



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Synchronizace buněčného cyklu u lidských
nádorových linií**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Marie Kulatá**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Eva Řezníčková**
Termín odevzdání práce: 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marie Kulatá
Název práce	Synchronizace buněčného cyklu u lidských nádorových linií
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Eva Řezníčková
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce je zaměřena na možnosti synchronizace buněčného cyklu u lidských nádorových linií. Teoretická část pojednává o buněčném cyklu, jeho regulaci a především metodách použitelných pro jeho synchronizaci. Experimentální část je věnována synchronizaci buněčného cyklu buněk prostatické nádorové linie C4-2 třemi vybranými metodami, konkrétně sérovou deprivací, thymidinem a nokodazolem. Z výsledků práce vyplývá, že ze všech testovaných metod je thymidinový blok pro linii C4-2 nejvhodnější.</p>
Klíčová slova	Buněčný cyklus, regulace, synchronizace
Počet stran	46
Počet příloh	1 CD
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Marie Kulatá
Title of thesis	Cell cycle synchronization of human cancer cell line
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Eva Řezníčková
The year of presentation	2016
Abstract	<p>This bachelor thesis is focused on the possibilities of cell cycle synchronization in human cancer cell lines. The theoretical part deals with the cell cycle, its regulation and mainly the techniques used for its synchronization. The experimental part is devoted to the cell cycle synchronization of C4-2 prostate cancer cell line by three specific methods, namely by serum deprivation, thymidine and nocodazole . The results of this work show that thymidine block is the most suitable method for the synchronization of the cell cycle of C4-2 cells.</p>
Keywords	Cell cycle, regulation, synchronization
Number of pages	46
Number of appendices	1 CD
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 14.12.2015

Podpis

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí bakalářské práce, Mgr. Evě Řezníčkové za odborné vedení, ochotu, cenné rady a především velkou trpělivost při zpracování této práce. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu a pomoc při studiu.

Obsah

I. TEORETICKÁ ČÁST	8
Cíle práce	9
1 Buněčný cyklus	10
1.1 Fáze buněčného cyklu	10
1.1.1 G₁-fáze	11
1.1.2 S-fáze	12
1.1.3 G₂-fáze	12
1.1.4 M-fáze	12
2 Regulace buněčného cyklu	13
2.1 Cykliny a cyklin dependentní kinázy	13
2.2 Inhibitory cyklin dependentních kináz	14
2.3 Kontrolní body	15
3 Synchronizace buněčného cyklu	16
3.1 Použití farmakologických inhibitorů k synchronizaci buněk	16
3.1.1 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v G₁-fázi	18
3.1.2 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v S fázi	19
3.1.3 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v G₂/M fázi	20
3.1.4 Synchronizace sérovou deprivací	21
3.2 Fyzikální metody synchronizace	21
3.2.1 Synchronizace kontaktní inhibicí	21
3.2.2 Synchronizace centrifugální elutriací	22
3.2.3 Setřepávání mitotických buněk	22
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4 MATERIÁL	24
4.1 Přístrojové vybavení	24
4.2 Chemikálie	24
4.3 Roztoky	25
4.4 Protilátky	26
4.5 Použitá buněčná linie	26

5	METODIKA.....	27
5.1	Kultivace, ovlivnění nádorové linie, sklizení a lyzace buněk.....	27
5.2	Elektroforéza SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce na membráně.....	28
5.3	Průtoková cytometrie.....	28
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
6.1	Synchronizace prostatické linie C4-2 pomocí sérové nedostatečnosti ..	30
6.2	Synchronizace prostatické linie C4-2 thymidinem.....	32
6.3	Synchronizace prostatické linie C4-2 nokodazolem.....	32
6.4	Studium exprese proteinových markerů apoptózy.....	35
6.5	Synchronizace buněčné linie C4-2 a následné uvolnění z navozeného bloku buněčného cyklu	37
7	ZÁVĚR.....	40
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	41
9	SEZNAM ZKRATEK	45

I. TEORETICKÁ ČÁST

Cíle práce

V teoretické části práce bylo cílem:

- a) nastudování dostupné literatury a vypracování literární rešerše k zadanému tématu

V experimentální části práce bylo cílem:

- a) zvládnutí vybraných biologických a biochemických metod (kultivace lidských nádorových buněk, průtoková cytometrie, western blotting)
- b) optimalizace postupu synchronizace buněčného cyklu lidské prostatické nádorové linie C4-2

1 Buněčný cyklus

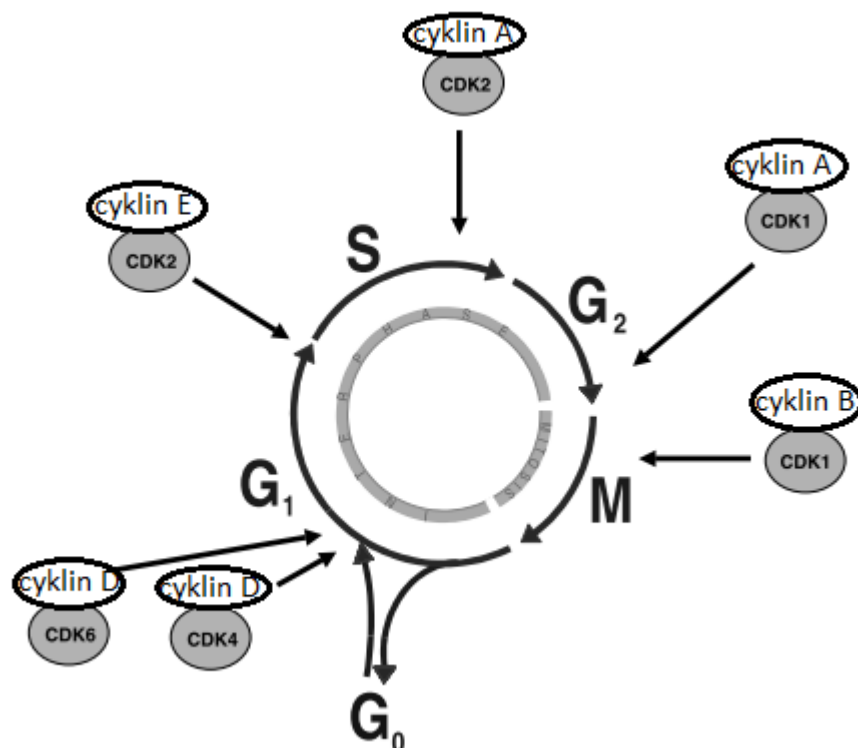
Buněčný cyklus představuje proces, ve kterém se eukaryotická buňka rozmnožuje prostřednictvím jednotlivých posloupných akcí, během kterých buňka zdvojnásobí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě. Buněčný cyklus představuje primární mechanismus, kterým se rozmnožují všechny živé organismy. V různých fázích života se u jednotlivých organismů odlišuje, nicméně můžeme konstatovat, že určité atributy buněčného cyklu jsou pro všechny organismy společné. Každá buňka během interfáze vykonává zásadní úkony, které jsou nezbytné pro dosažení hlavního záměru buňky. Cílem je zkopírování genetické informace a její převedení na další generaci buněk (Alberts a kol., 2001).

Díky detailním studiím buněčného cyklu jsme v současné době schopni nejen charakterizovat primární fáze buněčného cyklu a jejich průběh, ale zároveň můžeme i stanovit, jakým způsobem jsou všechny jednotlivé procesy cyklu kauzálně propojeny. Můžeme i zjistit, jakým způsobem buňky odpovídají na signály přicházející zvenčí, případně jak je cyklus regulován (Nečas, 2000).

1.1 Fáze buněčného cyklu

Buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází (viz obr. 1). Za nejvýznamnější události jsou považovány dva procesy. Prvním procesem je dělení jádra, které se označuje jako mitóza. Druhým dějem je rozdělení buňky na dvě dceřinné, který nese název cytokineze. Dohromady tyto dva procesy vytváří takzvanou M-fázi buněčného cyklu.

Období mezi dvěma M-fázemi je označováno jako interfáze a pro buňku má velký význam, jelikož prezentuje velmi aktivní období. Celá interfáze zahrnuje další tři fáze buněčného cyklu: G_1 , S a G_2 -fázi. Celá interfáze je charakteristická přepisem genů, syntézou proteinů a zvětšováním buněčné velikosti. Obecně se doba trvání všech fází dohromady nazývá jako délka buněčného cyklu neboli generační doba buňky (Alberts a kol., 2001; Nečas, 2000).



Obr. 1 Fáze buněčného cyklu. Jednotlivé fáze buněčného cyklu a vyznačená místa působení regulačních CDK/cyklin komplexů (Vermeulen a kol., 2003).

1.1.1 G₁-fáze

Začátek G₁-fáze, neboli také první přípravné fáze, nastává v momentě, kdy se mateřská buňka rozdělí a dceřiná buňka je schopná samostatné existence. Za konec této fáze je považováno zahájení replikace jaderné DNA, což znamená vstup do S fáze. Z časového hlediska představuje G₁ fáze u dělících se živočišných buněk asi 30-40 % celého buněčného cyklu. Dochází během ní v podstatě k duplikaci „buněčné hmoty“. V tomto období probíhají v buňce intenzivní syntetické procesy, především syntéza RNA a proteinů a v důsledku toho nabírá buňka na hmotnosti a roste. Většina buněčných struktur, jako ribozomů, mitochondrií, endoplazmatického retikula atd. zvětšuje svůj počet. V G₁-fázi vzniká zásoba nukleotidů a syntetizují se enzymy nezbytné pro pozdější replikaci jaderné DNA. Tato fáze je specifická díky přítomnosti jednoho ze tří kontrolních uzlů, které hrají důležitou roli při regulaci buněčného cyklu (Nečas, 2000).

1.1.2 S-fáze

S fází (syntetickou fází) je pojmenováno časové období cyklu, kdy se odehrává replikace jaderné DNA. Je to jedna z nejkritičtějších fází buněčného cyklu, neboť během ní musí dojít k přesnému zdvojení celého genomu, který nese veškeré genetické informace pro další generace (Surjit a kol., 2006). Začátek replikace DNA v jednotlivých chromosomech nebývá obvykle synchronní. Jako poslední se replikují heterochromatinové části chromosomu. S fáze představuje relativně dlouhou časovou etapu, u živočišných buněk trvá mezi 8 až 20 hodinami, což způsobuje pomalá replikace DNA v eukaryotních chromosomech a výše zmíněná asynchronie. Zahájení obousměrné replikace ($3' \rightarrow 5'$, $5' \rightarrow 3'$) na více místech podél každého chromozómu urychluje proces replikace. Po ukončení replikace je v jádru každý chromosom zdvojen a oba nové chromosomy zůstávají spojeny v místě centromery. Nedokončení replikace v rámci S fáze, by vedlo k zlomení chromosomu při další mitóze, vzniku chromosomální mutace, či dokonce smrti buňky. Hlavní role S fáze spočívá v tom, že na jejím konci má buňka dvojnásobný počet genů (Nečas, 2000; Laskey a kol. 1989).

