

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Bc. Radek Měch

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**VLIV ZMĚN V ENERGETICKÉM METABOLISMU
BUŇKY NA STABILITU GENOMU**

Diplomová práce

Radek Měch

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Vedoucí práce: Mgr. Martin Mistrík Ph.D.

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, za podpory školitele Mgr. Martina Mistríka Ph.D. a s použitím literatury citované v závěru.

V Olomouci 7 května 2010

.....

Souhrn

Zvýšená genetická nestabilita rakovinných buněk je často spojována s replikačním stresem. Replikační stres může být způsoben mnoha vnějšími a vnitřními faktory provázejících nádorovou transformaci. Předkládaná diplomová práce je zaměřena na případnou spojitost replikačního stresu a zásadní změnou metabolismu glukózy provázející většinu rakovinných transformací. Jedná se o přechod oxidativní fosforylace k aerobní glykolýze. Předpoklad, že energeticky náročný proces replikace DNA může být přechodem na glykolýzu negativně ovlivněn, nebyl dosud detailně studován. Zpomalení replikace, například látkami přímo interferujícími s DNA polymerázami, vede ke genetické nestabilitě projevující se například mitotickou fragilitou a expresí fragilních míst. Pokles hladiny ATP, v důsledku poškození systémů oxidativní fosforylace, by mohl u netransformovaných buněk interferovat s probíhající replikací, způsobovat podobný efekt a významně se tak podílet na vzniku a progresi nádorové transformace. Tato hypotéza byla testována kvantifikací genetické nestability u vybrané primární lidské buněčné linie MRC-5, ve které byl chemicky narušen proces oxidativní fosforylace. Inhibicí systémů oxidativní fosforylace chemickými inhibitory, byla skutečně indukována mitotická fragilita a v některých případech i poškození DNA interfázních buněk. Mitotická fragilita ani poškození DNA v interfázi není pravděpodobně způsobeno oxidativním stresem, jak prokázala analýza 8-oxoguaninu, markeru oxidativního stresu. Naopak indukovaná dysfunkce mitochondrií vedla ke snížení produkce této oxidované formy jednoho z hlavních nukleotidů. Inhibice oxidativní fosforylace navíc způsobuje i pokles replikace, jak prokázala analýza buněčného cyklu u synchronizovaných buněk.

Summary

The enhanced genetic instability of cancer cells is often linked to replication stress. Many exogenous and endogenous factors involved in cancer transformation can cause replication stress. This diploma thesis is focused on possible connection between replication stress and crucial change in glucose metabolism accompanying most of cancer transformations. The change is based on a switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis. The hypothesis that energy demanding process of replication DNA can be negatively affected by glycolytic switch was not studied in the details yet. Generally retardation of replication, for example by chemicals which can directly interfere with DNA polymerases, leads to genetic instability such as mitotic fragility and expression of common fragile sites. Similarly the decrease in ATP level in non transformed cells as a consequence of a failure of oxidative phosphorylation systems might interfere with ongoing replication and cause similar effects participating to origin and progression of tumor transformation. This hypothesis was tested by quantification of genetic instability in chosen primary cell line MRC-5 in which process of oxidative phosphorylation was chemically disrupted. Indeed, inhibition of oxidative phosphorylation systems by chemical inhibitors was cause mitotic fragility and in some cases also DNA damage in interphase cells. Neither mitotic fragility nor DNA damage induced in interphase cells resulted from oxidative stress which might be proposed in case of mitochondria dysfunction as confirmed by analysis of 8-oxoguanin, marker of oxidative stress. In contrary, inhibition of oxidative phosphorylation decreased the level of this oxidized nucleotides. In addition, inhibition of oxidative phosphorylation caused also decrease in S phase progression as shown on FACS analysis on synchronized cells.

Poděkování:

Děkuji Mgr. Martinu Mistríkovi Ph.D. za profesionální vedení diplomové práce, cenné rady a metodické i teoretické připomínky. Dále bych chtěl poděkovat kolegyni Bc. Evě Veselé a technické pracovníci Haně Tkadlecové z Laboratoře genomové integrity za pomoc při realizaci experimentů.

1	Úvod	9
2	Biologie nádoru	11
2.1	Charakteristické znaky tumorigeneze	11
2.2	Nádorový metabolismus	12
2.2.1	Vliv hypoxie a HIF1 na metabolismus nádorových buněk	13
2.3	Buněčná odpověď na poškození DNA a replikační stres.....	14
2.3.1	Odpověď buňky na poškození DNA	14
2.3.2	Funkce ATM a ATR kináz v buněčné odpovědi na poškození DNA	16
2.3.3	Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů a oxidativní stres.....	17
2.3.4	Replikační stres	18
2.3.3.1	ATR signální dráha	20
2.3.3.2	Expresse běžných fragilních míst	20
2.4	Chemikálie ovlivňující buněčný metabolismus	24
2.4.1	Rotenon.....	24
2.4.2	Malonát.....	25
2.4.3	Antimycin A	25
2.4.4	Oligomycin A	26
2.4.5	Aphidicolin	27
2.4.6	Doxorubicin	28
2.4.7	N6-isopentenyladenosin	29
3	Cíl práce	31
4	Materiál a metody	32
4.1	Použité chemikálie	32
4.2	Biologický materiál.....	33
4.3	Použité metody.....	33
4.3.1	Měření hladiny intracelulárního ATP CellTiter-Glo [®] kitem.....	33
4.3.2	Imunofluorescenční detekce	34
4.3.3	Western blotting	34
4.3.4	Průtoková cytometrie.....	35
4.3.5	Mitotický spreading buněk s neporušeným γ -H2AX epitopem	36
4.4	Použité přístroje	40
5	Výsledky	41

5.1	Rotenon, Antimycin A a Oligomycin A snižují množství intracelulárního ATP u buněčné linie MRC-5 <i>in vitro</i>	41
5.2	Vybrané chemické inhibitory OXPHOS indukují zvýšenou mitotickou fragilitu u primární buněčné linie MRC-5 <i>in vitro</i>	43
5.3	Analýza markerů DNA poškození způsobeného inhibicí OXPHOS u primární linie MRC-5 <i>in vitro</i>	46
5.4	Inhibice OXPHOS vybranými chemickými inhibitory neindukuje nárůst produkce 8-oxoguaninu v jaderné DNA	47
5.5	Vybrané chemické inhibitory OXPHOS způsobují zpomalení S fáze.....	50
6	Diskuse	52
7	Závěr	56
8	Seznam použité literatury	57
9	Seznam použitých zkratek.....	64

1 Úvod

Mitochondrie je semiautonomní organela eukaryotních buněk, hrající velmi důležitou roli v energetickém metabolismu buňky, při stárnutí buňky spojeném s produkcí volných kyslíkových radikálů a v procesu apoptózy. Mitochondrie jsou označovány jako buněčné elektrárny, zodpovědné za produkci většiny buněčného adenosintrifosfátu (ATP) v buňce. Tvorba ATP je z velké části zprostředkována buněčnou respirací za přítomnosti kyslíku, oxidací redukovaných koenzymů vznikajících při procesu glykolýzy v cytoplasmě. U rakovinných buněk dochází k významné změně v buněčném metabolismu, spojené s inhibicí mitochondriální respirace a přechodem na glykolýzu, která se tak stává hlavní metabolickou drahou pro produkci energie ve formě ATP.

V první polovině dvacátého století, Otto Warburg ve své původní práci popsal změny buněčné respirace ve spojení s rakovinou a potenciální mechanismus, vysvětlující, jakým způsobem k těmto změnám v průběhu karcinogeneze dochází (Gogvadze et al., 2008). Defekt buněčné respirace v průběhu karcinogeneze, vede u nádorových buněk k přesunu tvorby energie na méně efektivní glykolýzu, respektive nádorové buňky využívají k tvorbě ATP převážně glykolýzu. Tento metabolický zvrát je významně ovlivněn změnou exprese důležitých onkogenů a tumor supresorů regulujících buněčnou proliferaci (Denko, 2008). Glykolýza (metabolismus sacharidů), metabolismus mastných kyselin a autofagie jsou dráhy hrající rozhodující roli v nádorovém metabolismu (Deberardinis et al., 2008). Ačkoliv je metabolický zvrát, označovaný jako aerobní glykolýza, důležitým znakem nádorové buňky, jeho přímý vztah s nádorovou progresí nebyl dosud plně objasněn. Charakteristickým znakem nádorových buněk je především nestabilita genomu. Zvýšená nestabilita genomu vyplývá z genetických změn, ztráty tumor supresorů, aktivace protoonkogenů, které nádorová buňka kumuluje, a je také často spojována s replikačním stresem. Mutované formy těchto genů poskytují nádorovým buňkám selekční výhodu pro přežití a progresi nádoru.

Nádory vznikají původně jako nevascularizovaná hmota se špatným zásobením živin a kyslíku. Tyto nevýhodné podmínky způsobují v tkáni nádoru vznik centrální hypoxie. Vlivem hypoxie dochází k expresi HIF1 α transkripčního faktoru (hypoxia induced factor 1 α), který se výrazně podílí na nádorové angiogenezi (proces novotvorby krevních kapilár) a je také přímým regulátorem buněčného metabolismu (Lee et al., 2007).

HIF1 α je jedním z hlavních regulátorů metabolismu cukrů procesem glykolýzy u nádorových buněk, pozitivně regulující expresi většiny genů s glykolýzou souvisejících.

