovnáním vlivu na buňky inkubované EdU a EdC bylo možné eliminovat tento nežádoucí účinek jednotlivých inhibitorů.

Byly pozorovány velice odlišné výsledky mezi liniemi, ale i mezi účinkem různých inhibitorů na jednu linii. U linie NCI-H2009 byl účinek inhibitorů velmi malý. Tetrahydrouridin signál nesnižoval vůbec, diazepinon ribosid pouze 1,3x a zebularin 2,6x. I po inhibici CDD tedy deaminace probíhala velmi intenzivně. To ukazuje na silnou aktivitu DCTD a jen relativně malý vliv CDD. U linie 143B PML BK TK tetrahydrouridin ani zebularin signál nesnížily, diazepinon ribosid signál snížil jen velice nepatrně. Tyto výsledky jednak naznačovaly, že CDD příliš nepřispívá k deaminaci ani u této linie a současně ukázaly, že vliv zebularinu na DCTD je u této linie velice omezený nebo žádný. Linie HeLa se od obou předcházejících linií zásadně lišila. Zatímco tetrahydrouridin snížil deaminaci 10,5x, diazepinon ribosid ji snížil 13,4x, zebularin ovšem jen 3,4x. Tento výsledek indikoval, že EdC je v případě HeLa buněk primárně deaminováno pomocí CDD, což je v souladu s dříve publikovanými daty (Ligasová a kol., 2016). Deaminační aktivita linie A549 byla snížena účinkem všech tří inhibitorů, ačkoli míra snížení je mnohonásobně nižší než v případě HeLa buněk. Tetrahydrouridin snižuje nejvíce, 1,8x, diazepinon ribosid

1,5x a zebularin 1,3x. To by mohlo indikovat, že na přeměně EdC se podílejí jak CDD, tak DCTD. Deaminační aktivita linie HCT116 se rovněž snižuje účinkem všech tří inhibitorů, diazepinon ribosid ji snižuje 4x, tetrahydrouridin 3,6 a zebularin 2,8x. Opět je tedy pravděpodobné, že se na deaminaci EdC podílí jak CDD, tak DCTD, ovšem vliv CDD je oproti A549 nižší. Celková deaminační aktivita linie V79 byla tak nízká, že studium vlivu jednotlivých inhibitorů nebylo možné.

Překvapivým výsledkem bylo zjištění, že vliv tetrahydrouridinu a tím pádem CDD na deaminaci EdC není v mnoha případech z hlediska jeho deaminace klíčový. Naprosto zásadní roli hraje CDD v případě linie HeLa. Významný je její vliv i u linie HCT116. Naopak u linie 143B TK a NCI-H2009 se podle výsledků CDD na deaminaci EdC neuplatňuje, nebo je její vliv malý. To by mohlo ukazovat na značný vliv DCTD na deaminační aktivitu. Linie A549 se nachází v pomyslném žebříčku deaminační aktivity zprostředkované CDD na třetím místě za HeLa a HCT116 buňkami.

Velice zajímavý výsledek poskytla linie 143B. Tato linie představuje rodičovskou linii linie 143B TK, která zjevně zprostředkuje deaminační aktivitu převážně pomocí DCTD na úrovni EdCMP, které přeměňuje na EdUMP. Teoreticky by tak bylo možné EdUMP okamžitě fosforylovat odpovídajícími kinázami na EdUTP a následně inkorporovat do DNA. Překvapivě však tato linie nevykazovala signifikantní signál ani v případě kultivace s EdU, ani v případě kultivace s EdC. To ukazuje na silnou defosforylační aktivitu odpovídající nukleotidázy a rovněž na důležitost přítomnosti vysoce aktivní tymidin kinázy.