1.1.3 G₂-fáze

G₂-fáze, nazývána také někdy jako druhá přípravná fáze, následuje po skončení S fáze a je ukončena zahájením mitózy. V této etapě se buňka i nadále vyvíjí a roste, a to díky intenzivní syntéze proteinů a RNA a tvorbě buněčných struktur. Můžeme konstatovat, že syntetické procesy G₂-fáze připravují buňku před nástupem vlastního mitotického dělení. Zde, v tomto úseku buněčného cyklu se nachází druhý, z již zmiňovaných kontrolních uzlů buněčného cyklu. A to zejména kvůli tomu, že určuje, jestli buňka, pokud je na to nachystána, opravdu do mitózy vstoupí (Nečas, 2000).

1.1.4 M-fáze

M-fáze, též nazývaná mitotická, je poslední etapou buněčného cyklu. V tomto procesu se dělí somatické buňky mnohobuněčných organismů. Je to fáze cyklu, kdy dochází k rozdělení jádra, tedy samotná mitóza či karyokineze a rozdělení cytoplazmy tzv. cytokineze. Během tohoto období se vyvíjí dvě dceřiné buňky z jedné buňky mateřské. Dceřiné buňky nesou identickou genetickou výbavu s

mateřskou buňkou. Správně dokončená replikace DNA během S fáze buněčného cyklu, kdy se veškerá jaderná DNA mateřské buňky duplikuje, je tedy nezbytnou podmínkou při vzniku dceřiných buněk. Segregace těchto kondenzovaných chromozómů k opačným pólům mateřské buňky je zajišťována komplexním cytoskeletálním zařízením – mitotickým dělicím vřeténkem. Rozdělení jádra probíhá v pěti fázích: profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Následný proces cytokineze přibližně rovnoměrně rozdělí rodičovskou cytoplazmu a organely v ní obsažené do dvou dceřiných buněk a vytvoří jejich nové hranice (Otová a kol., 2008; Kovář, 2003).

2 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus, jak bylo již zmíněno, je velice sofistikovaný sled jednotlivých, po sobě jdoucích akcí, které vedou k replikaci DNA, duplikaci chromatid a jejich následné segregaci do dceřiných buněk. Na správný průběh těchto posloupných dějů dohlíží několik mechanismů regulace buněčného cyklu. Regulace buněčného cyklu je proces samočinný, avšak podřizuje se vnějším a vnitřním faktorům. Základem této regulace je vzájemná interakce specifických proteinů (Sládek, 2007; Otová a kol., 2008). Sérií cyklických aktivací a deaktivací příslušných kontrolních enzymů, nazývaných cyklin dependentní kinasy (CDK) je cyklus přísně kontrolován (Johnson & Shapiro, 2012).

2.1 Cykliny a cyklin dependentní kinázy

Cykliny a cyklin dependentní kinázy (CDK) jsou proteiny, které jsou nezbytné při procesu regulace buněčného cyklu (Otová a kol., 2008). Hlavní regulační proteiny jsou CDK. Jsou to katalytické podjednotky z velké rodiny serin/threoninových proteinkináz, které jsou aktivovány v určitých bodech buněčného cyklu. Množství CDK zůstává v průběhu cyklu stabilní, na rozdíl od jejich aktivačních proteinů cyklinů. Název těchto proteinů je odvozen od opakujících se cyklických výkyvů, kdy jsou cykliny syntetizovány a pak degradovány. Hladiny cyklinů stoupají a klesají v průběhu cyklu a CDK se tedy periodicky aktivují (Vermeulen a kol., 2003). Aktivace CDK je uskutečněna díky komplexu cyklinu s cyklin dependentními kinázami (CDK/cyklin). Enzymatická aktivita komplexů fosforyluje buď cílové

proteiny, nebo další proteinkinázy, které jsou potom schopny dále fosforylovat různé proteiny potřebné pro průchod buněčným cyklem. Kromě vazby cyklinu, je aktivita CDK regulována fosforylací těchto proteinů na konzervovaných threoninových a tyrosinových zbytcích. Tyto fosforylace indukují konformační změny a posílí vazbu cyklinů (Jeffrey et al. 1995; Paulovich & Hartwell 1995). Různé cykliny jsou potřebné v různých fázích buněčného cyklu. Základní skupiny cyklinů a CDK stěžejních pro regulaci buněčného cyklu shrnuje přehledná tabulka č. 1.

Tab. č. 1. Shrnutí CDK/cyklin komplexů a místa jejich účinku v buněčném cyklu (převzato Vermeulen a kol; 2003).

CDK	Cyklin	Fáze buněčného cyklu
CDK4, CDK6	Cyklin D1, D2, D3	G ₁ fáze
CDK2	Cyklin E	Přechod G ₁ /S fáze
CDK2	Cyklin A	S fáze
CDK1	Cyklin A	Přechod S/G ₂ fáze
CDK1	Cyklin B	Mitóza
CDK7	Cyklin H	CAK, všechny fáze buněčného cyklu

2.2 Inhibitory cyklin dependentních kináz

Na mitogenu závislá progrese přes G₁ fázi a zahájení syntézy DNA (S fáze) v průběhu savčího buněčného cyklu je kooperativně regulována několika třídami CDK, jejichž činnost je postupně omezena inhibitory CDK (CKI). Tyto inhibitory se samostatně váží na CDK nebo na komplex CDK/cyklin a regulují tak aktivitu CDK. Jsou známy dvě odlišné rodiny CKI, rodina INK4 a Cip/Kip. CKI se rozdělují do těchto rodin na základě jejich struktury a CDK na které se váže (Sherr a Roberts, 1999).

INK4 (Inhibitors of CDK4) rodina zahrnuje proteiny (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}), které specificky inaktivují pouze katalytické podjednotky cyklin dependentních kináz nezbytných pro G₁ fázi (CDK4 a CDK6). Tyto CKI tvoří

stabilní komplexy s CDK a tudíž brání navázání cyklinu, konkrétně cyklinu typu D (Carnero a Hannon, 1998).

Inhibitory rodiny Cip / Kip jsou široce působící proteiny. Patří k nim proteiny p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} a p57^{KIP2} z nichž všechny obsahují charakteristické motivy v rámci jejich amino-terminálních zbytků, které jim umožňují vazbu na cyklin a CDK podjednotky. Proteiny rodiny Cip / Kip jsou účinnými inhibitory komplexů CDK2/cyklin E a A. (Sherr a Roberts, 1999).

2.3 Kontrolní body

Kontrolní body (checkpoints) buněčného cyklu jsou nedílnou součástí opravy DNA, které koordinují spolupráci mezi mechanismy buněčného cyklu a několika biochemickými drahami, které reagují na poškození a obnovují strukturu DNA. Tím, že zdrží progresi buněčným cyklem, poskytují více času pro opravu před kritickými fázemi, kdy je genom replikován (S fáze) a následně segregován (M fáze). Ztráta, nebo zeslabení funkce kontrolního bodu může zvýšit spontánní a indukované genové mutace a chromozomální aberace tím, že snižuje účinnost reparace DNA (Kaufmann a Paules, 1996). V buněčném cyklu se nachází přinejmenším tři kontrolní body. Jsou pojmenovány podle místa, kde se nachází a kde působí: G₁ kontrolní bod, G₂ kontrolní bod a poslední M kontrolní bod.

G₁ kontrolní bod, jak bylo již zmíněno, se nachází v G₁ fázi buněčného cyklu, konkrétně v závěrečné etapě této fáze. Tento bod je spjatý s aktivací komplexu CDK2/cyklin E. Inhibitory CDK p21^{CIP1/WAF1} a p27^{KIP1} jsou proteiny, které zajišťují kontrolu. Pokud je detekováno poškození DNA, protein p53 aktivuje expresi inhibitoru p21, což má za následek zablokování replikace DNA. Inhibitor p27 je protein, jehož aktivita je regulována exogenními signálními molekulami. Aktivaci inhibitoru p27 zajišťuje TGFβ (tumor growth factor) a naopak IL-2 (interleukin 2) ho inaktivuje. Pokud buňka projde tímto kontrolním bodem, tak většinou úspěšně dokončí buněčný cyklus a rozdělení se (Kovář, 2003).

Dojde-li k poškození DNA během G₂ fáze, jsou buňky schopné iniciovat zastavení buněčného cyklu bez ohledu na přítomnost proteinu p53. V buňce dojde k aktivaci proteinkináz Chk1 a Chk2, které zainhibují aktivační fosfatázu Cdc25 a vstupu do mitózy je zabráněno tím, že je CDK1 udržována v zablokovaném stavu

prostřednictvím inhibiční fosforylace případně udržením složek komplexu CDK1/cyklin B mimo jádro (Vermeulen a kol., 2003).

Další a poslední kontrolní bod buněčného cyklu se nazývá mitotický. Ten se nachází na rozhraní metafáze a anafáze. Podmínkou zahájení anafáze je napojení všech chromozomů v metafázní destičce na mitotické vřeténko, aby došlo ke správnému rozdělení počtu chromozomů do dceřiných buněk. Signál, který postup buňky do anafáze blokuje, vysílají kinetochory, které nejsou doposud připojeny k mikrotubulům vřeténka (Sládek, 2007; Otová a kol., 2008).

3 Synchronizace buněčného cyklu

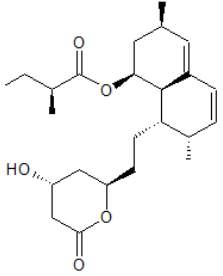
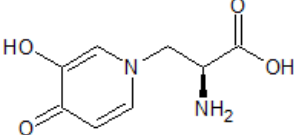
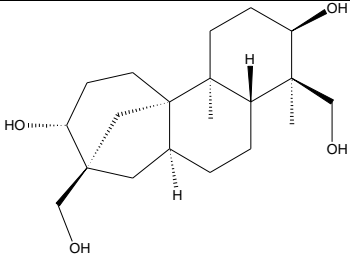
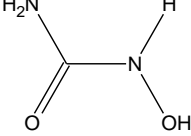
Synchronizovaná kultura je ta, ve které všechny buňky procházejí jednotlivými fázemi buněčného cyklu v relativně jednotné skupině (Cooper, 2002). Použití synchronních populací buněk v odlišných fázích buněčného cyklu umožňuje studium molekulárních a biochemických pochodů a jejich následků během buněčného dělení. Proto bylo vytvořeno mnoho metod pro synchronizaci buněk v určitých fázích buněčného cyklu. Některé z běžných metod zahrnují farmakologické látky, které působí v určité fázi během buněčného cyklu. Avšak bylo prokázáno, že manipulace s některými činidly mohou vyvolávat vedlejší účinky, jako je např. poškození DNA (chromozomální aberace či kumulace dvouřetězcových DNA zlomů), narušení metabolismu buňky nebo navození buněčné smrti. Kromě farmakologických prostředků je známo několik metod, které nejsou závislé na těchto činidlech, ale rovněž jsou schopné synchronizovat buňky asynchronní populace v určitých fázích buněčného cyklu. Mezi tyto metody patří synchronizace buněk sérovou deprivací, izolace časných G₁ buněk pomocí kontaktní inhibice a centrifugální elutriace buněk. Mitotické setřepávání je další způsob, jak šetrně izolovat mitotické buňky. V následujících kapitolách se zaměříme na jednotlivé metody synchronizace (Davis a kol., 2001).