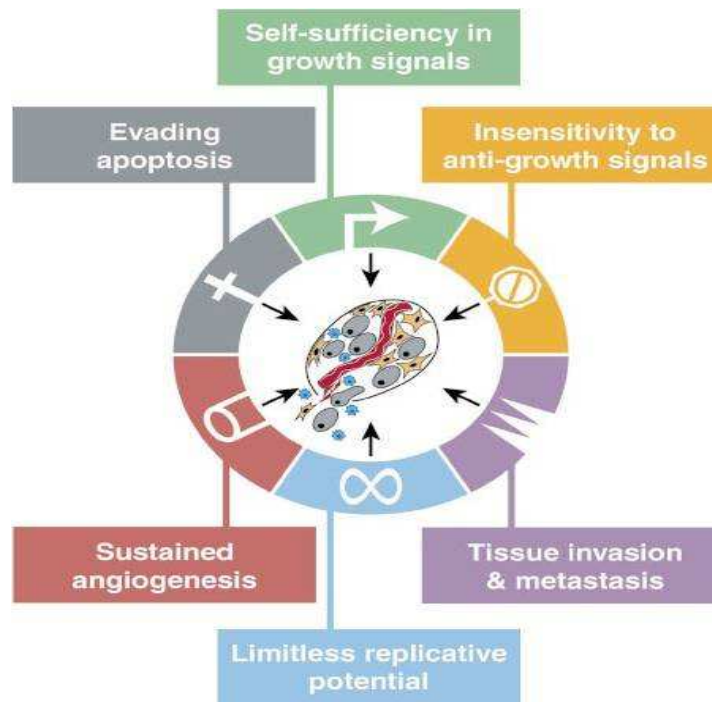
Tato diplomová práce je zaměřena na případnou souvislost defektu v buněčném metabolismu a vzniku genetické nestability. Replikace DNA je energeticky velmi náročný proces. U netransformovaných buněk by pokles hladiny ATP mohl v důsledku poškození systémů oxidativní fosforylace interferovat s probíhající replikací a způsobovat tak efekt, významně se podílející na vzniku a progresi nádorové transformace.

2 Biologie nádoru

2.1 Charakteristické znaky tumorigeneze

Genomy všech žijících organismů jsou neustále poškozovány řadou endogenních či exogenních faktorů. Toto působení je označováno jako genotoxický stres (GS). Nejběžnějším exogenním GS je UV záření. V rámci endogenních faktorů dominují produkce ROS, spontánní tvorba zlomů DNA během VDJ (Variable, Diversity, Joining genes) rekombinace při imunitní odpovědi (Jackson and Jeggo, 1995; Jeggo et al., 1995) a meziprodukty vzniklé při replikaci DNA, jako jsou zpomalené či poškozené replikační vidličky (Wyman and Kanaar, 2006). Tyto faktory přímo či nepřímo způsobují poškození DNA a vedou k indukci tzv. genetické nestability, která je charakterizována akumulací mutací a má za následek vznik rakoviny, stárnutí buněk a různá degenerativní onemocnění (Kastan and Bartek, 2004).

V průběhu tumorigeneze (vznik nádoru) dále dochází k několika významným změnám, které zajišťují transformovaným buňkám selekční výhodu. Tyto změny umožňují například soběstačnost v růstovém signalingu, buňky neodpovídají na signály, indukující zastavení růstu, na signály indukující programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Replikační potenciál transformovaných buněk je neomezený, pronikají do okolních tkání, metastazují, a indukují tvorbu vlastního cévního zásobení procesem nádorové angiogeneze (Hanahan and Weinberg, 2000) (Obrázek 1). Další významnou alterací v průběhu nádorové transformace je zvrát v buněčném metabolismu. Buňky potřebují pro svou proliferaci dostatečné množství energie ve formě ATP, rychlou syntézu nukleotidů, lipidů a proteinů. U zdravých buněk je většina ATP produkována v mitochondriích oxidativní fosforylací. U buněk nádorových je však tvorba energie zabezpečena méně efektivní glykolýzou. Glykolýza se tak stává hlavní metabolickou drahou regulující nádorový metabolismus (Burhans and Weinberger, 2007). Mechanismus vzniku genetické nestability v souvislosti s nádorovým metabolismem není dosud detailně prostudován. Je možné, že v případě nedostatku kyslíku a dalších nezbytných živin přechází netransformovaná buňka na glykolýzu, a to v důsledku, vlivem nedostatečné produkce energie ve formě ATP, způsobuje genetickou nestabilitu a/nebo replikační stres, podílející se na tumorigenezi.



Obr. 1 Společné znaky tumorigeneze V průběhu nádorové transformace získávají buňky různými mechanismy řadu selekčních výhod, podporujících progresi nádoru. Tyto selekční výhody jsou společné pro většinu nádorů. Převzato z (Hanahan and Weinberg, 2000).

2.2 Nádorový metabolismus

O metabolických změnách nádorových buněk se poprvé zmiňuje německý biolog a nositel Nobelovy ceny Otto Warburg ve 20 letech 20. století. Jeho studie později ukázaly, že nádorové buňky preferují při tvorbě energie ve formě ATP glykolýzu, namísto oxidativní fosforylace, což je paradoxně méně účinná metabolická dráha pro produkci ATP (Gogvadze et al., 2008). Nádorová buňka také systematicky zvyšuje příjem glukózy. Tento jev je dnes označován jako „Warburgův efekt“. Warburg předpokládal, že zvýšení příjmu glukózy a přechod na méně efektní glykolýzu je způsoben dysfunkcí mitochondrií a tím i buněčné respirace. Studium možných alterací oxidativní fosforylace odhaluje, že nádorové buňky negativně regulují katalytickou podjednotku ATP syntázy β -F1 (Lopez-Rios et al., 2007). Inhibice oxidativní fosforylace oligomycinem (inhibitor ATP syntázy, podjednotky F_0 , viz dále) u buněk plicního karcinomu, vedla k výraznému zvýšení aerobní glykolýzy, jak se také Warburgův efekt označuje. Nádorové buňky mohou tedy přecházet na glykolýzu v reakci na supresi oxidativní fosforylace v mitochondriích (Lopez-Rios et

al., 2007). Warburgův efekt a s ním spojený vyšší příjem glukózy byl prokázán u mnoha typů nádorů pozitronovou emisní tomografií (FDG-PET) pomocí fluorodeoxyglukózy (Hawkins and Phelps, 1988; Lopez-Rios et al., 2007).

Vysoká hladina glukózy, prokázaná u nádorových buněk poskytuje řadu selekčních výhod. Oxidativní fosforylace je co do produkce ATP efektivnější, naproti tomu, glykolýza je rychlejší způsob tvorby ATP. Nádorové buňky při své proliferaci potřebují rychlý přísun energie, proto může být tvorba ATP pomocí glykolýzy výhodná (Pfeiffer et al., 2001). V případě, že buňky přejdou do stavu aerobní glykolýzy, mohou přežívat v podmínkách s měnícím se množstvím kyslíku. V podmínkách hypoxie navíc exprimují transkripční faktor HIF1 α , který se také výrazně podílí na progresi nádoru a metabolickém zvratu (Allen et al., 2006; Iyer et al., 1998), viz dále. Výhodou může být také vysoká produkce laktátu jakožto konečného produktu aerobní glykolýzy. Kyselé podmínky mikroprostředí tlumí imunologickou odpověď (Fischer et al., 2007; Koukourakis et al., 2006). Nádorové buňky mohou metabolizovat glukózu pomocí pentóza fosfátového cyklu. Vytváří se nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), který, mimo jiné, působí jako antioxidant a snižuje účinek chemoterapeutik (Gatenby and Gillies, 2004). Podstatnou výhodou je také využití meziproductů glykolitické dráhy k anabolickým reakcím. Glukóza-6-fosfát je například využita k tvorbě glykogenu, pyruvát k tvorbě alaninu či malátu. Charakteristická je M2 embryonická izoforma pyruvát kinázy (PK), defosforylující fosfoenolpyruvát (PEP) na pyruvát. Tato izoforma, hojně exprimovaná v nádorových buňkách, je méně aktivní než izoforma v dospělé tkáni (Christofk et al., 2008).

Produkce ATP prostřednictvím glykolýzy je závislá na hladině glukózy v okolním mikroprostředí. Méně účinný metabolismus nádorových buněk musí přijmout mnohem více molekul glukózy než buňky zdravé tkáně (Casciari et al., 1992).

2.2.1 Vliv hypoxie a HIF1 na metabolismus nádorových buněk

Jeden z hlavních a nejlépe prostudovaných důvodů metabolického zvratu je spojen s fyziologickým stresem, tvořícím se uvnitř nádoru. Dokud si primární nádor nevytvoří vlastní cévní zásobení, je jeho růst omezen v závislosti na limitované difúzi kyslíku z okolních cév. Uvnitř nádoru se tvoří hypoxické oblasti (nízká hladina kyslíku), acidóza a zvýšený tlak intersticiální tekutiny (Milosevic et al., 2004). Špatné cévní zásobení je také spjato s nízkou hladinou živin a naopak zvýšenou přítomností odpadních látek (Dasu et al., 2003). Vreakci na tyto nepříznivé podmínky buňky exprimují hypoxia inducibilní faktor 1 (HIF1) (Iyer et al., 1998). HIF1 je heterodimerický transkripční faktor,

skládající se z α a β podjednotky. Po aktivaci se HIF1 translokuje do buněčného jádra, kde se váže na hypoxii-odpovědné úseky (hypoxia responsible elements, HRE) a indukuje transkripci genů souvisejících s nádorovou angiogenezí, invazivitou, buněčným přežíváním a glukózovým metabolismem (Kunz and Ibrahim, 2003; Wang et al., 1995).

Transkripční faktor HIF1 byl původně studován v souvislosti se sníženým obsahem kyslíku, dnes je však zřejmé, že HIF1 je regulován i jinými faktory, jako jsou aktivace onkogenů či ztráta funkce tumor supresorových genů. Hladina HIF1 se v nádorových buňkách zvyšuje například po aktivaci onkogenů *Ras*, *SRC*, *PI3K*, nebo ztrátě tumor supresorových genů jako jsou *VHL* (von Hippel-Lindau) či *PTEN* i v případě normoxických podmínek (Maxwell et al., 2001a; Maxwell et al., 2001b).

Největší funkční skupinou genů, konzistentně regulovaných HIF1 transkripčním faktorem v řadě buněčných typů, jsou geny související s glukózovým metabolismem (Allen et al., 2006; Fulda and Debatin, 2007). HIF1 pozitivně reguluje expresi transportérů nezbytných pro vstup glukózy do buněk (například GLUT1) (Airley et al., 2001), enzymů glykolytické dráhy (například fosfofruktokináza 1, PFK1) (Minchenko et al., 2002) a enzymů zpracovávajících pyruvát.

Navíc, hypoxie sama o sobě může mít přímý vliv na progresi nádoru, a to skrze nárůst replikačního stresu, který byl prokázán zvýšenou expresí tzv. běžných fragilních míst (viz dále) (Coquelle et al., 1998). Mechanismus indukce replikačního stresu v podmínkách hypoxie není dosud znám, mohl by však souviset s nedostatečností systémů oxidativní fosforylace a tedy s poklesem ATP. Jinými slovy hypoxie by mohla v buňce vyvolávat podobný efekt, jako chemická inhibice oxidativní fosforylace, která je hlavním výzkumným zájmem této diplomové práce.