Pomocí western blotu byla detekována přítomnost enzymů CDD a DCTD a množství těchto enzymů u jednotlivých linií. Linie NCI-H2009 obsahovala nejvyšší množství enzymu CDD. Pro potřeby vzájemného porovnání bylo toto množství rovno 100 %. Linie HeLa pak obsahovala $9,8 \pm 4,2$ %, linie HCT116 $3,3 \pm 2,7$ %, linie A549 $3,1 \pm 2$ % a linie V79 $2,3 \pm 1,4$ %. Linie 143B a 143BTK neobsahovaly CDD. DCTD bylo nejvíce opět u linie NCI-H2009. Toto množství bylo pro potřeby hodnocení vzájemného obsahu DCTD rovněž rovno 100 %. Linie 143B TK obsahovala 82 ± 20 %, linie 143B 77 ± 26 %, linie HCT116 $70,3 \pm 21$ %, linie A549, $67,3 \pm 26$ %, linie HeLa $44,3 \pm 18$ % a linie V79 $4,3 \pm 7$ %.

Z těchto dat bylo zřejmé, že linie NCI-H2009 vykazuje mnohonásobně vyšší koncentrace CDD než ostatní linie. Např. HeLa buňky, které obsahovaly druhé nejvyšší množství CDD, jí obsahovaly cca 10x méně. V případě DCTD byly tyto rozdíly daleko nižší. Jen linie V79 obsahovala velice malý zlomek množství naměřeného v linii NCI-

H2009. Pozoruhodný byl rovněž velice slabý vztah celkově naměřené aktivity a obsahu CDD. Např. linie NCI-H2009 sice vykazovala vysoké množství CDD, ovšem její celková aktivita byla jen asi o 17% vyšší než byla deaminační aktivita u A549 buněk. Ty přitom obsahovaly jen asi 3% množství CDD naměřeného u NCI-H2009 buněk. Spíše existoval vztah mezi množstvím DCTD a její deaminační aktivitou po použití inhibitorů tetrahydrouridinu a diazepinon ribosidu, kdy byla měřena inhibiční aktivita jako pokles signálu EdU po přidání inhibitoru k buňkám inkubovaných s EdC. To by mohlo naznačovat daleko nižší funkční polymorfismus v případě DCTD.

V souhrnu je jasné, že vyvinutá technologie poskytuje nový nástroj pro stanovení deaminační aktivity zprostředkované CDD a DCTD. Současně výsledky ukázaly, že existuje jen malý vztah mezi aktivitou CDD a jejím množstvím a že její absence může být efektivně nahrazena aktivitou DCTD. Současně bylo jasné, že významnou roli v osudu deaminovaného produktu může hrát aktivita tymidin kinázy. Otázkou zůstává, jak velkou roli hraje rozdílná substrátová specifita různých polymorfních variant CDD a DCTD.

7. ZÁVĚR

Úkolem diplomové práce bylo vyzkoušet a optimalizovat metodu pro stanovení cytidinových deamináz. Byly testovány tři metody, první založená na fluorescenční mikroskopii, druhá na použití peroxidázy hodnocená spektrofotometricky a třetí založená na fluorescenci vyhodnocené čtečkou destiček. Byla provedena řada experimentů pro optimalizaci jednotlivých metod. Nicméně srovnáním stanovení aktivity cytidinových deamináz pomocí jednotlivých metod byla jako nejlepší vyhodnocena metoda založená na fluorescenci měřené čtečkou destiček.

Stanovení deaminační aktivity vybraných linií odhalilo velmi odlišné chování jednotlivých linií z hlediska inkorporace EdU, deaminační aktivity i účinku inhibitorů cytidinových deamináz na deaminaci. Nicméně z výsledků v kombinaci s Western blottem lze pozorovat, že většina linií obsahuje obě deaminázy, přičemž kromě linie HeLa, u níž značně převyšuje vliv CDD na deaminaci, u ostatních linií má zřejmě velký význam i DCTD.

Ačkoliv metoda vypovídá o aktivitě cytidinových deamináz, je obtížné odhadovat, která deamináza má hlavní roli. Deaminace je součástí komplexních reakcí metabolismu nukleotidů a její míra tak může být ovlivněna jinými enzymy. Velkou roli zřejmě hraje i substrátová specifita enzymu pro daný nukleosidový analog. Proto výsledky nelze zjednodušeně vztáhnout na všechny cytidinové analogy a v případě konkrétního analogu je třeba dalšího testování.