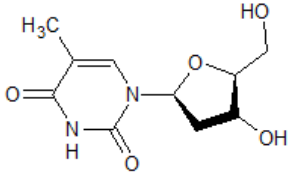
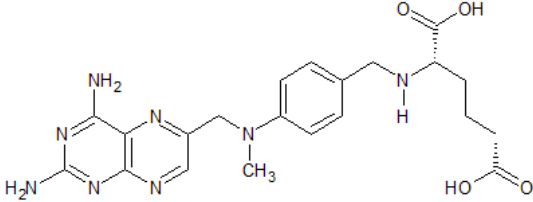
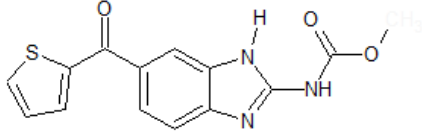
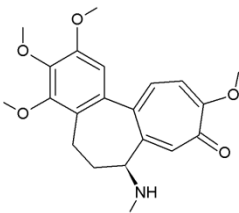
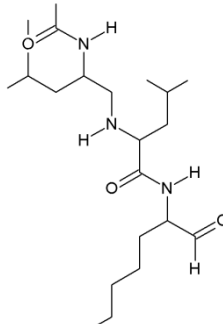
3.1 Použití farmakologických inhibitorů k synchronizaci buněk

Farmakologické metody využívají tzv. synchronizačních agens, což jsou chemické látky, které po přidání do kultivačního média k proliferujícím buňkám blokují

buněčný cyklus v určitých fázích. Takový inhibitor může být potom odstraněn z média a dané buňky mohou dále postupovat ve svém cyklu synchronním způsobem. K dispozici je mnoho inhibitorů, které mohou být použity k zastavení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu; nicméně je důležité použití reverzibilních inhibitorů, jelikož hlavním cílem je uvolnění buněk za účelem synchronizace. Tabulka (Tab. č. 2) shrnuje nejpoužívanější látky pro buněčnou synchronizaci. Účinnost těchto agens je závislá na řadě faktorů, jako je typ buněk, použitá koncentrace a délka působení. Tyto chemické látky interferují s mechanismy buněčného cyklu, tudíž je třeba také brát na zřetel, že mohou mít neznámé účinky na buňky a mohou tak indukovat apoptózu, nejsou-li zmíněné podmínky optimální (Davis a kol., 2001).

Tabulka č. 2 Vybrané farmakologické agens užívané k buněčné synchronizaci

Fáze buněčné synchronizace	Látky pro buněčnou synchronizaci	Chemický strukturální vzorec látky
Časná G ₁ fáze	Lovastatin	
Pozdní G ₁ fáze	L-mimosin	
Přechod G ₁ /S fáze	Afidikolin	
Časná S fáze	Hydroxyurea	

Časná S fáze	Thymidin	
Pozdní S fáze	Methotrexát (Amethopterin)	
G ₂ /M fáze	Nokodazol	
G ₂ /M fáze	Kolcemid	
G ₂ /M fáze	ALLN (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal)	

3.1.1 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v G₁-fázi

Mezi nejznámější a nejpoužívanější farmakologické látky užívané k zablokování buněčného cyklu v G₁ fázi patří: Lovastatin a Mimosin.

Látka **Lovastatin** (LOV) je široce používána k léčbě hypercholesterolémie. LOV a jeho analoga (mevastatin, kompaktin) kompetitivně inhibují 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzymA (HMG-CoA) reduktázu, což je enzym potřebný pro konverzi HMG-CoA na mevalonovou kyselinu. Důsledkem zastavení syntézy mevalonátu je zablokování replikace DNA a zablokování buněčného cyklu v rané G₁ fázi (Keyomarsi a kol., 1991).

Ve výčtu synchronizačních činidel nesmí chybět vzácná neproteinová rostlinná aminokyselina **Mimosin**, která inhibuje zahájení replikace DNA před vytvořením aktivní replikační vidlice a zastavuje tak buněčný cyklus v pozdní G₁ fázi. Účinky této látky na buňky jsou závislé na koncentracích mimosinu a době inkubace, synchronizace je vratná. Dále také činidlo inhibuje replikaci mitochondriální DNA (Krude, 1999).

3.1.2 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v S fázi

Běžně používané inhibitory replikace DNA, jako je afidikolin, hydroxyurea, methotrexát a nebo nadbytek thymidinu blokují všechny kroky prodlužování vlákna nově vznikající DNA při replikaci, umožňují však dokončení iniciačních kroků, a proto zadržují buňky v S fázi (Uzbekov, 2004).

Nejnámější a nejvyužívanější je deoxynukleosid **Thymidin** složený z nukleové báze thyminu a pětiuhlíkatého cukru deoxyribózy. Buňky ovlivněné nadbytkem thymidinu, převádí dodaný thymidin na thymidintrifosfát (TTP), který inhibuje ribonukleotid reduktázu. Ribonukleotid reduktáza je enzym katalyzující redukcí cytidin difosfátu (CDP) na deoxycytidin difosfát (dCDP). Následný úbytek deoxycytidin trifosfátů (dCTP) znemožňuje syntézu DNA a hromadí buňky v S fázi. Tento blok může být jednoduše uvolněn výměnou kultivačního média s thymidinem za médium běžně užívané nebo jednoduše přidáním deoxycytidinu ke kultuře (Hiramoto a kol., 1990).

Inhibiční účinek fyto toxinu **Afidikolinu** (APH) na replikační DNA polymerázu α zabraňuje G₁ buňkám ve vstupu do DNA syntetického období, blokuje a akumuluje buňky při G₁/S hranici a neumožňuje postup buňky do dalších fází buněčného cyklu. Afidikolin na rozdíl od hydroxymočoviny a thymidinu nemá až tak velký vliv na viabilitu buněk a nebrání syntéze dNTP a DNA polymeráz. Ve skutečnosti buňky vystavené Afidikolinu dále syntetizují všechny tři DNA polymerázy alfa, beta, gama stejně jako všechny dNTP, avšak brání DNA polymeráze α iniciovat replikaci. Když je následně tento fyto toxin odstraněn, jsou všechny DNA polymerázy i všechny dNTP přítomny v optimálním množství pro iniciaci DNA a replikaci (shruto Pedrali-Noy a kol., 1980).

Protinádorové léčivo **Hydroxymočovina** (HU) je historicky jedním z nejstarších cytostatik. Jedná se o analog močoviny. Mechanismus jejího účinku zahrnuje inhibici ribonukleotidreduktázy, enzymu potřebného pro převedení ribonukleotidu difosfátu na deoxyribonukleotid difosfát, který je nezbytný pro *de novo* syntézu všech DNA prekurzorů. HU synchronizuje buněčný cyklus zastavením buněk v S fázi důsledkem vyčerpání deoxyribonukleotidu, stavebního kamene DNA (Kurose a kol., 2005).

Methotrexát (MTX) je thymidinový analog inhibující enzym dihydrofolátreduktázu, čímž je znemožněn vznik tetrahydrofolátu, který je nezbytný k přenosu jednouhlíkatých fragmentů. To znemožňuje syntézu nukleotidů (konkrétně thyminu), pro které je tetrahydrofolát nutný jako koenzym (Uzbekov, 2004).

3.1.3 Farmakologické látky užívané k synchronizaci buněčného cyklu v G₂/M fázi

Některá farmakologická činidla používaná pro synchronizaci buněk v G₂/M fázi se také nazývají mikrotubulární jedy. Mezi tyto jedy řadíme například látky: nokodazol, kolchicin, kolcemid a ALLN.

Nokodazol v ošetřených buňkách v důsledku depolymerizace mikrotubulů výrazně brání tvorbě a změnám v organizaci cytoskeletu. Rozpad mikrotubulů a zablokování tvorby mitotického vřeténka brání vstupu buněk do mitózy a buněčný cyklus je zastaven v pozdní G₂ či časně M fázi (Davis a kol., 2001; Prager-Khoutorsky a kol., 2007; Rieder a Cole, 2000).

Další z mikrotubulárních jedů se nazývá **Kolcemid**. Kolcemid, stejně jako nokodazol, brání mikrotubulární výstavbě, čímž zamezuje tvorbě mitotického aparátu nezbytného při navazování chromozomů a jejich následné rozdělování. Jelikož tyto děje účinkem Kolcemidu neprobíhají, buňka zastaví svůj cyklus v M-fázi. Nahromaděný cyklin A je degradován, zatímco cyklin B se akumuluje a udržuje buňku v dané mitotické fázi. Hladina cyklinu B je zvýšená po dobu, kdy je buňka vystavena Kolcemidu (Urbani a kol., 1995).

N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) je inhibitor neutrálních cysteinových proteáz a především proteazomu. Proteazom je nepostradatelný při odbourávání proteinů (proteolýze) v buňkách. V důsledku narušení této proteolýzy se buňky zastaví v metafázi mitózy díky nahromadění cyklinu B, kdy

ukončení mitózy je podmíněno degradací tohoto proteinu. V přítomnosti ALLN dochází v buňce k rozpadu jaderného obalu, formování mitotického vřeténka, kondenzaci chromozomů a jejich přemístění do metafázní destičky (Uzbekov a kol., 1999).

3.1.4 Synchronizace sérovou deprivací

Sérová deprivace (strádání, "hladovění") se často používá jako metoda synchronizace buněčného cyklu. Sérové vyhladovění, nebo nízká koncentrace fetálního séra zadržuje buňky v G_0 klidové fázi či brzké G_1 fázi. Po navrácení séra do média se buňky z bloku uvolní a předpokládá se jejich synchronní postup buněčným cyklem (Cooper, 2003). Přechod mezi klidovým stavem G_0 a počátkem G_1 fáze je ovlivňován růstově stimulačními a růstově inhibičními faktory, které jsou přítomny v extracelulárním prostředí, tedy v séru přidaném do kultivačního média. Tento přechod je částečně zprostředkován přes cykliny typu D, které jsou pozitivně regulovány růstovými faktory a umožňují vstup do G_1 (Sherr, 1993). Je důležité poznamenat, že v buňce důsledkem ztráty séra dochází k transkripční represi regulačních genů buněčného cyklu, jako jsou cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK) (Mittnacht a kol., 1991).

3.2 Fyzikální metody synchronizace

Na rozdíl od farmakologických činidel jsou fyzikální metody výhodnější díky nízké toxicitě, nenarušují buněčný cyklus buněk ani buněčné procesy. Nevýhodou je nižší účinnost v porovnání s farmakologickými postupy, i přes to jsou tyto metody hojně využívány k synchronizaci buněčného cyklu.