2.3 Buněčná odpověď na poškození DNA a replikační stres

2.3.1 Odpověď buňky na poškození DNA

Jak již bylo zmíněno, buňka podléhá denně řadě faktorů, které přímo či nepřímo poškozují DNA, za vzniku mnoha typů DNA lézí. Některé tyto léze mohou vznikat v průběhu fyziologických procesů, jako jsou například DNA replikace, hydrolytické reakce nebo neenzymatické metylace. Významným zdrojem poškození DNA jsou také chemické látky, které mohou způsobovat nesprávné párování bází, blokaci DNA replikace a transkripce, ztrátu bází či vznik jednořetězových zlomů DNA (SSB, single strand break).

Fyzikální faktory, například ionizující či ultrafialové záření, bývají také možnou příčinou vzniku jednořetězových zlomů. V případě, že dojde k poškození DNA, buňka aktivuje mechanismy, jednotně nazývané jako odpověď na DNA poškození (DDR, DNA damage response), detekující DNA léze a zprostředkovávající jejich opravu (Harper and Elledge, 2007; Harrison and Haber, 2006). Odpověď na DNA poškození je součástí mechanismů, označovaných jako aktivace kontrolních bodů, tzv. „checkpointů“, které monitorují strukturu chromozómů a koordinují opravu DNA a progresi buněčným cyklem.

Pokud dojde ke vzniku dvou SSB v bezprostřední blízkosti nebo replikační aparát narazí na SSB či jinou lézi (viz Obrázek 3), vzniká na molekule DNA nejnebezpečnější forma DNA poškození, tzv. dvouřetězový zlom (DSB, double strand break) (Lindahl and Barnes, 2000). Přirozeně se dvouřetězové zlomy vyskytují jako součást funkce topoizomerázy II a ve VDJ rekombinantním systému genů zodpovědných za imunologickou odpověď (Pergola et al., 1993; Sancar et al., 2004).

Existuje několik typů mechanismů opravy DNA poškození, vzhledem k druhu vzniklého poškození. Mezi hlavní mechanismy DDR patří resekce poškozených bazí (BER, Base Excision Repair), resekce sekvence nukleotidů (NER, Nucleotide Excision Repair), homologní rekombinace (HR, Homologous Recombination) či nehomologní spojování konců (NHEJ, Non-Homologous End-Joining) [shrnutí v (Sancar et al., 2004)]. Oprava BER mechanismem je zahájena rozpoznáním poškozené báze DNA glykosylázou. Dochází k odstranění poškozené báze, vzniku abazického místa, které je později pomocí nukleázy, polymerázy a ligázy opraveno. BER se také uplatňuje při opravě mitochondriální DNA (mtDNA) způsobené například oxidativním poškozením (David et al., 2007).

NER se vyznačuje širokou substrátovou specifitou. Hlavním znakem NER je schopnost vystřížení oligonukleotidu o 22-30 bazích. Vzniklá jednořetězová DNA je následně dopolymerizována za pomoci replikačního proteinu A (RPA) a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a zligována ligázou (He et al., 1995).

Při opravách DSB hrají klíčovou roli homologní rekombinace a NHEJ. Oprava pomocí NHEJ probíhá v rámci celého buněčného cyklu. HR je aktivní v S a v G2 fázi, kdy využívá přítomnosti homologních sekvencí na sesterských chromatidách (Lieber, 2008; San Filippo et al., 2008).

U NHEJ je DSB rozpoznán heterodimerem Ku, který dále váže a aktivuje protein kinázu DNA-PK, která rekrutuje a aktivuje enzymy štěpící konce vláken (end-processing

enzymes), vzniklé dvouřetězovým zlomem, DNA polymerázu a ligázu. Tento mechanismus vždy způsobuje delecí části opravované DNA.

Homologní rekombinace je vždy iniciována tvorbou jednořetězové DNA. Zahájení opravy pomocí HR je doprovázeno aktivací MRN (MRE11–RAD50–NBS1) komplexu. Následuje sled dějů, katalyzovaný RAD51, BRCA1 a BRCA2 proteiny, při němž dochází k párování komplementárních řetězců DNA, a za přítomnosti polymeráz, nukleáz, helikáz a dalších komponent dochází k ligaci (Bartek and Lukas, 2007).

2.3.2 Funkce ATM a ATR kináz v buněčné odpovědi na poškození DNA

Klíčovými proteiny v signalizaci DDR a checkpointové odpovědi jsou v savčích buňkách ATM (ataxia-telangiectasia mutated) a ATR (ATM-RAD3-related) protein kinázy (Durocher and Jackson, 2001; Trenz et al., 2006). ATM a ATR jsou z hlediska funkce a biochemické struktury velmi podobné kinázy. Obě jsou relativně velké proteiny se sekvenční homologií a obě fosforylují substráty na serinových (Ser) a/nebo treoninových (Thr) reziduích. ATM a ATR kinázy aktivují řadu substrátů, podílejících se na opravě DNA, zastavení progresu buněčným cyklem (funkce checkpointu) a dalších procesech souvisejících s opravou poškozené DNA. Každá z kináz je však preferenčně aktivována jiným typem poškození. ATM kináza, gen, mutovaný v lidském onemocnění ataxia-telangiectasia (AT), je nezbytný při iniciaci signálních drah po vystavení buňky ionizujícímu záření (IR) a dalším faktorům indukujícím dvouřetězové zlomy v molekule DNA (Lavin, 2007; Marcelain et al., 2005). Druhou hlavní kinázou zapojenou v checkpointové odpovědi je ATR. Aktivaci ATR indukuje přítomnost jednořetězové DNA. Ta může vznikat například při replikačním stresu, při opravě dvouřetězového zlomu v průběhu homologní rekombinace a při ozáření buňky UV zářením (Durocher and Jackson, 2001; Marcelain et al., 2005).

Hlavními cílovými proteiny signalizace ATM a ATR jsou protein kinázy CHK1 (checkpoint kinase 1), aktivována ATR, a CHK2 (checkpoint kinase 2), aktivována ATM. Nejdůležitějšími substráty CHK1 a CHK2 kináz jsou Cdc25A fosfatáza, zodpovědná za tzv. akutní checkpointovou odpověď a p53 protein podílející se na tzv. opožděné checkpointové odpovědi. Fosforylace Cdc25A fosfatázy na několika serinových reziduích vede k ubiquitinaci a proteazomy zprostředkované degradaci tohoto proteinu. Degradace Cdc25A brání aktivační defosforylaci cyklin dependentních kináz 1 a 2 (CDK1 a CDK2) tímto proteinem a způsobuje zastavení progresu buněčným cyklem (Sorensen et al., 2003). Druhá signální dráha, tzv. opožděná checkpointová odpověď, zahrnuje fosforylaci p53

proteinu CHK1 a CHK2 kinázami (na Thr18, Ser20 a možná i dalších reziduích) a také přímo ATM/ATR kinázami na Ser15. (Shieh et al., 2000). Dalším významným proteinem regulovaným ATM/ATR kinázami je Mdm2 protein, ubiquitin ligáza, zprostředkávající degradaci p53 proteinu pomocí proteazomů. Fosforylace Mdm2 proteinu brání vazbě na p53 a tím jeho degradaci (Khosravi et al., 1999).

Výraznou roli v DDR hraje také chromatin, který je v případě opravy poškozené DNA reorganizován. Nejlépe popsanou modifikací je ATM/ATR/DNA-PK zprostředkovaná fosforylace histonu H2AX, varianty histonu H2A, na serinu 139, v blízkosti dvouřetězového zlomu (Falck et al., 2005; Yu et al., 2006). Fosforylovaný histon H2AX, označovaný jako γ -H2AX, slouží jako platforma pro navázání dalších proteinů nezbytných pro správné dokončení opravného mechanismu (53BP1, MDC1 a BRCA1) (Bartek and Lukas, 2007; Falck et al., 2005; Yu et al., 2006). γ -H2AX je uznávaným markerem DNA poškození formou DSB (Falck et al., 2005; Yu et al., 2006) formou DSB a jeho imunohistochemická detekce byla využívána v praktické části této práce, pro detekci a kvantifikaci DSB.

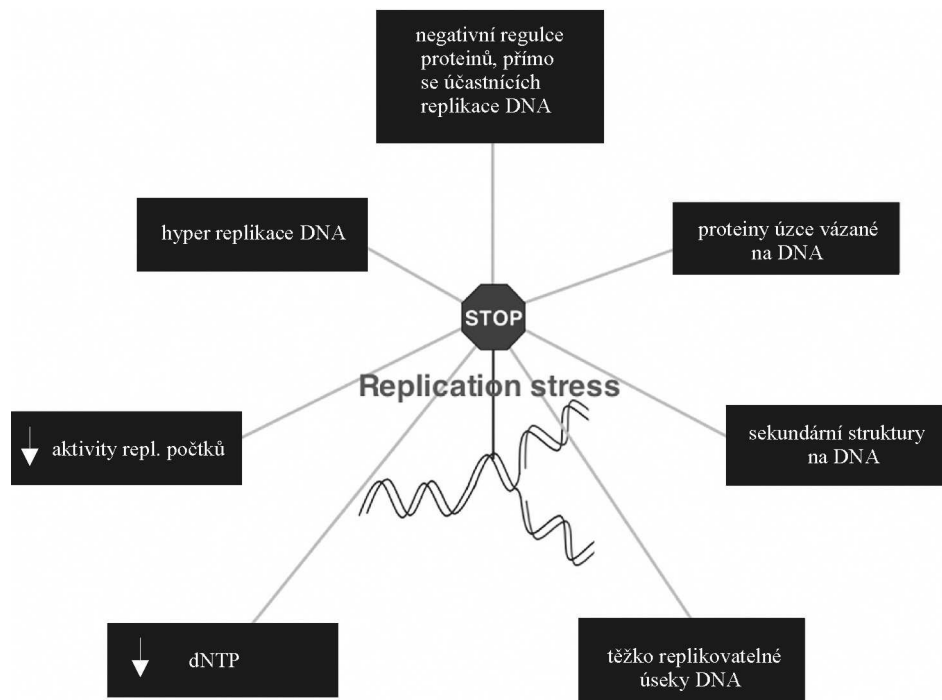
2.3.3 Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů a oxidativní stres