8. LITERATURA

BAKER J. A. R., WICKREMSINHE E. R., LI CLAIR H., OLUYEDUN O. A., DANTZIG A. H., HALL S. D., QIAN Y., RING B. J., WRIGHTON S. A., GUO Y. (2013): Pharmacogenomics of Gemcitabine Metabolism: Functional Analysis of Genetic Variants in Cytidine Deaminase and Deoxycytidine Kinase. *Drug Metabolism and Disposition* March 41(3): 541-545.

CARLOW D., WOLFENDEN R. (1998): Substrate Connectivity Effects in the Transition State for Cytidine Deaminase. *Biochemistry* 37: 11873-11878.

CARPENTER A. E., JONES T. R., LAMPRECHT M. R., CLARKE C., KANG I. H., FRIMAN O., GUERTIN D. A., CHANG J. H., LINDQUIST R. A., MOFFAT J., GOLLAND P. AND SABATINI D. M. (2006): CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 7(10): R100.

EVANS D. R., GUY H. I (2004): Mammalian Pyrimidine Biosynthesis: Fresh Insight into an Ancient Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 33035-33038.

FASULLO M., ENDRES L. (2015): Nucleotide Salvage Deficiencies, DNA Damage and Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 9431-9449.

HARTMANS. C., BUCHANAN J. M. (1959): Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis). *Annu. Rev. Biochem* 28: 365-410.

CHOI J. S., BERDIS A. J. (2015): Visualizing nucleic acid metabolism using non-natural nucleosides and nucleotide analogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1864: 164-175.

JAMIESON G. P, FINCH R. L., SNOOK M., WILEY J. S. (1987): Degradation of 1- β -d-Arabinofuranosylcytosine 5'-Triphosphate in Human Leukemic Myeloblasts and Lymphoblasts. *Cancer Res.* (47):3130-3165.

JANSEN R. S., SCHELLENS J. H. M., BEIJNEN J. H. (2010): Deoxyuridine analog nucleotides in deoxycytidine analog treatment: secondary active metabolites? *Fundam Clin Pharmacol.* (2):172-185.

JOHANSSON K., RAMASWAMY S., LJUNGCRANTZ C., KNECHT W., PISVKUR J., MUNCH-PETERSEN B., ERIKSSON S., EKLUND H. (2001): Structural basis for

substrate specificities of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Nature Structural Biology* 8 (7): 616-620.

JOSEPHYGG P. D., ELINGG T., MASON R. P. (1982): The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'- Tetramethylbenzidine. *The Journal Of Biological Chemistry* 257 (7): 3669-4675.

KAMENSKY L., JONES T.R., FRASER A., BRAY M.A., LOGAN D.J., MADDEN K.L., LJOSA V., RUEDEN C., ELICEIRI K.W., CARPENTER A.E. (2011): Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27 (8): 1179-1180.

KAPUŚCIŃSKI J., SZER W. (1979): Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 6 (11): 3519-3534.

KONG W., ENGEL K., WANG J. (2004): Mammalian Nucleoside Transporters. *Current Drug Metabolis.* 5: 63-84.

LANE A. L., FAN T. W. M. (2015): Regulation of Mammalian Nucleotide Metabolism and Biosynthesis. *Nucleic Acids Research* 43 (4): 2466-2485.

LEE M. W., PARKER W. B., XU B. (2013): New insights into the synergism of nucleoside analogs with radiotherapy. *Radiation Oncology* 8: 223.

LIGASOVÁ A., LIBOSKA R., FRIEDECKÝ D., MIČOVÁ K., ADAM T., OŽDIAN T., ROSENBERG I., KOBERNA K. (2016): Dr Jekyll and Mr Hyde: a strange case of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine and 5-ethynyl-2'-deoxycytidine. *Open Biol.* 6: 150172.

LIGASOVÁ A., STRUNIN D., FRIEDECKÝ D., ADAM T., KOBERNA K. (2015): A Fatal Combination: A Thymidylate Synthase Inhibitor with DNA Damaging Activity. *Plos One* 10(2): e0117459.