3.2.1 Synchronizace kontaktní inhibicí

Kontaktní inhibice je proces, který zastaví růst buněk ve chvíli, kdy dojde ke styku buněk navzájem. Výsledkem je, že normální buňky přestanou proliferovat a vytvoří v kultivační misce monovrstvu. Kontaktní inhibice je silný protinádorový mechanismus, který se v rakovinných buňkách inaktivuje. Zástava růstu touto inhibicí je signalizována membránovými proteiny a je zprostředkována zvýšenými hladinami inhibitorů cyklin-dependentních kináz $p27^{Kip1}$ a $p16^{INK4a}$. Tyto inhibitory

se váží na komplexy CDK/cyklin a zastaví buňky v G_1 fázi buněčného cyklu (Seluanov a kol., 2009).

3.2.2 Synchronizace centrifugální elutriací

Buňky v určité fázi buněčného cyklu mají rozdílnou velikost a váhu. Na základě této odlišnosti mohou být izolovány metodou centrifugální elutriace. Buňky ve fázi G_2 a M jsou díky replikaci DNA a syntéze všech komponentů nezbytných pro rozdělení buňky na dvě, dvojnásobně větší a tím i těžší než buňky v časně G_1 fázi. Oproti tomu buňky v S fázi dosahují jen střední velikosti a váhy. Takto rozdílné buňky pak lze separovat pomocí speciálního přístroje tzv. elutriační centrifugy. Tento přístroj se skládá ze speciálně navrženého rotoru, ve kterém je odstředivá síla na buněčnou populaci vyrušena médiem pohybujícím se v opačném směru. Buňky se vstříkují pomocí čerpadla do elutriačního rotoru, který rotuje v konstantní síle g . Když je odstředivá síla rotoru (z proximální části k distální) v rovnováze s protilehlou silou průtoku (z distální části k proximální), buňky plavou, na základě jejich velikosti, na určitou pozici v elutriační komoře. Malé buňky časně G_1 fáze jsou proximální, zatímco buňky větší G_2 /M fáze jsou distální. Jak se zvyšuje rychlost proudění, proximální časně G_1 buňky jsou vymyté, nebo vytlačené z komory a následně shromážděny (Davis a kol., 2001).

3.2.3 Setřepávání mitotických buněk

Setřepávání mitotických buněk je originální metodou pro synchronizaci buněk. Princip této metody spočívá v jemných třesoucích pohybech tkáňových kultivačních nádob s pěstovanými buňkami a následný sběr volných a volně připojených kulatých buněk v M fázi (Nakayama a kol., 2011). Mitotické buňky jsou méně přilnavé, a tedy klepnutím mohou být snadno uvolněny od podkladu kultivační nádoby a shromážděny. Tato metoda nevyžaduje žádné chemické zásahy a může být považována za negenotoxickou (Heinemann a kol., 2010). Tato technika je rychlá, velmi jemná a produkuje vysoce synchronizované kultury, nicméně výtěžky mohou být velmi nízké (Shorl a Sedivy, 2007).

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 MATERIÁL

4.1 Přístrojové vybavení

Při provádění experimentů byly použity následující přístroje: aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), automatické pipety (Eppendorf), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), centrifuga BR4i (Jouan), CO₂ inkubátor (Sanyo), digitální zobrazovací přístroj na bázi chemiluminiscence LAS 4000 (Fujifilm), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire, Flow Laboratories), kývačka Mini-Rocker Shaker MR-1(BioSan), membránová vývěva (Laboport KNF), mikroskop Nikon TMS (Nikon), minicentrifuga MPW1 (Fisher Scientific), průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC – MPL (Beckman Coulter), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), UV-Vis spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), vodní lázeň GFL 1032 (GFL[®]), vortex MS525-20 (Heidolph).

4.2 Chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie od firmy Sigma Aldrich, není-li uvedeno jinak: 3,8-diamino-5- [3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-fenylfenanthridiniumdijodid (propidiumjodid), Akrylamid, N,N'-metylenbisakrylamid, aprotinin, dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), tetraboritan sodný Na₂B₄O₇·10H₂O od firmy Chemapol, dithiothreitol (DTT), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄·12H₂O) od firmy Penta, kultivační médium Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI 1640), pyruvát sodný, 2-merkptoethanol od firmy Serva, ethanol 70%, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fetální sérum od firmy Invitrogen, kyselina chlorovodíková (HCl), glycerol, glycin, hovězí sérový albumin (BSA), chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl), laurylsíran sodný (SDS), Bromfenolová modř, kyselina fosforečná (H₃PO₄), leupeptin, nocodazol, penicilin, peroxidisíran amonný (APS), polyethylenglykolsorbitan monolaurát (Tween 20), proteinový detekční marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10 - 260 kDa) od firmy Thermo Scientific, Triton X-100, sodná sůl 3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfofenylazo]fenylazo)-2,7-naftalenedisulfonové kyseliny (PONCEAU S), streptomycin, tetramethylethylendiamin (TEMED), thymidin od společnosti

M.G.P., tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) od firmy MP Biomedicals; chemiluminiscenční SuperSignal West Femto od firmy Thermo Scientific, trypsin.

4.3 Roztoky

Při experimentální části bakalářské práce byly použity následující roztoky:

standardní kultivační medium RPMI 1640: médium Roswell Park Memorial Institute-1640, doplněném o 10% fetální hovězí sérum, penicilin (100 IU/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) a L-glutamin (0,3 mg/ml);

kultivační medium pro sérovou nedostatečnost: médium Roswell Park Memorial Institute-1640, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin;

300 mM thymidin: thymidin, voda;

nokodazol 50 µg/ml: nocodazol, voda;

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH=7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 (pH=7,4), 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin;

5x SDS vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS (pH=6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkptoethanol;

elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS;

činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% etanol, 85% kyselina fosforečná;

blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

blokovací roztok: 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Promývací roztoky pro metodu průtoková cytometrie: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100.

4.4 Protilátky

V experimentální části bakalářské práce byly použity myší monoklonální primární protilátky rozlišující proteiny cyklin E (ředění 1:500), cyklin B (ředění 1:500), PARP (ředění 1:20), PCNA (ředění 1:500) a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein Mcl-1 (ředění 1:250) od firmy Santa Cruz Biotechnology, myší monoklonální protilátku cyklin A (ředění 1:250) od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně. Následně byly použity sekundární protilátky k vizualizaci primárních protilátek. Sekundární protilátky značené křenuvou peroxidázou RAM/P_x (ředění 1:1000) a SWAR/P_x (ředění 1:1000) od firmy Sigma Aldrich.

4.5 Použitá buněčná linie

Pro dané experimenty byla zvolena adherentní prostatická buněčná linie C4-2 odvozená od kostní metastázy (Sigma Aldrich) (Pfitzenmaier a kol., 2003). Buňky linie C4-2 byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 doplněném o 10% fetální bovinní sérum, pyruvát sodný (1 mM), streptomycin (0,1 mg/ml), penicilin (100 U/ml) a L-glutamin (2 mM) a kultivace probíhala v atmosféře 5% CO₂ při teplotě 37 °C.

5 METODIKA

5.1 Kultivace, ovlivnění nádorové linie, sklizení a lyzace buněk

Buňky buněčné linie C4-2 určené pro experimenty byly nejdříve rozděleny do Petriho misek a ponechány 24 hodin adherovat v kompletním kultivačním médiu RPMI 1640. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Následně bylo médium vyměněno za médium určené pro synchronizaci (bez fetálního séra, s 3 mM thymidinem nebo danými koncentracemi nokodazolu 20 ng/ml, 40 ng/ml a 80 ng/ml, kde byly buňky ponechány po různé časové úseky.

Buňky určené pro analýzu na průtokovém cytometru byly sklizeny trypsinizací, přeneseny do zkumavek a centrifugovány 5 minut při 1000 rpm 4 °C a následně promyty PBS. Po následující centrifugaci byly získané pelety resuspendovány 100 µl filtrovaného PBS a za neustálého mírného vortexování k nim byl pomalu přidáván 1ml ledově vychlazeného 70% ethanolu pro zafixování buněk. Vzorky byly uchovávány při -20 °C do dne analýzy.

Buňky, které byly určeny pro následnou analýzu metodou western blotting byly seškrabány pomocí plastové škrabky ze dna kultivačních misek, přeneseny do zkumavek a centrifugovány po dobu 10 minut při 1000 rpm a teplotě 4 °C. Následně byl pelet promyt roztokem PBS a vzorky centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 rpm a 4 °C. Po odsátí supernatantu byly buněčné pelety uskladněny při -80 °C.

Pro lyzaci buněk byl použit lyzační pufr RIPA. K buňkám bylo přidáno potřebné množství lyzačního pufru (podle velikosti peletu), ve kterém byly Buňky 15 minut inkubovány a poté sonikovány ultrazvukovým homogenizátorem. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán a ve vzorcích byla změřena koncentrace proteinů spektrofotometrickou metodou Bradfordové (Bradford, 1976). Vzorky byly naředěny lyzačním pufrém na stejnou koncentraci, ke vzorkům byl přidán 5x SDS vzorkovací pufr a vzorky byly denaturovány 5 minut při 95 °C.

5.2 Elektroforéza SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce na membráně

Metoda SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) byla provedena v diskontinuálním uspořádání kombinujícím 10% polyakrylamidový dělicí gel s 5% polyakrylamidovým zaostřovacím gelem. Principem této metody je separace proteinů o různé molekulové hmotnosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Vzorky byly nanесeny do jamek zaostřovacího gelu, kde putovaly ve vertikálním uspořádání po dobu cca 30 minut při napětí 80 V. Jakmile vzorky pronikly do dělicího gelu, napětí bylo zvýšeno na 120 V.

Separované proteiny byly metodou western blotting z dělicího gelu přeneseny na nitrocelulozovou membránu. Přenos proteinů byl uskutečněn v blotovací aparatuře Mini Trans-Blot Cell od firmy Bio-Rad při procházejícím proudu 270 mA za neustálého chlazení ledovými bloky, po dobu 2 hodin. Nitrocelulozová membrána s přenesenými proteiny byla obarvena v roztoku PONCEAU S a rozřezána podle molekulových hmotností studovaných proteinů.

Membrány byly následně odbarveny v roztoku TBS a přeneseny do roztoku 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20, kde byly následně hodinu blokovány při laboratorní teplotě. Po zablokování byly membrány opláchnuty v TBS a inkubovány přes noc při 4 °C s primárními protilátkami. Po inkubaci byly promyty v roztocích TBS a TBS s Tween 20 a následně hodinu inkubovány s nanесenými sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byly membrány opět promyty roztoky TBS a TBS s Tween 20. Následná vizualizace proteinů byla provedena metodou chemiluminiscence za použití roztoku peroxid: luminol v poměru 1:1 a následného snímání CCD-kamerou.