Metabolismus mitochondrií je obecně spojován s produkcí tzv. reaktivních kyslíkových radikálů. Reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species, ROS) vznikají u eukaryotních buněk jako meziprodukty mitochondriální respirace a řadí se k nejvýznamnějším endogenním faktorům, poškozující DNA. Přibližně 2% molekulárního kyslíku spotřebovaného buňkou v průběhu respirace je převedeno na superoxid, anionový radikál a prekurzor produkce ROS (Turrens, 2003). Za normálních podmínek je jedna molekula kyslíku redukována čtyřmi elektrony na dvě molekuly vody. Reakce je katalyzována komplexem IV elektron transportního řetězce, cytochrom c oxidázou (COX). Ve většině tkání jsou primárním zdrojem ROS redoxní komplexy elektron transportního řetězce mitochondrií (elektron transport chain, ETC) (komplex I a III), produkující elektrony, které mohou reagovat s molekulárním kyslíkem za tvorby superoxidu. Redukce kyslíku jedním elektronem je termodynamicky výhodnější pro většinu oxidoreduktáz ETC. ROS oxidují proteiny, lipidy i nukleové kyseliny, a pokud nejsou buňkou odstraněny, poškozují životaschopnost buňky. Buňka produkuje řadu antioxidantů, zabraňujících účinku ROS. Nerovnováha v produkci ROS a jejich odstraňování antioxidanty, označována jako oxidativní stres, je přítomna u mnoha onemocnění, včetně maligních nádorových onemocnění. Mitochondrie je největším

producentem ROS a mitochondriální DNA (mtDNA) je také nejbližším terčem. Míra poškození mtDNA je vzhledem k blízkému umístění ETC a nepřítomnosti histonů a většiny opravných mechanismů až 20 krát vyšší než u jaderné DNA. Oxidativní stres, způsobený produkcí ROS, je pravděpodobně také hlavním zdrojem nestability mtDNA, vedoucí až k dysfunkci mitochondriální respirace, protože mtDNA kóduje řadu proteinů nezbytných pro správné fungování ETC a produkci ATP oxidativní fosforylací. ROS indukují na DNA (včetně jaderné) vznik širokého spektra lézí, mezi které patří například oxidované báze, zlomy DNA nebo abazická místa. K oxidaci dochází u všech čtyř nukleotidových bází obsažených v DNA, nejčastěji jsou však oxidovány guanin a adenin za vzniku 8-oxo-guaninu/adeninu (8-oxoG/A). (Dizdaroglu, 1991; Klungland and Bjelland, 2007) (Pozn.: Imunohistochemická detekce 8-oxo-guaninu byla využita v této práci pro detekci míry oxidativního stresu na jaderné DNA u buněk exponovaných chemickým látkám, interferujícím s oxidativní fosforylací). Většina těchto lézí je opravována bázovou excizní reparací (base exciton repair, BER) (David et al., 2007).

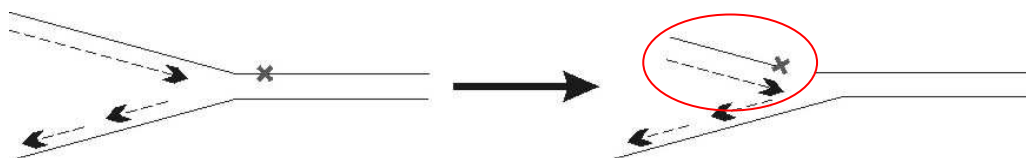
2.3.4 Replikační stres

Zvýšená genetická nestabilita rakovinných buněk je často spojována s replikačním stresem. DNA replikační stres (RS) je definován jako neefektivní DNA replikace, kterou způsobuje zpomalení či zastavení progresu replikačních vidliček, z nejrůznějších příčin (Burhans and Weinberger, 2007). Existuje řada faktorů, souvisejících s indukcí replikačního stresu, a z něj plynoucího poškození DNA. Mezi hlavní příčiny patří snížení hladiny volných dinukleotidtrifosfátů (dNTP), prekurzorů syntézy DNA a změny v expresi proteinů, podílejících se na syntéze dNTP nebo samotné syntéze DNA (Burhans and Weinberger, 2007). Dále abnormální míra iniciace replikace v oblasti replikačních počátků, jako je například tzv. hyper DNA replikace v důsledku aktivace některých onkogenů (Di Micco et al., 2006). RS také indukují DNA poškozující léze, představující problém pro postup replikační vidličky (fotoprodukty, aberantně navázané proteiny, aberantně kovalentně proteiny, interkalující chemické látky a chemické látky kovalentně vázané na DNA). Specifickým zdrojem RS jsou přirozeně se vyskytující sekundární DNA struktury (důsledek specifické sekvence nukleotidů), vyžadující aktivitu specifických helikáz. Již zmiňovaná běžná fragilní místa jsou bohatá právě na tyto sekundární struktury (Glover et al., 2005)t, viz dále (Obrázek 2).



Obr. 2 Hlavní příčiny vzniku replikačního stresu. (Burhans and Weinberger, 2007)

Pokud replikační vidlička narazí na jednořetězový zlom v právě replikované DNA, dochází k transformaci jednořetězového zlomu v dvouřetězový. Probíhající replikace se tak stává největším endogenním zdrojem vysoce mutagenních DSB (viz obrázek 3). Obecně je DNA replikační stres považován za hlavní zdroj genomické instability a tedy i hlavní příčinou vzniku nádorových transformací (Branzei and Foiani, 2009).



Obr. 3 Přeměna jednořetězového zlomu na dvouřetězový v důsledku probíhající replikace; křížek označuje místo zlomu na templátové DNA

2.3.3.1 ATR signální dráha

Aktivace ATR signální dráhy se zdá být, na rozdíl od aktivace ATM signalizace, primárně spjata s replikačním stresem. Jedná se o důsledek přítomnosti jednořetězové DNA (single stranded DNA, ssDNA), která v buňce, jako aberantní struktura, provázející převážně problémy s replikací DNA. Jednořetězová DNA však může vznikat i v případě průběhu opravy DSB, pomocí homologní rekombinace, v důsledku procesu tzv. resekce. V tomto případě je ssDNA generována působením meiotického rekombinačního proteinu 11 (MRE11), konkrétně jeho exo- a endonukleázovou aktivitou. MRE11 je součástí MRE11-RAD50-Nijmegen breakage syndrome proteinu 1 (NBS1), který je zapojen v procesu resekce DNA konců v průběhu opravy pomocí HR (Sartori et al., 2007). Tento způsob aktivace ATR je však primárně podmíněn aktivací ATM, která proces resekce iniciuje, skrze fosforylaci NBS1 (Falck et al., 2005). Samotný mechanismus aktivace ATR spočívá v navázání ATRIP (ATR interacting protein) heterodimeru na replikační protein A (RPA), který ssDNA obaluje. (Cortez et al., 2001) Na aktivaci se dále podílí protein TOPBP1 (Bartek and Mailand, 2006). Aktivovaná ATR fosforyluje celou řadu substrátů, z nichž nejdůležitější je CHK1 protein kináza, která je zodpovědná za G2/M blok buněčného cyklu, a tedy za checkpointovou funkci celé ATR dráhy.

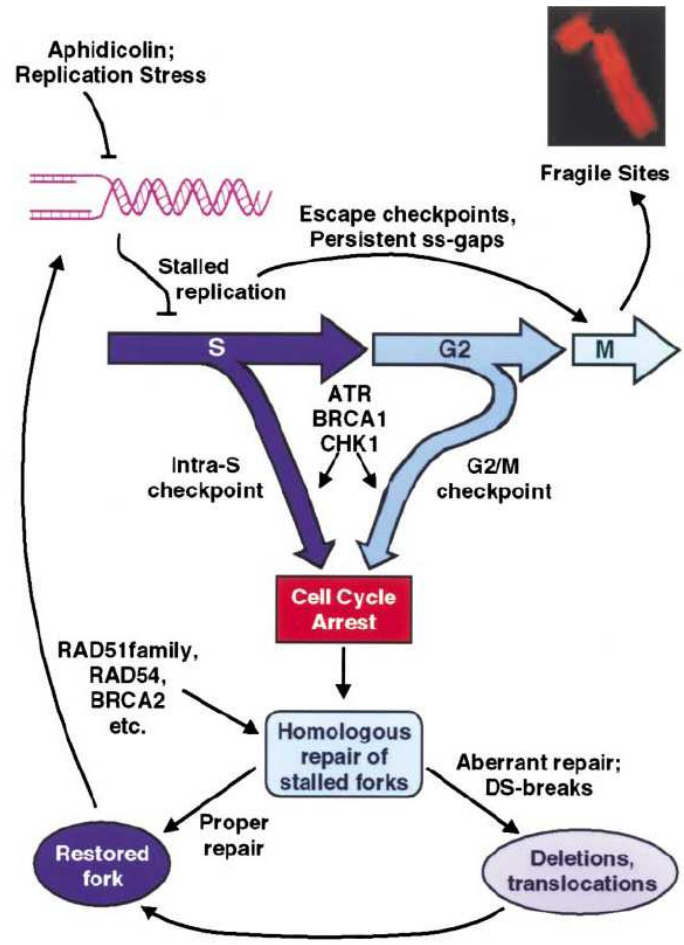
Spekuluje se, že ATR je částečně konstantně aktivovaná v průběhu celé replikace, jako důsledek přítomnosti ssDNA provázející rozvíjení dvojitého helixu DNA aktivitou helikáz. a také v důsledku opožděující se syntézy DNA pomocí Okazakiho fragmentů (Shechter et al., 2004). Skrze tuto skutečnost se zdá být ATR nezbytná pro správný přechod mezi S a M fází buněčného cyklu. Nepostradatelná funkce ATR však může spočívat i v jiném mechanismu, souvisejícím s poškozením DNA v průběhu replikace. Bylo dokázáno, že během replikace DNA může být již zmiňovaná přítomnost těžko replikovatelných úseků DNA neřešitelný problém pro buňku postrádající ATR protein kinázu (Cimprich and Cortez, 2008). Tato funkce ATR dráhy, spojovaná s obtížně aplikovatelnými úseky DNA je detailně diskutována v kapitole zaměřující se na expresi běžných fragilních míst, viz dále.