LUDEK O. R., SCHROEDER G. K., LIAO CH., RUSS P. L., WOLFENDEN R., MARQUEZ V. E. (2009): Synthesis and Conformational Analysis of Locked Carbocyclic Analogues of 1,3-Diazepinone Riboside, a High-Affinity Cytidine Deaminase Inhibitor. *J. Org. Chem.* 74: 6212-6223.

MILANESI G., BARBANTI-BRODANO G., NEGRINI M., LEE D., CORALLINI A., CAPUTO A., GROSSI M. P., RICCIARDI R. P. (1984): BK Virus-Plasmid Expression

Vector That Persists Episomally in Human Cells and Shuttles into Escherichia coli. *Molecular and cellular biology*: 1551-1560.

MINI E., NOBILIS., CACIAGLI B., LANDINI I., MAZZEI T. (2006): Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology* 17 (5): v7–v12.

NORDLUND P., REICHARD P. (2006): Ribonucleotide Reductases, *Annu. Rev. Biochem.* 75:68-706.

PETERS G. J., HONEYWELL R. J., MAULANDI M., GIOVANNETTI E., LOSEKOOT N., ETIENNE-GRIMALDI M. - C., MILANO G., SERDJEBI C., CICCOLINI J. (2014): Selection of the Best Blood Compartment to Measure Cytidine Deaminase Activity to Stratify for Optimal Gemcitabine or Cytarabine Treatment. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 33:4-6.

RAMPAZZO CH., MIAZZI CH., FRANZOLIN E., PONTARIN G., FERRARO P., FRANGINI M., REICHARD P., BIANCHI V. (2010): Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonukleotide. *Mutation Research* 703: 2-10.

REICHARD P. (2010): Ribonucleotide Reductases: Substrate Specificity by Allostery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 19-23.

ROCA-SANJUÁN D., RUBIO M., MERCHÁN M., SERRANO-ANDRÉS L. (2006) Ab initio determination of the ionization potentials of DNA and RNA nucleobases. *The journal of chemical physics* 125: 084302.

SALIC A., MITCHISON T. J. (2008): A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(7): 2415-2420.

SERDJEBI C., MILANO G., CICCOLINI J. (2014): Role of cytidinedeaminase in toxicity and efficacy of nucleoside analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* Early Online:1-8.

STOLLER R. G., MYERS CH. E., CHABNER B. A. (1978): *Biochemical Pharmacology* 27: 53-59.

UTTAMAPINANT CH., TANGPEERACHAIKUL A., GRECIAN S., CLARKE S., SINGH U., SLADE P., GEE K. R., TING A. Y. (2012): Fast, Cell-compatible Click Chemistry with Copper-chelating Azides for Biomolecular Labeling. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51 (24): 5852-5856.

VAN ROMPAYA A. R., JOHANSSON M., KARLSSON A. (2003): Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. *Pharmacology & Therapeutics* 100: 119– 139.

VOORDE J. V., BALZARINI J., LIEKENS S. (2014): Mycoplasmas and cancer: focus on nucleoside metabolism. *EXCLI Journal* 13: 300-322.

WEINER K. X. B., CIESLA J., JAFFE A. B., KETRING R., MALEY F., MALEY G. F. (1995): Chromosomal Location and Structural Organization of the Human Deoxycytidylate Deaminase Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (32): 18727-18729.

WONG A., SOO R.A., YONG W.P., INNOCENTI F. (2009): Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metabolism Reviews* 41(2): 77-88.

ZHAO H., FRENCH J. B., FANF Y., BENKOVIC S. J. (2013): The Purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem. Commun.* 49: 4444.