5.3 Průtoková cytometrie

Buňky fixované 70% ethanolem byly centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 rpm a 4 °C. Pelety byly následně promyty 1 ml filtrovaného PBS a opět centrifugovány za stejných podmínek. Takto získané pelety byly resuspendovány v malém objemu 1% BSA/PBS a za mírného vortexování k suspenzi po kapkách přidáván 1 ml 2N HCl/Triton X-100 (0,5%). Inkubace probíhala při laboratorní teplotě s častým protřepáváním 30 minut. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány při

1000 rpm a 4 °C po dobu 8 minut a po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány, kvůli neutralizaci kyseliny, v 1 ml 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Následovala opětovná centrifugace za stejných podmínek, pelet byl resuspendován v 1 ml PBS s Tween 20. Po poslední centrifugaci byl supernatant odebrán, pelet resuspendován v 1 ml filtrovaného PBS, k suspenzi bylo přidáno 10 μl propidiumjodidu (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Propidium jodid se váže na molekuly DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm dochází k excitaci a následné emisi záření o vlnové délce větší než 560 nm, jejíž intenzita odpovídá množství DNA v buňce. Vzorky byly analyzovány s využitím průtokového cytometru Cell Lab Quanta a analyzovány softwary Quanta Collection a Quanta Analysis (firma Beckman Coulter).

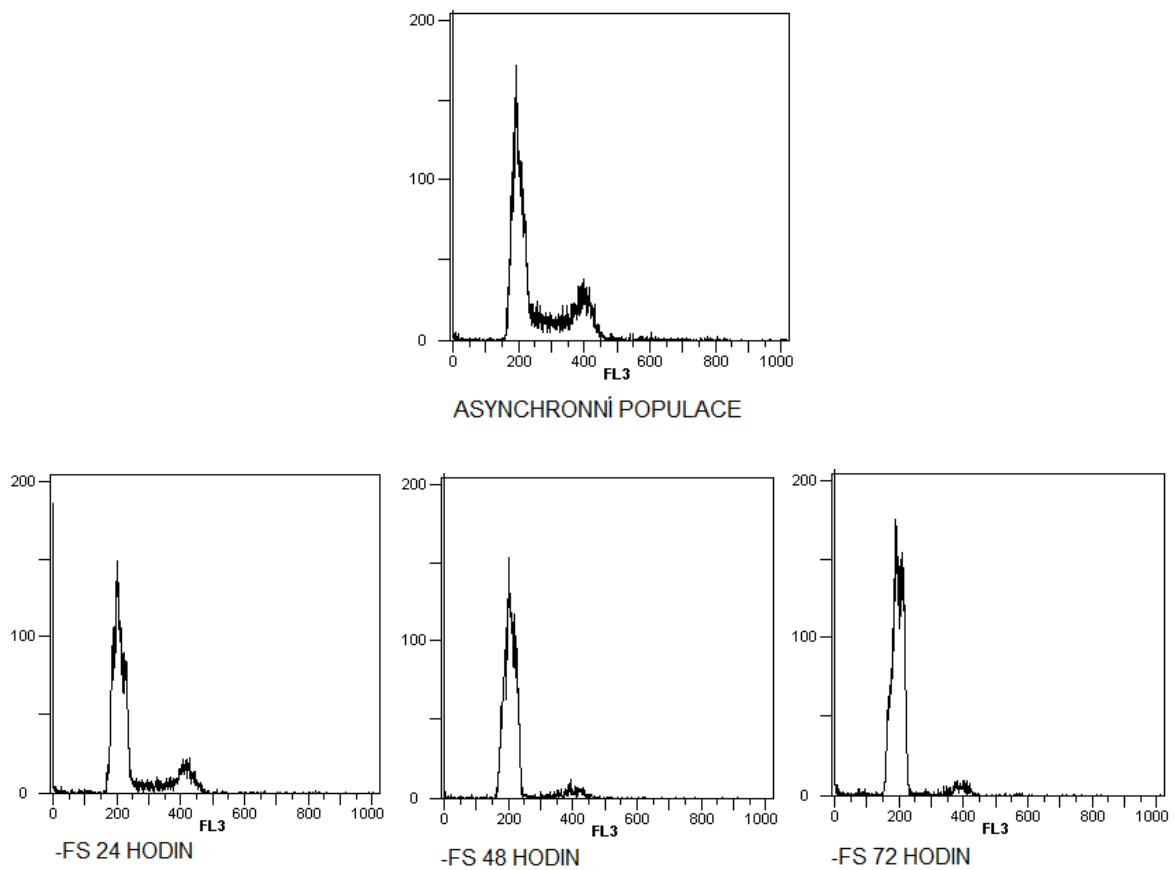
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Synchronizace prostatické linie C4-2 pomocí sérové nedostatečnosti

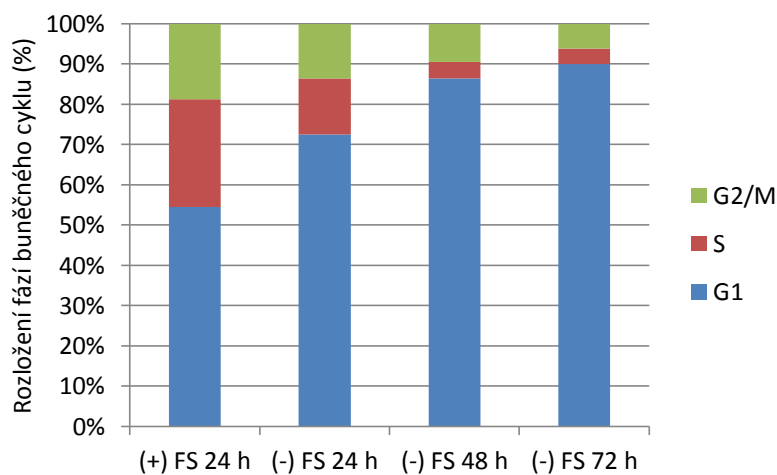
Pohyb buněk buněčným cyklem vyžaduje přítomnost exogenních růstových faktorů a nutričních látek, které jsou obsaženy ve fetálním séru. Fetálním sérem (5-10%) jsou tradičně obohaceny kultivační média pro kultivaci buněk *in vitro*. Princip metody synchronizace pomocí sérové nedostatečnosti spočívá v odebrání tohoto fetálního séra z kultivačního média. Pokles hladiny růstových faktorů a nutrietů brání buňkám v růstu a zastavuje je na počátku buněčného cyklu v G₁ fázi (Davis a kol., 2001).

Experiment byl proveden za cílem ověření synchronizace buněk v G₁ fázi po odejmutí fetálního séra. Buňky prostatické buněčné linie C4-2 byly ponechány v kultivačním mediu pro sérovou nedostatečnost po dobu 24, 48 a 72 hodin a následně byly u buněk analyzovány relativní změny obsahu DNA průtokovou cytometrií.

Z dosažených výsledků vyplývá, že s rostoucím časem docházelo k nárůstu počtu buněk v G₁ fázi, což je patrné ze samotných cytometrických výstupů (obr. 2). Toto tvrzení bylo ověřeno následnou analýzou cytometrických dat pomocí počítačového programu Multicycle AV for Windows (Phoenix Flow Systems), s jehož využitím bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (obr. 3).



Obr. 2 Analýza buněčného cyklu buněk C4-2 synchronizovaných metodou sérové deprivace. Asynchronní populace buněk kultivovaných v médiu za přítomnosti fetálního séra a buňky inkubované v médiu bez fetálního séra po dobu 24, 48 hodin a 72 hodin.



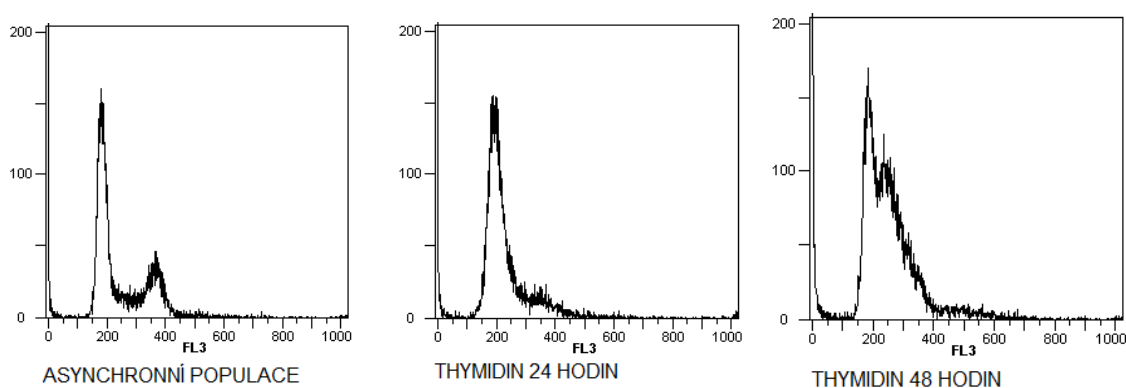
Obr. 3 Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu buněk inkubovaných v médiu bez fetálního séra po dobu 24, 48 a 72 hodin v porovnání s kontrolní asynchronní populací.

6.2 Synchronizace prostatické linie C4-2 thymidinem

Metoda synchronizace thymidinem je založena na obohacení kultivačního média o thymidin, který ovlivňuje metabolismus deoxyribonukleotidů, čímž inhibuje replikaci DNA a zastavuje cyklus v časně S fázi buněčného cyklu (Uzbekov, 2004).

Standardní kultivační médium bylo u tohoto experimentu obohaceno o 3 mM thymidin. Buňky linie C4-2 byly v takto upraveném médiu inkubovány po dobu 24 a 48 hodin. Následná analýza probíhala metodou průtokové cytometrie.

Experiment jednoznačně potvrdil, že buňky ošetřené thymidinem byly blokovány v G_1/S fázi již po 24 hodinách inkubace, což dokazují vytvořené histogramy (obr. 4).



Obr. 4 Analýza buněčného cyklu buněk C4-2 synchronizovaných thymidinem.