2.3.3.2 Expresie běžných fragilních míst

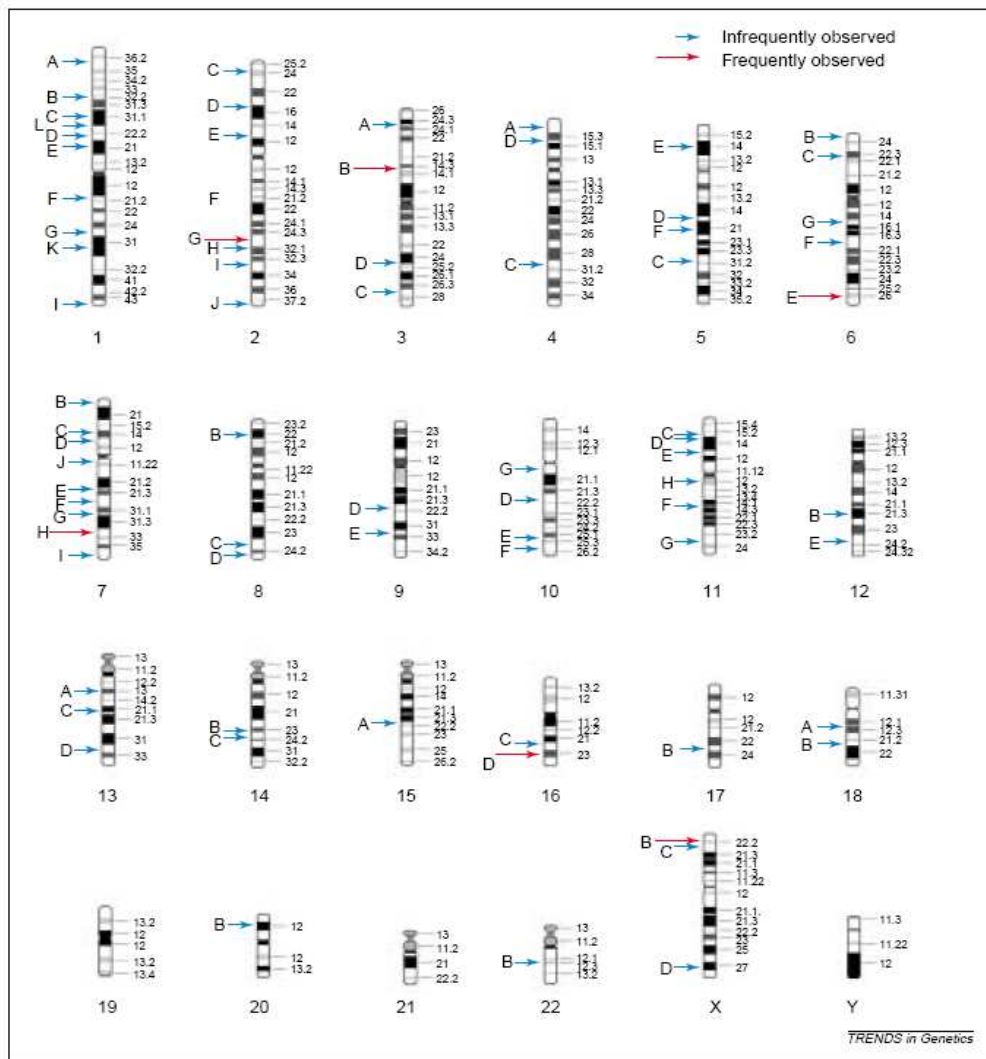
Studium replikačního stresu prokázalo, že aberace, indukované faktory způsobující replikační stres, mohou být specifické pro určité části genomu. Detailnější strukturní studie ukázaly, že se jedná o DNA se specifickou sekundární strukturou. Většina těchto těžko replikovatelných míst kolokalizuje s fenoménem tzv. mitotické fragility, která se projevuje

zlomy a trhlinami ve specifických oblastech mitotických chromozomů. Tyto oblasti jsou označovány jako běžná fragilní místa (common fragile sites, CFS) (Durkin and Glover, 2007). Fragilní místa byla objevena při studiu metafázních chromozomů lidských buněk, vystavených specifickým stresovým podmínkám. Mitotické chromozomy buněk, trávených inhibitory replikace, například aphidicolinem (mechanismus účinku viz kapitola 2.4), v koncentracích, které zpomalují, ne však zastavují proces replikace DNA, vykazují zlomy či trhliny, pozorovatelné mikroskopickou analýzou (Sutherland, 1977). Tyto specifické lokusy v lidském genomu jsou velice náchylné ke vzniku genetické nestability (je zde vyšší pravděpodobnost vzniku zlomů, translokací a jiných forem aberací, než je předpokládáno, na základě náhodné distribuce). Na mechanismu exprese fragilních míst se z velké části podílí ATR signální dráha (Casper et al., 2002), jak bylo prokázáno genetickou manipulací většiny jejích komponent (viz Obrázek 4). Celkem bylo objeveno více než 80 fragilních míst v normálním lidském genomu, indukovaných aphidicolinem (viz Obrázek 5). Další fragilní místa jsou indukována jinými chemikáliemi (HU, BrDU), případně se vyskytují pouze u zlomku populace.

Z pohledu této diplomové práce je zajímavé, že také některé formy metabolického stresu, jako je deficiencie folátu či tymidinu, ale také hypoxie, mohou potencovat specifickou expresi fragilních míst (Coquelle et al., 1998; Durkin and Glover, 2007; Zhu et al., 2006). Třebaže mechanismus exprese fragilních míst, v podobě mitotických zlomů, není dosud přesně znám, lze takto výrazného fenotypu využít k monitoringu míry replikačního stresu. Za tímto účelem se užívá specializovaných cytogenetických metod, z nichž některé byly použity i v praktické části této diplomové práce, v souvislosti s prokázáním zvýšeného replikačního stresu u buněk exponovaných látkám, interferujícím s oxidativní fosforylací.



Obr. 4 Model vysvětlující podíl ATR dráhy na expresi běžných fragilních míst Defekty v proteinech účastnících se opravy DNA zlomů a/nebo checkpointové odpovědi zapříčiňují nedostatečnou opravu a/nebo kontrolu DNA lézí. „Unikající“ léze jsou příčinou fragility manifestované v mitóze (Casper et al., 2002).



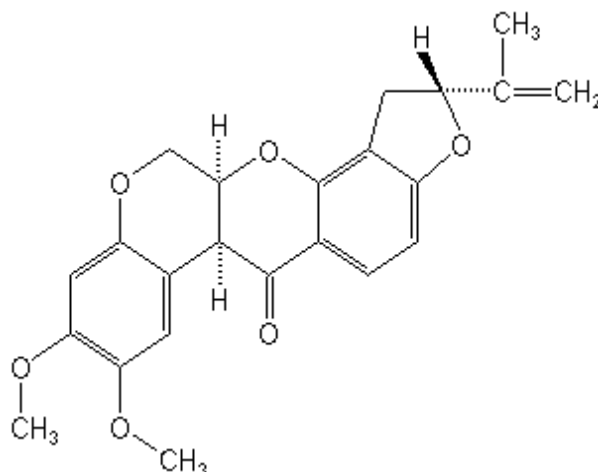
Obr. 5 Přehled CFS indukovaných aphidicolínem v rámci lidského idiogramu; modré šipky označují méně častá místa exprese CFS; červené šipky označují častá místa exprese CFS, převzato z (Richards, 2001).

2.4 Chemikálie ovlivňující buněčný metabolismus

Pro praktickou část diplomové práce, bylo vybráno několik chemických látek, ovlivňujících oxidativní fosforylaci mitochondrií, hladinu intracelulárního ATP replikaci a míru oxidativního stresu. Účelem užití těchto látek bylo zpravidla navodit podmínky, při kterých buňka nebude moci využít oxidativní fosforylaci, jako hlavní zdroj produkce energie ve formě ATP. Nedostatek energie by potom v důsledku mohl negativně ovlivnit některé energeticky náročné procesy, jako jsou replikace a/nebo oprava DNA. Jako pozitivní kontrola ve smyslu indukce replikačního stresu byl vybrán aphidicolin a jako induktor oxidativního stresu, který se často vyskytuje ve spojitosti s dysfunkcí mitochondrií, byl vybrán doxorubicin. Jednotlivé chemikálie a mechanismus jejich působení jsou představeny v následující části.

2.4.1 Rotenon

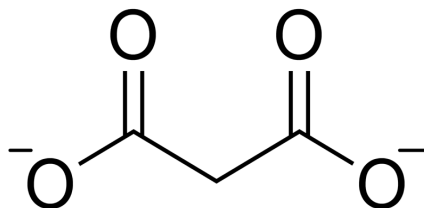
Rotenon je heterocyklická sloučenina často užívaná jako insekticid, akaricid (skupina látek určených k hubení roztočů) a piscicid (skupina látek určených k hubení ryb). Toxicita rotenonu je založena na inhibici mitochondriální respirace, z toho vyplývající snížení ATP produkce a tvorbě ROS. Konkrétně rotenon blokuje NADH oxidaci NADH ubiquinon oxidoreduktázového komplexu (komplex I ETC) (Chauvin et al., 2001). Rotenon je také znám jako inhibitor buněčné proliferace skrze depolymerizaci mikrotubulů. Při koncentracích $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, depolymerizuje mikrotubuly mitotického vřeténka u buněčných linií HeLa a MCF-7 (Srivastava and Panda, 2007). Deficience funkce komplexu I je asociována s řadou neurodegenerativních onemocnění, mezi které patří například Parkinsonova choroba (Betarbet et al., 2002).



Obr. 6 *Strukturální vzorec rotenonu (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)*

2.4.2 Malonát

Malonát funguje jako kompetitivní inhibitor buněčné respirace (Beal et al., 1993). Mechanismus spočívá ve vazbě na aktivní místo sukcinát dehydrogenázy, která je součástí citrátového cyklu, ale také součástí komplexu II ETC. Malonát kompetuje se sukcinátem a při vazbě na aktivní místo dochází k inhibici enzymu.