Internetové zdroje:

URL<<http://www1.chem.leeds.ac.uk/MEW/purine.htm>>

URL<<https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/biochemistry-ii/purines-and-pyrimidines/pyrimidine-metabolism>>

URL<http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/stryer7/CH25/unnumbered_25_p739a.jpg>

URL<<http://www.biologydiscussion.com/plant-physiology-2/nitrogen-metabolism/nucleotides-metabolism-and-de-novo-synthesis-of-nucleotides/22929>>

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FAM azid – 5-fluorescein azid

A – adenosin

ADP – adenosindifosfát

AICAR – aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid

AIR – aminoimidazol ribonukleotid

AMP – adenosinmonofosfát

AMPS – adenylosukcinát

APRT – adeninfosforibosyl transferáza

AraC – cytarabin

ATP – adenosintrifosfát

BCA – kyselina bicinchoninová

Ribóza – β -D-ribóza

deoxyribóza – β -D-2'-deoxyribóza

BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridin

BSA – bovinní sérový albumin

C – cytidin

CAIR – karboxyaminoimidazol

CDD – cytidin deamináza

CDP – cytidindifosfát

CNT – koncentrativní nukleosidový transportér

CO₂ – oxid uhličitý

dA – deoxyadenosin

DABCO – 1,4-diazabicyklo[2.2.2.]octanon

DAPI – 4',6'-diamidin-2-fenylindol

dATP – deoxyadenosintrifosfát

dC – deoxycytidin

dCK – deoxycytidinkináza

dCMP – deoxycytidinmonofosfát

DCTD – deoxycytidylát deamináza

ddH₂O – deionizovaná voda

dFdC – gemcitabin

dFdCDP – difluorodeoxycytidindifosfát

dFdCMP – difluorodeoxycitidinmonofosfát
dFdCTP – difluorodeoxycitidintrifosfát
dFdU – difluorodeoxyuridin
dG – deoxyguanosin
dGK – deoxyguanosinkináza
diazepinon ribosid – 2-(1-beta-D-ribofuranosyl)-3,4-dihydro-1H-1,3-diazepin-2(7H)-on
DMSO – dimethylsulfoxid
dN – deoxyribonukleosid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
dNDP – deoxynukleosiddifosfát
dNDP – deoxyribonukleosiddifosfát
dNMP – deoxyribonukleosidmonofosfát
dNTP – deoxyribonukleosidtrifosfát
dT – deoxytymidin
dTMP – deoxytymidinmonofosfát
dTTP – deoxytymidintrifosfát
dU – deoxyuridin
dUMP – deoxyuridinmonofosfát
EdCMP – 5-etynyl-2'-deoxycytidinmonofosfát
edN – 5'-deoxynukleotidáza
EdU – 5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EdUMP – 5-etynyl-2'-deoxyuridinmonofosfát
EdUTP – 5-etynyl-2'-deoxyuridintrifosfát
ENT – ekvilibrativní nukleosidový transportér
FGAM – formylglycinamid ribonukleotid
fTHF – formyltetrahydrofolát
G – guanosin
GAR – glycinamid ribonukleotid
GDP – guanosindifosfát
Gln – glutamin
GMP – guanosintrifosfát
GTP – guanosintrifosfát
HCl – kyselina chlorovodíková
HGPRT – hypoxantin-guaninfosforibosyl transferáza

hENT – lidský ekvilibrativní nukleosidový transportér
hCNT – lidský koncentrativní nukleosidový transportér
hNT – lidský nukleosidový transportér
IMP – inosinmonofosfát
mdN – 5'-deoxynukleotidáza
NA – nukleosidový analog
NaCl – chlorid sodný
PBS – fosfátový pufr
PNP – nukleosid fosforyláza
PRA – fosforibosylamin
PRPP – 5'-fosforybosi-1'-fosfát
RNA – ribonukleová kyselina
RNR – ribonukleotid reduktáza
SAICAR – sukcinokarboxyamidazol-4-karboxyamid ribonukleotid
SDS – dodecylsírán sodný
SDS-PAGE – denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza
SNP – polymorfismus jednoho nukleotidu
T – tymidin
TBS – Tris buffered saline
TGS – Tris glycinne running buffer
THF – tetrahydrofolát
THU – tetrahydrouridin
TK1 – tymidin kináza 1
TK2 – tymidin kináza 2
TMB – 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin
TP – nukleosidfosforyláza
U – uridin
UDP – uridindifosfát
UMP – uridin monofosfát
UTP – uridintrifosfát
XMP – xantosinmonofosfát