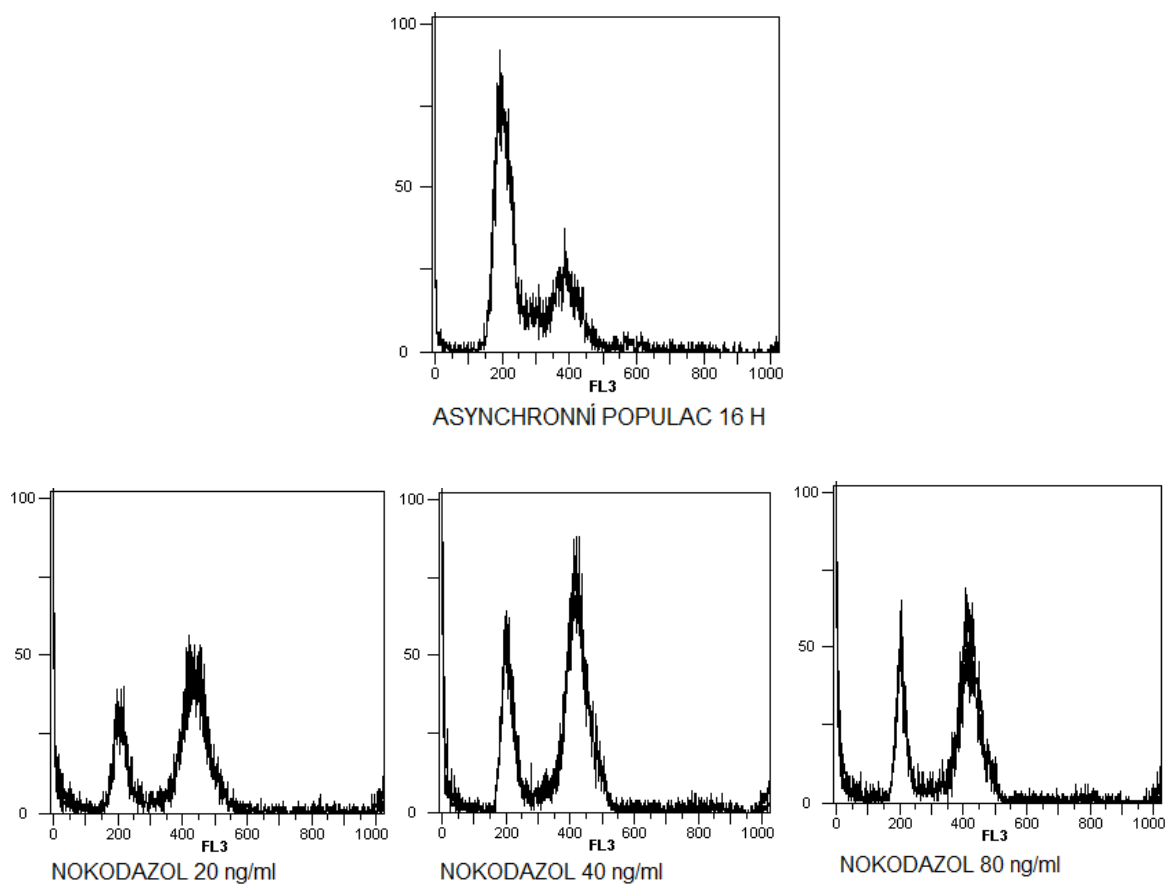
6.3 Synchronizace prostatické linie C4-2 nokodazolem

Nokodazol je známý jako mikrotubulární jed. Buňky ovlivněné touto látkou jsou blokovány v G_2/M fázi buněčného cyklu z důvodu depolymerizace mikrotubulů, čímž je zabráněno vzniku mitotického vřeténka (Urbani a kol., 1995)

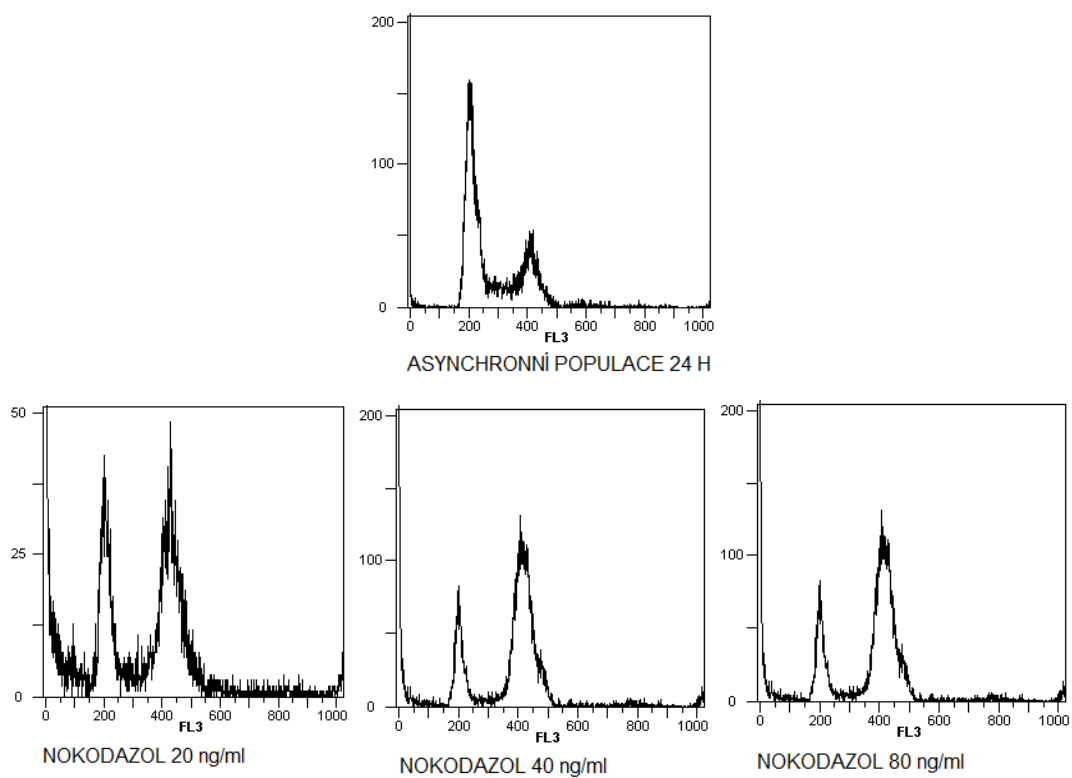
Buňky linie C4-2, kultivované 24 hodin v kompletním kultivačním médiu, byly ovlivněny nokodazolem o koncentraci 20, 40 a 80 ng/ml po dobu 16 a 24 hodin. Poté proběhla opět analýza průtokovou cytometrií.

Výsledky z analýzy buněčného cyklu dokazují, že po ovlivnění buněk linie C4-2 nokodazolem dochází k nárůstu počtu buněk v G_2/M fázi. Avšak jak je z histogramů a grafů procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu jasně patrné (obr. 5 - 8), tato synchronizace není zcela úplná. I při použití vyšších

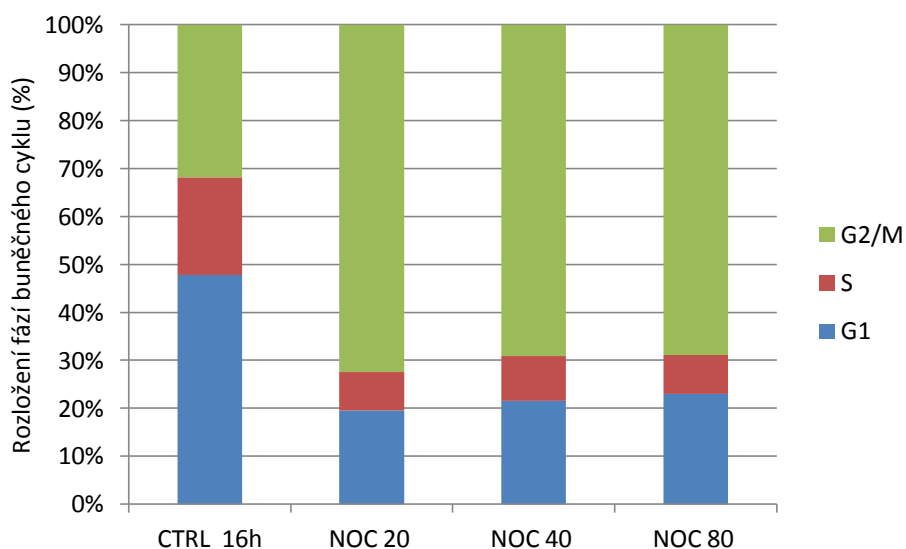
koncentrací nokodazolu a delšího času působení, velké množství buněk stále zůstává v ostatních fázích buněčného cyklu, tedy G_1 a S. Také zvyšující se počet buněk v sub- G_1 fázi může být následkem vedlejšího toxického působení nokodazolu na C4-2 buňky.



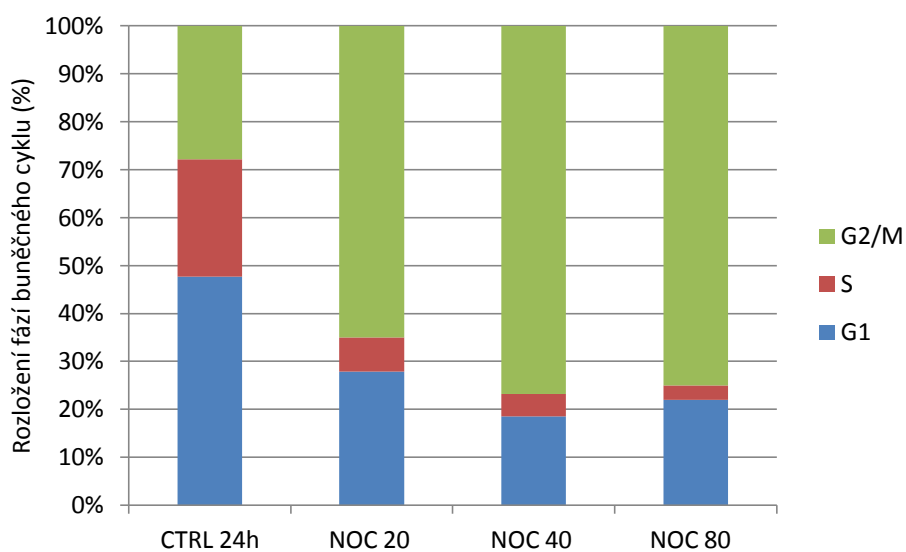
Obr. 5 Analýza buněčného cyklu asynchronní populace buněk C4-2 a buněk kultivovaných 16 hodin v přítomnosti různých koncentrací nokodazolu.



Obr. 6 Analýza buněčného cyklu asynchronní populace buněk C4-2 a buněk kultivovaných 24 hodin v přítomnosti různých koncentrací nokodazolu.



Obr. 7 Graf znázorňující procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu C4-2 buněk ovlivněných po dobu 16 hodin různými koncentracemi nokodazolu (20 ng/ml, 40 ng/ml a 80 ng/ml).



Obr. 8 Graf procentuálního zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu C4-2 buněk ovlivněných po dobu 24 hodin různými koncentracemi nokodazolu (20 ng/ml, 40 ng/ml a 80 ng/ml).