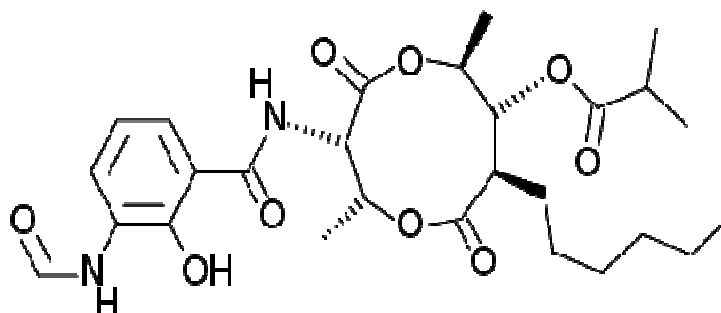


Obr. 7 *Strukturální vzorec malonátu (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)*

2.4.3 Antimycin A

Antimycin A je hojně využíván jako piscicid. Jedná se o chemickou sloučeninu izolovanou z bakterie *Streptomyces*, která se váže na Q_i místo cytochrom c reduktázy, komplexu III ETC, a inhibuje tak oxidaci ubiquinolů. Inhibice této reakce narušuje tvorbu protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně a dochází tak ke snížení

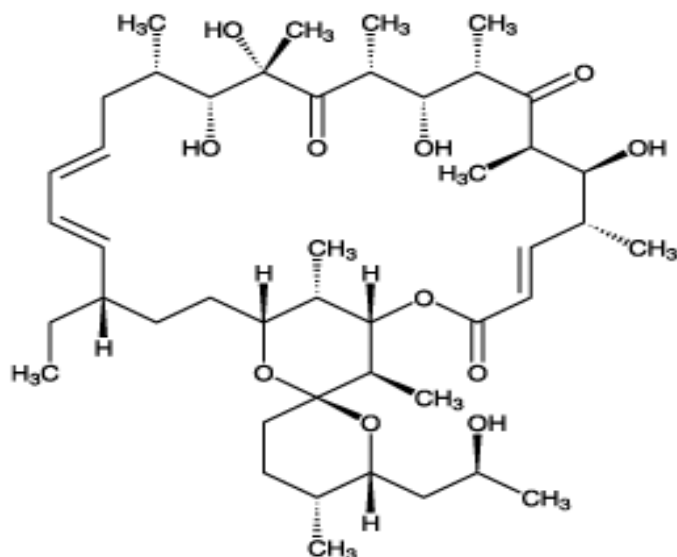
produkce ATP (Han et al., 2008). Inhibice komplexu III také podle některých prací indukuje produkci ROS (Saybasili et al., 2001).



Obr. 8 Strukturální vzorec Antimycinu A (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)

2.4.4 Oligomycin A

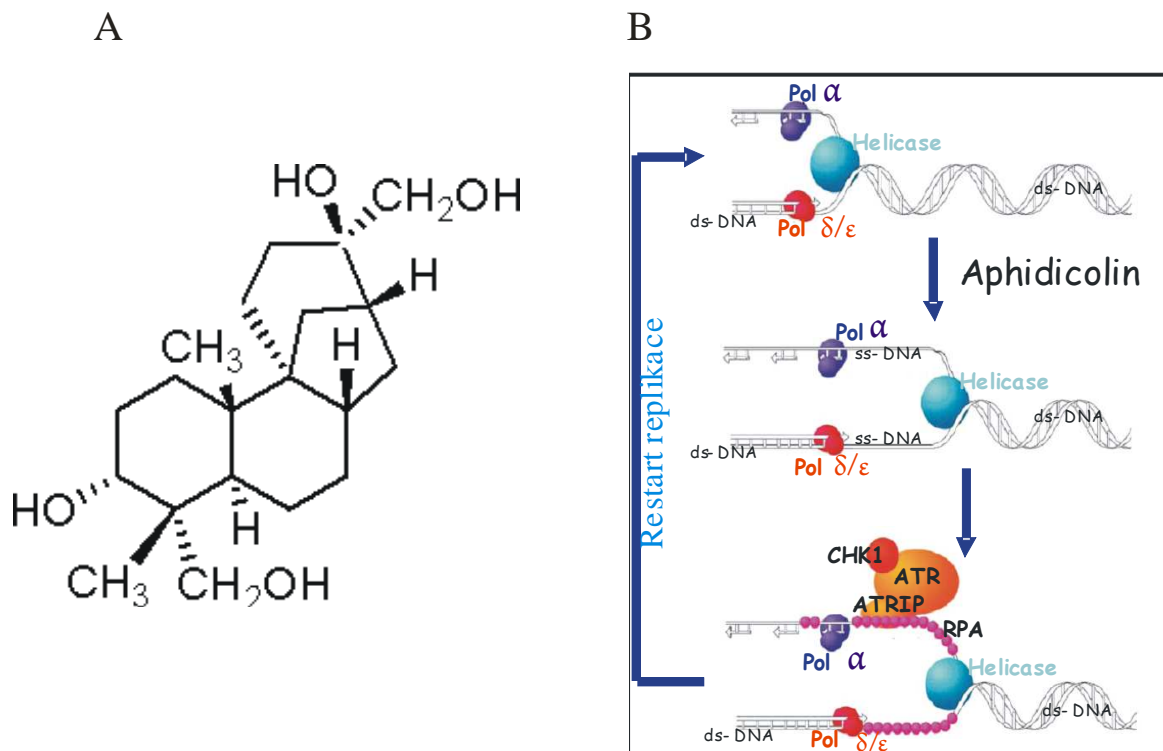
Oligomycin je chemická sloučenina, izolovaná z bakterie *Streptomyces*. Využívá se jako antibiotikum. Oligomycin A inhibuje F_0 podjednotku ATP syntázy, enzymu, který je nezbytný v procesu oxidativní fosforylace (Matsuno-Yagi and Hatefi, 1993). Vlivem Oligomycinu A dochází k narušení protonového gradientu. Protony jsou ATP syntázou pumpovány nadále, ovšem ve velmi omezeném množství, a na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány dochází ke zvyšování koncentrace protonů. Zvýšená koncentrace protonů později kompletně zastaví přenos elektronů pomocí ETC a tím i proces oxidativní fosforylace (Tzagoloff, 1970). F_0F_1 ATP syntáza je navíc důležitá pro správnou funkci proapoptického proteinu Bax. Oligomycin A se tedy podílí na supresi apoptické odpovědi (Shchepina et al., 2002).



Obr. 9 Strukturální vzorec Oligomycinu A (převzato z <http://www.enzolifesciences.com>)

2.4.5 Aphidicolin

Aphidicolin je antibiotikum produkované houbou *Cephalosporium aphidicola*. Toxicita aphidicolinu je spojena s probíhající replikací. Funkce Aphidicolinu spočívá v inhibici DNA polymeráz α , δ a ϵ (Cheng and Kuchta, 1993) (Obrázek 10). Aphidicolin se váže na molekulu polymerázy a brání vazbě volných deoxynukleotid trifosfátů (dNTP). Vazba aphidicolinu je reverzibilní. APH neinteraguje s mitochondriální DNA polymerasou, RNA, proteiny, intermediáty metabolismu ani s prekurzory syntézy nukleových kyselin (Spadari et al., 1985). Aphidicolin je nejvýznamnějším induktorem exprese běžných fragilních míst (common fragile sites, CFS) (Cheng and Kuchta, 1993; Spadari et al., 1985), užívá se při synchronizacích buněk či pokusech, při kterých je studována funkce replikačních vidliček (Kurose et al., 2006). V této diplomové práci byl aphidicolin použit jako pozitivní kontrola indukce fragilních míst a zpomalení replikace DNA.

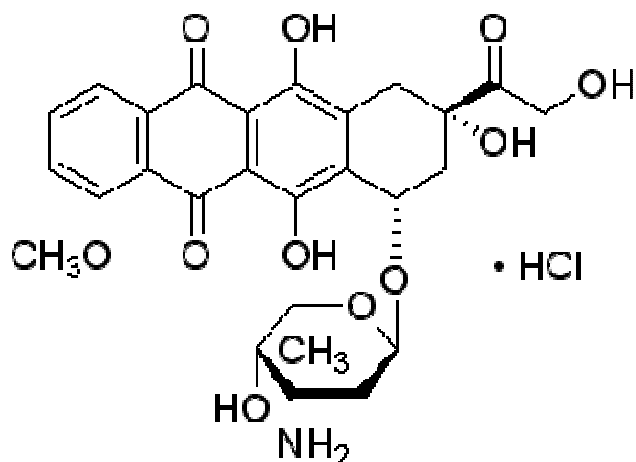


Obr. 10 A. Strukturní vzorec aphidicolinu (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)

B. Mechanismus působení aphidicolinu Nízké koncentrace aphidicolinu, indukují částečnou inhibici DNA polymeráz α , δ a ϵ (Cheng and Kuchta, 1993), helicázy však pokračují v rozvíjení dvouřetězové DNA (dsDNA). Dlouhé úseky jednořetězové DNA (ssDNA) jsou rozpoznány RPA proteinem, který zprostředkovává stabilizaci replikační vidličky a aktivaci checkpointové odpovědi skrze aktivaci ATR dráhy. Upraveno podle (Glover et al., 2005)

2.4.6 Doxorubicin

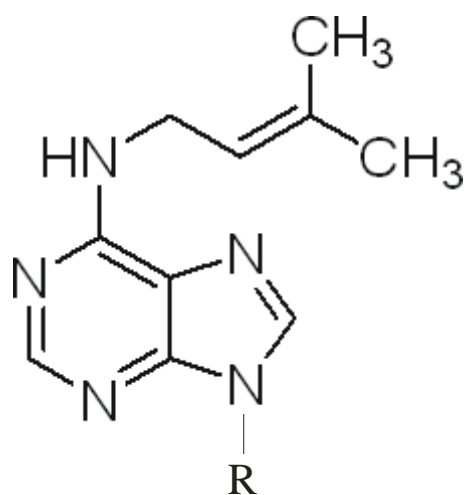
Doxorubicin je využíván jako chemoterapeutikum. Mechanismus účinku je založen na interkalaci do DNA, vytváří pevné adukty a tím inhibuje topoisomerasu II (Laginha et al., 2005). Doxorubicin také indukuje produkci ROS, konkrétně hydroxylových radikálů a zvyšuje míru oxidativního stresu. Je užíván v léčbě mnoha typů solidních nádorů (Mizutani et al., 2005).