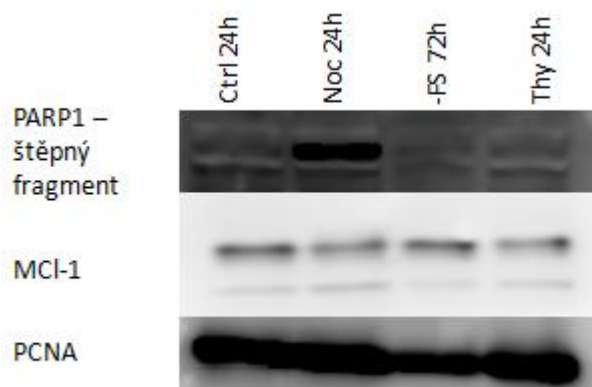
6.4 Studium exprese proteinových markerů apoptózy

Hlavním cílem působení synchronizačních činidel je dosažení zablokování buněčného cyklu, aniž by toxicky působily na ovlivňované buňky. Z tohoto důvodu jsme analyzovali buňky kultivované bez fetálního séra, v přítomnosti nokodazolu a thymidinu pomocí western blottingu. Především jsme se zaměřili na analýzu exprese vybraných apoptotických markerů. Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt je mechanismus, který se vyznačuje výraznými morfologickými a

biochemickými změnami. Tento proces slouží k eliminaci buněk, které jsou nevratně poškozeny, nebo jsou již v organismu nepotřebné. Při apoptóze hrají nejvýznamnější roli enzymy cysteinové proteázy tzv. kaspázy, které štěpí jiné proteiny v proteolytické kaskádě (Alberts a kol., 2001; Tang a Porter, 1996). Pro tento experiment byl zvolen štěpný fragment proteinu PARP-1 (Poly(ADP-ribose)polymerase), který je substrátem kaspázy 3, hlavního proteolytického enzymu v apoptotické kaskádě (Gobeil a kol., 2001) a dále antiapoptotický protein Mcl-1.

Byl sledován výrazný nárůst hladiny štěpného fragmentu proteinu PARP-1 (obr. 9) po ovlivnění nokodazolem, z čehož lze usuzovat, že má na buňky prostatické linie C4-2 toxický vliv. Dané výsledky korelují s cytometrickou analýzou, jelikož jak bylo již zmíněno výše, po ovlivnění buněk nokodazolem docházelo k nárůstu populace v sub-G₁ a výsledek se tedy nezávisle ověřil metodou western blotting.

Pro dosažení G₂/M blokády se nokodazol prokázal jako nevhodné činidlo, a to díky svým toxickým vlastnostem na buňky linie C4-2. Z již zmíněných metod (viz. teoretická část) lze využít celou řadu činidel pro synchronizaci buněk v G₂/M fázi, avšak pro citlivou prostatickou linii C4-2 by možná bylo vhodnější využít některou z fyzikálních metod například setřepávání mitotických buněk či centrifugální elutriaci.



Obr. 9 Hladina exprese proteinů u buněk linie C4-2, které byly ovlivněny synchronizačními metodami, konkrétně nokodazolem 40 ng/ml 24 hodin, médiem bez fetálního séra 72 hodin a 3 mM thymidinem 24 hodin. Pro ověření rovnoměrného nanesení proteinových vzorků byla analýza doplněna detekcí PCNA.

6.5 Synchronizace buněčné linie C4-2 a následné uvolnění z navozeného bloku buněčného cyklu

Pro tyto experimenty byly použity pouze přístupy synchronizace sérovou nedostatečností a thymidinem, jelikož indukce G₂/M bloku nokodazolem nebyla dostatečná a nokodazol, jak bylo dokázáno, působil na buňky linie C4-2 toxicky.

Buňky linie C4-2 byly úspěšně zablokovány v G₁ fázi metodou sérové nedostatečnosti, avšak po výměně média za kompletní médium s fetálním sérem nedošlo k opětovnému vstupu buněk do buněčného cyklu. Jak je zřejmé z výstupů provedené cytometrické analýzy (obr. 10), s rostoucím časem nebyl pozorován synchronizovaný vstup buněk do následujících fází buněčného cyklu. Proto by mělo být pro synchronizaci buněčné linie C4-2 v G₁ fázi zváženo využití některého z alternativních přístupů. Studie příbuzné prostatické linie LNCaP například popisují postup zahrnující metodu synchronizace buněk isoleucinovou deprivací, která reverzibilně blokuje buňky v G₁ fázi cyklu, aniž by ovlivňovala jejich životaschopnost (Cifuentes a kol., 2003).

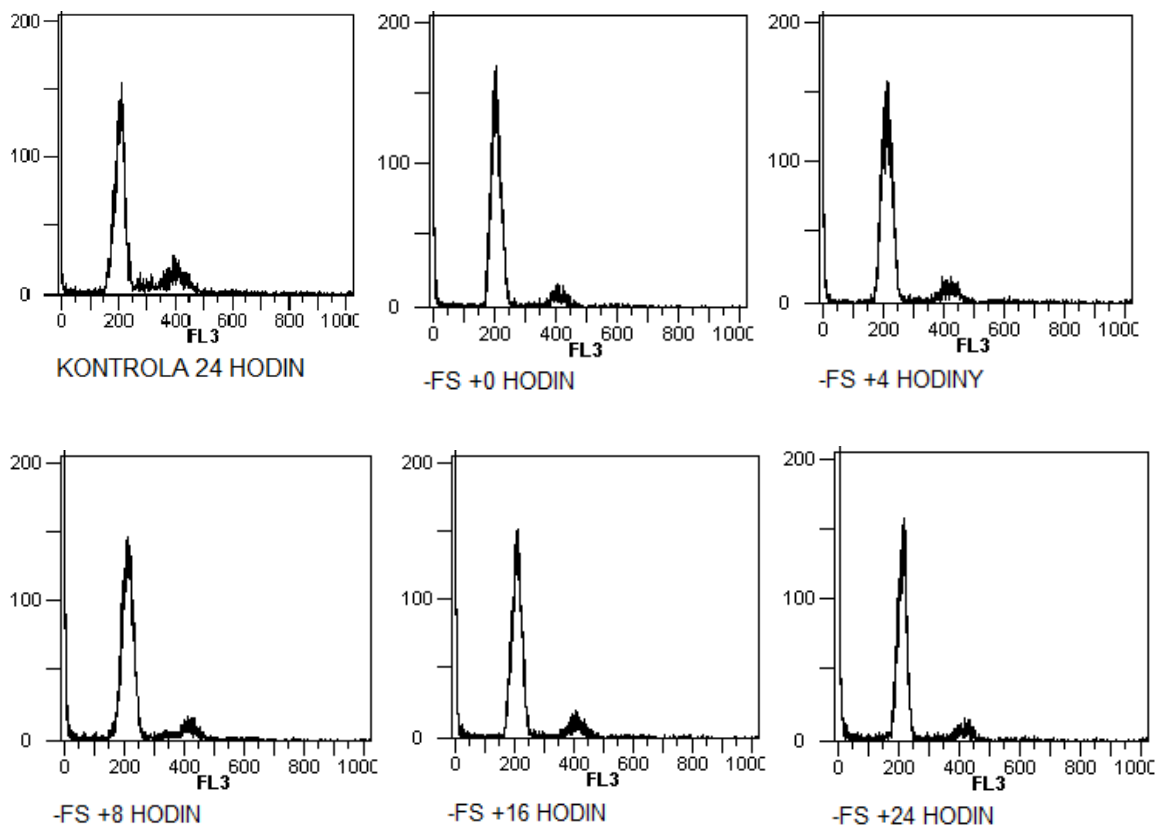
Přítomnost thymidinu v kultivačním médiu po dobu 24 hodin úspěšně zablokovala buněčný cyklus. Následná výměna média za standardní kompletní kultivační médium, měla za následek uvolnění buněk z navozeného bloku. Buňky s rostoucím časem synchronizovaně vstupovaly do dalších fází cyklu (obr. 11), nejdříve do S fáze a následně do G₂/M a dále.

Pro potvrzení úspěšné synchronizace thymidinem a následného uvolnění z bloku byla provedena analýza exprese hladiny cyklinů metodou western blotting (obr. 12). Byly vybrány cykliny nepostradatelné pro jednotlivé fáze buněčného cyklu. Cyklin typu A je nezbytný pro S fázi buněčného cyklu, během které se syntetizuje. Nejvyšší hladiny dosahuje v S/G₂ fázi, kdy v průběhu G₂ je degradován proteolýzou (Malumbres a Barbacid, 2005).

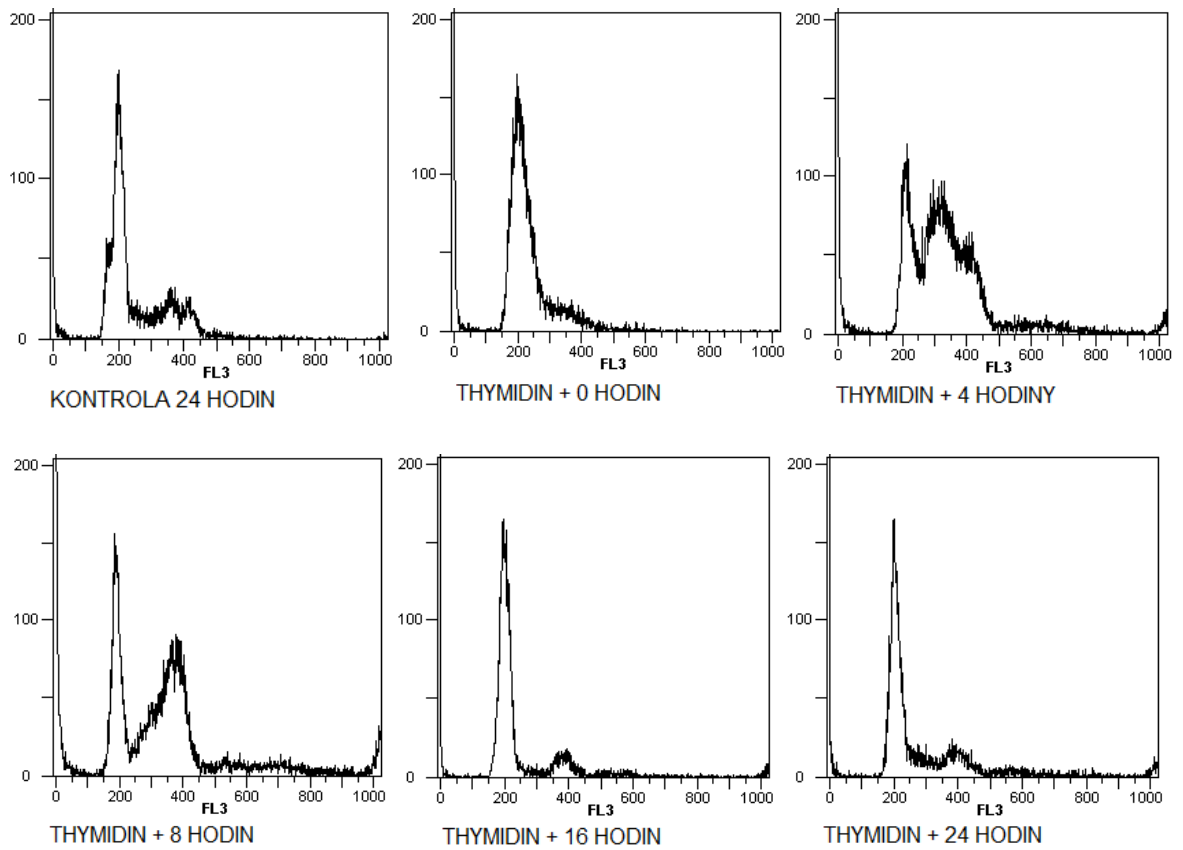
Výsledky potvrdily předchozí tvrzení týkající se synchronizace thymidinem a následného uvolnění buněk z tohoto bloku. Na obr. 12 je zřetelná zvýšená exprese cyklinu A již po 4 hodinách od odejmutí thymidinu z kultivačního média, tudíž buňky postupovaly do pozdní S fáze a poté do S/G₂ fáze.