Obr. 11 Strukturní vzorec Doxorubicinu (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)

2.4.7 N6-isopentenyladenosin

N6-isopentenyladenosin (iPR) patří mezi izoprenoidy derivované z adenosinu. Jedná se o jediný dosud známý cytokinin vyskytující se v savčích buňkách (Ishii et al., 2002). iPR a některé jeho analogy mají inhibiční vliv na růst a proliferaci savčích buněk (Bifulco et al., 2008). N6-isopentenyladenosin je také často diskutován v souvislosti s programovanou buněčnou smrtí, apoptózou. Proapoptický účinek iPR je pravděpodobně zprostředkován uvolněním cytochromu c z vnější strany vnitřní mitochondriální membrány, tedy mitochondriální cestou (Vermeulen et al., 2002). Navíc iPR způsobuje výrazné snížení hladiny intracelulárního ATP, ke kterému dochází už při užití relativně nízkých koncentrací (2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Mlejnek and Dolezel, 2005).



Obr. 12 Strukturní vzorec *N6-isopentenyladenosinu*; *R* označuje ribózu (převzato z <http://www.sigmaaldrich.com>)

3 Cíl práce

- Vypracovat literární rešerši na téma nádorového metabolismu a souvislostí týkajících se indukce replikačního stresu
- Prokázat vliv inhibice oxidativní fosforylace na indukci replikačního stresu pomocí studia mitotické fragility, míry oxidativního stresu a vlivu na buněčný cyklus u primární buněčné linie

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

Roztoky:

methanol-aceton v objemovém poměru 1:1 (Sigma); 4 % formaldehyd (Sigma);

EB lyzační pufr: 100ml 0,5M TRIS pH 7,5, 30ml 5M NaCl, 2ml 0,5M EDTA, 0,2% NP-40

LSB (Laemmli SDS sample buffer) 4x: 10ml 1m TRIS pH6,8, 20ml DTT, 4g SDS, 20ml glycerolu, 0,1g BFB

SDS pufr pro elektroforézu: 14,4g glycinu, 3,0g TRIS, 1g SDS, doplněno do 1l destilovanou vodou

Transferový pufr: 0,37g SDS, 2,9g glycinu, 5,8g TRIS, 0,2l methanolu, doplněno do 1l destilovanou vodou

Chemikálie na přípravu roztoků byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich.

Použité protilátky

p-CHK1 (Ser 317, králík, #2344S, lot: 6, Cell Signaling), p-p53 (Ser 15, králík, #9284S, lot:9, Cell signaling), γ H2AX (Ser 139, #05-636, lot: DAM1636071, Millipore), PCNA (clone pc-10, myš, Dr. B. Vojtěšek, Masarykův Onkologický ústav, Brno, Česká republika), 8-Oxoguanin (myš, #MAB3560, lot: NG1713421, Millipore), Alexa Fluor 488 (Invitrogen), Stabilized Peroxidase Conjugated Goat-anti rabbit(H+L) a Stabilized Peroxidase Conjugated Goat-anti mouse(H+L) (Pierce)

Komerční kity

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay KIT (Promega)

Chemikálie použité pro experimenty ovlivňující buněčný metabolismus

Aphidicolin (Sigma-Aldrich, kat. č. A0781); Rotenon (Sigma-Aldrich, kat. č. R8875); Antimycin A (Sigma-Aldrich, kat. č. A8674); Malonát (Sigma-Aldrich, kat. č. 49323); Oligomycin A (Sigma-Aldrich, kat. č. 75351), N6-isopentenyladenosine (iPR) (poskytnuto firmou Olchemin), Doxorubicin (Sigma-Aldrich, kat. č. 078543Q), Nocodazol (Sigma-Aldrich)

Ostatní

FBS (fetální bovinní sérum) (Gibco, USA), ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), glutamin (Sigma), penicilin (Sigma), streptomycin (Sigma), Vectashield mountign medium, obsahující DAPI (Calbiochem, USA), TrypLE™ Express (Invitrogen), DMEM BASE (Sigma), glukóza (Sigma Aldrich), Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich), Tween 20 (MP Biomedicals), Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (CARL ROTH®)

4.2 Biologický materiál

Buněčná adherentní linie plicních fibroblastů MRC-5, kultivována v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) s výslednou koncentrací 10% (v/v) FBS (Fetální bovinní sérum, Invitrogen), 2mM glutaminu (Sigma), 10U/ml penicilinu a 0,5mg/ml streptomycinu (Sigma).

Kultivována při 37°C, v atmosféře 5% CO₂. Pasážována 2-3x za 7 dní.

4.3 Použité metody

4.3.1 Měření hladiny intracelulárního ATP CellTiter-Glo® kitem

Buňky byly inkubovány s příslušnými testovanými látkami v zadaných koncentracích 24 hodin na 6 cm Petriho miskách. Poté byly buňky omyty 1x PBS a trypsinyzovány (TrypLE™ Express, Invitrogen). Buňky byly sklizeny a spočítány. Počet buněk byl poté upraven na 5000 buněk/ 50 µl. 50 µl takto upravené buněčné suspenze bylo pipetováno v tripletu do 96 jamkového panelu a poté byl panel s buněčnou suspenzí ekvilibrován na laboratorní teplotu. CellTiter-Glo® luminiscentní roztok (Promega) byl také ekvilibrován na laboratorní teplotu a poté bylo do jednotlivých jamek s buněčnou suspenzí pipetováno 50 µl luminiscentního roztoku. Panel byl poté přenesen na třepačku (450 rpm, 2 minuty) aby bylo dosaženo efektivnější lyze buněk. Panel byl poté inkubován 10 minut při pokojové teplotě kvůli stabilizaci luminiscentního signálu. Poté byl proměřen 96-jamkový panel na luminometru Reader Synergy HT (BioTek).

4.3.2 Imunofluorescenční detekce

Buňky byly pěstovány na podložních sklech ve speciálních komůrkách (Biopatterns) a inkubovány s 1 ml média, které obsahovalo testované látky v zadaných koncentracích. Po časovém inkubačním intervalu 24 hodin byly buňky omyty PBS (Phosphate Buffer Saline) a následně byly buňky fixovány 10% formaldehydem po dobu 15 minut. Buňky byly promyty dvakrát v PBS a poté bylo na 5 minut přidáno PBS s 0,1% Tritonem X. Po permeabilizaci byly buňky třikrát omyty PBS a poté byly obarveny primární protilátkou proti fosfo-H2AX (ser139) nebo 8-oxoG (obě protilátky myši). Inkubace probíhala přes noc ve vlhké komoře při 4 °C, poté byly buňky promývány 3x 5 minut v PBS + Tween 0,1% na třepačce. Po oplachu byly buňky obarveny sekundární, fluorescenčně značenou protilátkou Alexa Fluor (Molecular Probes) s excitační vlnovou délkou 488, 1 hodinu při pokojové teplotě, ve tmě. Všechna buněčná jádra byla zamontována do vodného média Vectashield mountign medium, obsahujícím DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, fluorescenční barva, interkalující se do struktury DNA) (Calbiochem, USA). Ve fluorescenčním mikroskopu (BX50F3, Olympus, Japonsko), pod zvětšeními 400x, byly kvantifikovány struktury γ -H2AX označované jako fokusy a míra signálu 8-oxoG. Čas expozice, nastavení mikroskopu a zdroj UV záření byl konstantní u všech vyhodnocovaných vzorků.

4.3.3 Western blotting

Buňky byly inkubovány s příslušnými testovanými látkami v zadaných koncentracích 24 hodin na 10 cm Petriho miskách. Po inkubaci byly buňky opláchnuty v PBS, které bylo následně důkladně odsáto, a misky byly přeneseny do -80 °C, kde byly ponechány 2 dny. Po 2 dnech byly misky rozmrazeny na ledu. Poté byly přesunuty na suchou lázeň, rozehrátou na 95 °C. Po 10 sekundách byl přikápnut 2x koncentrovaný roztok LSB (loading sample buffer), ředěný EB lyzačním pufrem a misky byly okamžitě sejmuty ze suché lázně. Dále byly buňky seškrábány škrabkou, přepipetovány do mikrozkušavek a sonikovány na ultrazvukovém homogenizátoru.

Proteiny jednotlivých vzorků byly rozděleny pomocí elektroforézy na 10% a 20% polyakrylamidovém gelu. Zaostřovací gel měl pH 6,8, dělicí gel pH 8,8. Separace probíhala 1h při napětí 150V. Po rozdělení byly proteiny přeneseny polosuchou metodou

(semi-dry) western blot na nitocelulosovou membránu (Biorad). Přenos probíhal proudem 150 mA na jednu membránu po dobu 1,5 hodiny.

Membrána byla po přenosu obarvena roztokem Ponceau S pro kontrolu naneseného množství proteinů a lepší orientaci při řezání potřebných částí membrány. Ponceau S bylo vymyto roztokem PBS + 0,1 % Tweenem. Po odbarvení byla membrána přesunuta do PBS s 5% BSA a půl hodiny blokována. Poté byla na membránu nanесena primární protilátka ředěná v 5% BSA v PBS a inkubována přes noc při 4°C. Po obarvení primární protilátkou byla membrána promyta v PBS + 0,1% Tween a poté byla na membrány nanесena sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou ředěná v PBS s 5% BSA. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě a poté byly membrány promyty v PBS + 0,1% Tween. Na membránu byl nanесen roztok Supersignal West Pico (Thermo Scientific) a membrány byly vyfoceny digitální kamerou CoolSnap HQ² (Photometrics) při expozici 10-500 s.

4.3.4 Průtoková cytometrie

Buňky byly synchronizovány kultivací v médiu s 3 mM thymidinem (Sigmaaldrich) 24 hodin. Poté byly buňky třikrát opláchnuty PBS a kultivovány v médiu obsahujícím 24 μM 2-deoxycytidin (Sigma-Aldrich D-0776). Po 1 hodině byly k buňkám přidány chemikálie v zadaných koncentracích a buňky byly inkubovány 8, 24 a 48 hodin. Poté byly buňky opláchnuty PBS, trypsinizovány a neutralizovány 5% FBS v PBS. Suspenze byla centrifugována 5 min při 1000G, poté byla peleta resuspendována v 1 ml PBS a krok byl opakován. Pelet byl poté resuspendován ve 100 μl PBS a po kapkách byl na třepačce přidán 1 ml předchlazeného (-20 °C) 70% etanolu. Buňky byly ponechány na ledu minimálně 30 minut. Poté byl veškerý Et-OH vymyt PBS, buňky byly centrifugovány a poté k nim byl přidán roztok RNasy A (Sigma) s výslednou koncentrací 100 μM a 10 μg/ml roztok propidium jodidu (Sigma) v PBS. Poté byly buňky inkubovány 30 minut při 37 °C. Na průtokovém cytometru byl proměřen průběh buněčného cyklu. Množství inkorporovaného propidium jodidu je přímo úměrné množství DNA v buňce. Proměřeno bylo 25 000 buněk/vzorek.