Synchronizace prostatické linie C4-2 thymidinem se jeví jako ideální. Thymidin buňky zablokuje v požadované fázi, po jeho odmytí se blok uvolní a buňky

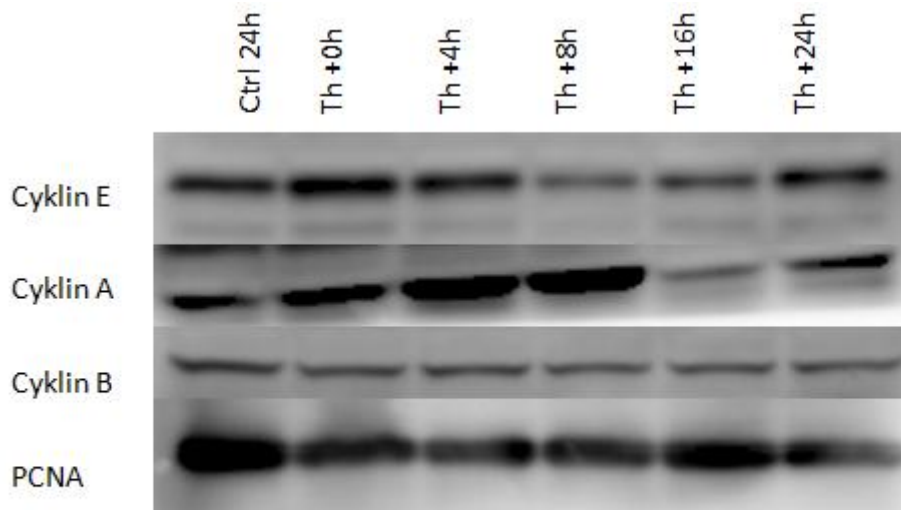
synchronizovaně postupují buněčným cyklem. Navíc, jak bylo prokázáno analýzou exprese apoptotických markerů, synchronizace thymidinem neovlivňuje viabilitu buněk C4-2.



Obr. 10 Analýza buněčného cyklu buněk C4-2 během procesu uvolňování z bloku v G₁ fázi. Buňky byly synchronizovány sérovou deprivací a následně kultivovány různou dobu v přítomnosti fetálního séra. Asynchronní populace je zde uvedena jako kontrola.



Obr. 11 Analýza buněčného cyklu buněk C4-2 při procesu uvolňování z thymidinového bloku. Buňky byly inkubovány 24 hodin s 3 mM thymidinem a následně kultivovány různou dobu v kompletním kultivačním médiu. Asynchronní populace je zde uvedena jako kontrola.



Obr. 12 Hladiny jednotlivých proteinů při procesu uvolňování z bloku v S fázi po 24 hodinovém vystavení buněk thymidinu. Pro ověření rovnoměrného nanesení proteinových vzorků byla analýza doplněna detekcí PCNA.

7 ZÁVĚR

Použitím několika nezávislých metod byly sledovány biologické účinky tří vybraných postupů pro synchronizaci buněčného cyklu u prostatické buněčné linie C4-2.

Z výsledků experimentů vyplývá, že ze zvolených synchronizačních metod byla pro studovanou buněčnou linii C4-2 nejvhodnější metoda thymidinového bloku zadržující buňky v G_1/S fázi buněčného cyklu. Thymidin u buněk C4-2 úspěšně indukoval blok buněčného cyklu a po jeho odstranění z kultivačního média buňky synchronizovaně vstupovaly do dalších fází cyklu. Z analýzy apoptotických markerů a z absence sub-G1 populace při cytometrické analýze navíc vyplývá, že synchronizace buněk C4-2 thymidinem neovlivňuje jejich viabilitu.

Další použitou metodou byla synchronizace sérovou deprivací. Ta sice zadržela buňky v požadované fázi (G_1 fázi), avšak po dodání kompletního kultivačního média buňky nebyly schopny synchronního postupu buněčným cyklem a tato metoda se tedy prokázala jako nevyhovující. Poslední testovanou metodou byla synchronizace buněčného cyklu nokodazolem. Ovlivnění buněk C4-2 touto synchronizační látkou sice indukovalo nárůst populace buněk v G_2/M fázi, avšak synchronizace populace nebyla úplná a velké procento buněk stále zůstávalo i v ostatních fázích cyklu. Navíc nokodazol u buněk C4-2 indukoval apoptózu a tudíž není pro účely synchronizace buněčného cyklu této linie vhodný.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2001) *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing. 549-567.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248 – 254.
- Carnero A., Hannon G. J. (1998) The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227, 43-55.
- Cifuentes E., Croxen R., Menon M., Barrack E. R., Reddy G. P. (2003) Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase. *J Cell Physiol.* 195(3): 337-345.
- Cooper S. (2003) Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. *Cell Mol Life Sci.* 60(6): 1099–1106.
- Davis P. K., Ho A., Dowdy S. F. (2001) Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques.* 30(6): 1322-6, 1328, 1330-1.
- Gobeil S., Boucher C. C., Nadeau D., Poirier G. G. (2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* 8(6): 588-594.
- Heinemann L., Simpson R. G., Annels E. N., Vile R., Melcher A., Prestwich R., Harrington J. K., Pandha S. H. (2010) The Effect of Cell Cycle Synchronization on Tumor Sensitivity to Reovirus Oncolysis. *Mol Ther.* 18(12): 2085–2093.
- Hiramoto K., Narahara K., Kimoto H. (1990) Synchronization culture of amniotic fluid cells using excess thymidine block followed by deoxycytidine release and its application to high-resolution banding analysis of chromosomes. *Jinrui Idengaku Zasshi.* 35: 195-206.
- Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature.* 376: 313-320.

- Johnson N., Shapiro G. (2012) Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. *Expert Opin. Ther. Tar.* (14): 1199-1212.
- Kaufmann W. K., Paules R. S., (1996) DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* 10(2): 238-247.
- Keyomarsi K., Sandoval L., Band M., Pardee B. A. (1991) Synchronization of Tumor and Normal Cells from G₁ to Multiple Cell Cycles by Lovastatin. *Cancer Res.* 51: 3602-3609.
- Kovář J., (2003) Buněčná proliferace a mechanismy její regulace I. 2. vyd. Praha: Karolinum. 28-36.
- Krude T. (1999) Mimosine Arrests Proliferating Human Cells before Onset of DNA Replication in a Dose-Dependent Manner. *Exp. Cell Res.* 247: 148-159.
- Kurose A., Tanaka T., Huang X., Traganos F., Dai W., Darzynkiewicz Z. (2006) Effects of Hydroxyurea and Aphidicolin on Phosphorylation of Ataxia Telangiectasia Mutated on Ser 1981 and Histone H2AX on Ser 139 in Relation to Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Cytometry A.* 69(4): 212-221.
- Laskey R. A., Fairman M. P., Blow J. J. (1989) S phase of the cell cycle. *Science.* 246: 609-614.
- Lim, S., Kaldis, P. (2013): Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 140(15): 3079-3093.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 30(11): 630-641.
- Mitnacht S., Weinberg R. A. (1991) G₁ /S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell.* 65:381-393.
- Nakayama M., Kaida A., Deguchi S., Sakaguchi K., Miura M. (2011) Radiosensitivity of early and late M-phase HeLa cells isolated by

a combination of fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) and mitotic shake-off. *Radiat Res.* 176: 407-411.

Nečas O. (2000) *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., v nakl. H & H 1. vyd. Jinočany. 265-276.

Otová B., Kohoutová M., Panczak A. (2008) *Lékařská biologie a genetika*. 1. vyd. Praha: Karolinum, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. 51-57.

Paulovich A. G., Hartwell L. H. (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell.* 82, 841-847.

Pedrali-Noy G., Spadari S., Miller-Faures A., Miller A. O. A., Kruppat J., Koch G. (1980) Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase α with aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* 8(2):377-387.

Pfizenmaier J., Quinn J. E., Odman A. M., Zhang J. A., Keller E. T., Vessella R. L., Corey E. (2003) Characterization of C4-2 Prostate Cancer Bone Metastases and Their Response to Castration. *J. Bone Miner. Res.* 18: 1882-1888.

Prager-Khoutorsky M., Goncharov I., Rabinkov A., Mirelman D., Geiger B., Bershadsky A. D. (2007) Allicin inhibits cell polarization, migration and division via its direct effect on microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64: 321-337.

Rieder C. L., and Cole R. (2000) Microtubule disassembly delays the G2-M transition in vertebrates. *Curr. Biol.* 10: 1067-1070.

Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K. C., Gorbunova V. (2009) Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 19352-19357.

Sherr C. J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 73: 1059-1065.

Sherr C. J., Roberts M. J. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13(12): 1501-1512.

- Schorl C. and Sedivy J. M. (2007) Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods*. 41(2):143-50.
- Sládek Z. (2007) Buněčná biologie. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 83-86.
- Surjit M., Liu B., Chow V. T., Lal S. K. (2006) The Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus Inhibits the Activity of Cyclin-Cyclin-dependent Kinase Complex and Blocks S Phase Progression in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 281(16): 10669-10681.
- Tang D. G., Porter A. T. (1996) Apoptosis: A Current Molecular Analysis. *Pathol Oncol Res*. 2(3): 117-131.
- Urbani L., Sherwood W. S., Schimke T. R. (1995) Dissociation of Nuclear and Cytoplasmic Cell Cycle Progression by Drugs Employed in Cell Synchronization. *Exp. Cell Res*. 219: 168-169.
- Uzbekov E. R. (2004) Analysis of the Cell Cycle and a Method Employing Synchronized Cells for Study of Protein Expression at Various Stages of the Cell Cycle. *Biochemistry (Mosc)*. 69(5): 485-496.
- Uzbekov E. R., Prigent C., Arlot-Bonnemains Y. (1999) Cell cycle analysis and synchronization of the *Xenopus laevis* XL2 cell line: study of the kinesin related protein XIEg5. *Microsc Res Tech*. 45(1): 21-42.
- Vermeulen K., Bockstaele van R. D., Berneman N. Z. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 36:131-149.

9 SEZNAM ZKRATEK

ALLN	N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal
APH	Aphidicolin
BSA	Bovine serum albumin
CAK	CDK-activating kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDP	Cytidindiphosphat
Cip/Kip	CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
dCDP	Deoxycytidine diphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DTP	Doxycytidine triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HU	Hydroxyurea
IL-2	Interleukin 2
INK4	Inhibitors of CDK4
LOV	Lovastatin
Mcl-1	Myeloid-cell leukemia 1
MTX	Methotrexate
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid

RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	Tumor growing factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTP	Thymidintriphosphate