4.3.5 Mitotický spreading buněk s neporušeným γ -H2AX epitopem

Pro metodu mitotických spreadů musí být použita buněčná suspenze obohacena o buňky ve fázi mitózy. K této selekci se běžně užívá jedno z mnoha cytostatik, jako jsou například kolcemid (Stubblefield et al., 1967) či nocodazol (Zieve et al., 1980). V této diplomové práci byl použit nocodazol. Buňky byly kultivovány s vybranými chemikáliemi v zadaných koncentracích 24 hodin. Po 18 hodinách byl přidán nocodazole. Poté byly trypsinizovány a resuspendovány v předchlazeném (4 °C) PBS s 5 % FBS. Ihned centrifugovány v 15 ml zkumavkách při 500G/4 °C a resuspendovány v 8 ml 60 mM KCL (pokojová teplota). Zkumavky byly poté přesunuty do vodní lázně, 37 °C, 5 minut a po inkubaci ve vodní lázni přesunuty na 25 minut na led. Opět centrifugovány 500G/4 °C, resuspendovány v 10 ml předchlazeného (-20 °C) metanol/acetonu 1:1 (v/v) a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Znovu centrifugovány 700G/4 °C a resuspendovány v 5 ml předchlazeného (-20 °C) metanolu pro dlouhodobé uchování v mrazáku. Před samotnou procedurou spreadování byl vzorek centrifugován 700G/pokojová teplota a většina metanolu byla odsáta vakuovou pumpou. Podle množství buněk byl 0,5 – 1 ml metanolu ponechán ve zkumavce na resuspendaci peletu. 15 μ l buněčné suspenze bylo nastříknuto automatickou pipetou doprostřed podložního skla, pokrytého přibližně 2 mm tenkou vrstvou ledových krystalů. Tvorba krystalů byla vyvolána inkubací podložního skla ve vlhké komoře. Sklo bylo položeno na aktivně ochlazovaném povrchu tepelné pumpy (Peltierův článek), kterou probíhal proud 3,5 A. Peltierův článek byl umístěn na hliníkovém chladiči ponořeném do ledové tříště. Po nastříknutí bylo sklo inkubováno 2-3 minuty, dokud se metanol nezředit kondenzující vodou natolik, aby došlo k přemrznutí nanesené suspenze. Poté se Peltierův článek vypnul a sklo bylo přeneseno na suchou lázeň, rozehřátou na 80 °C. Po úplném zaschnutí se sklo přeneslo do PBS s 0,1 % Tweenem, kde bylo inkubováno 5 minut. Následovalo imunofluorescenční barvení (viz Imunofluorescenční detekce γ -H2AX fokusů. Nastavení výkonu Peltierova článku, vlhkost a teplota uvnitř vlhké komory byla konstantní pro všechny vzorky.

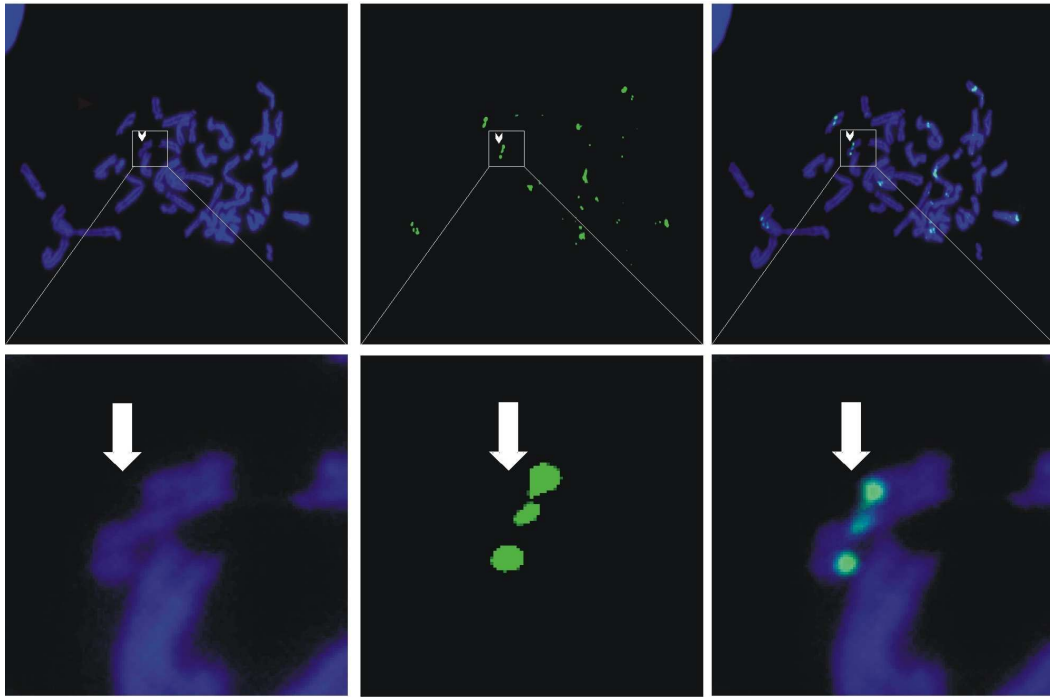
Imunofluorescenční detekce γ H2AX fokusů

Skla se vzorky byla připravena, jak je popsáno výše. Po vyjmutí skel z PBS s 0,1 % Tweenem byla provedena inkubace primární protilátkou anti γ -H2AX (ser 139, Millipore), přes noc, 4 °C a následovala inkubace sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Skla byla odvodněna v alkoholové řadě 70%, 90% a 96% etanolu a poté zamontována do

vodného média Vectashield mountign medium, obsahujícím DAPI (Calbiochem, USA). Vyhodnocení bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu (BX50F3, Olympus, Japonsko), pod zvětšeními 400x. Pozorovány byly struktury γ -H2AX označované jako fokusy přítomné v buňkách ve fázi mitózy. Snímky byly fotografovány digitální kamerou (Cool Snap HQ²) v programu PM Capture Pro.

Semi-automatické vyhodnocení fluorescenčního signálu v mitotických a interfázních jádrech

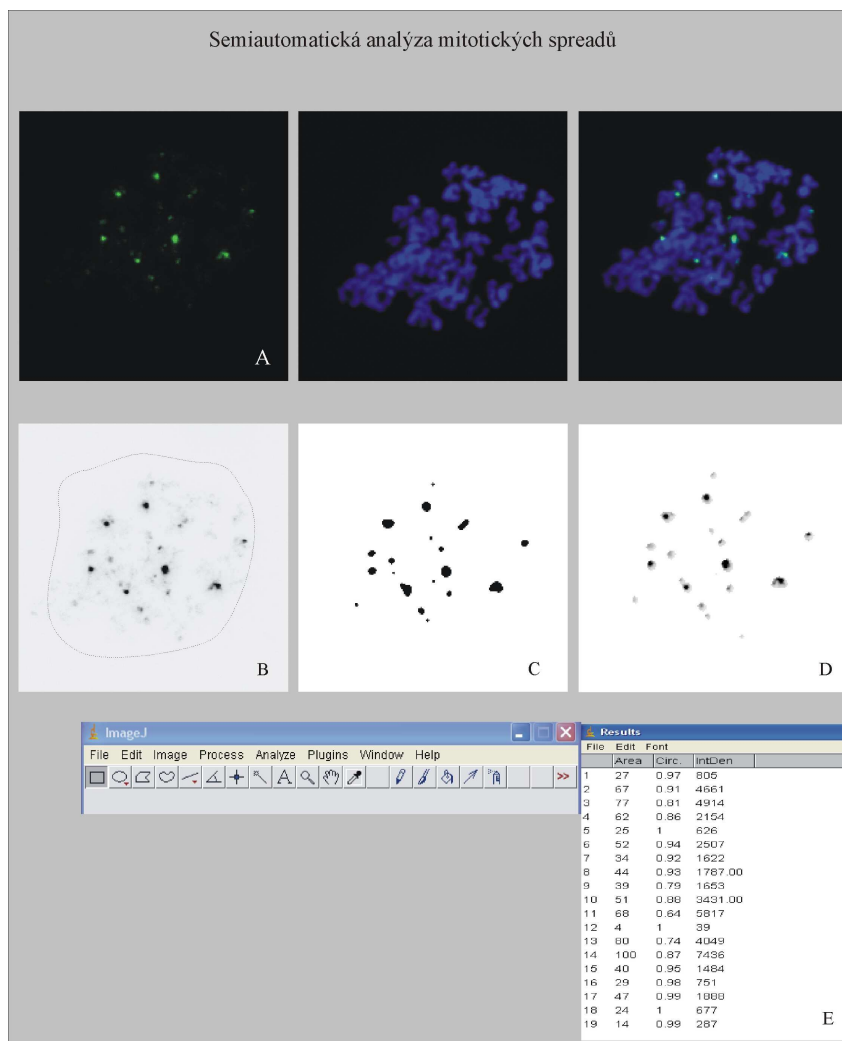
Hlavní výhodou metody je možnost kvantitativní imunofluorescenční analýzy γ -H2AX (Obrázek 13). Rozpoznání a vyhodnocení jednotlivých fokusů může být nastaveno rutinně počítačem (popsáno níže). Předpokladem pro vyhodnocení je dostatečné množství fotografií mitotických spreadů/interfázních jader pořízených digitální kamerou. K vyhodnocení není třeba specializovaný software. Metoda je založena na běžných, komerčně dostupných softwarech (Microsoft Windows XP, Adobe Photoshop, Microsoft Excel) či freewarech (Image J). Proces je automatizován postupným využitím zmíněných softwarů a užitím MS windows makro softwaru (Mouse recorder) (Obrázek 14). Data jednotlivých vzorků byla srovnána statisticky využitím T-testu. Popsáno v (Mistrik et al., 2009), viz dále.



Obr. 13 Mitotický spread buněk MRC-5 vystavených nízké koncentraci (0,4 μ M) aphidicolinu, spreadováno metodou umožňující imunofluorescenční detekci dvouřetězových zlomů. Šipky označují místo zlomu zvýrazněné γ -H2AX fokusem.

Mitotická jádra

Vyhodnocením fotografie v programu Image J získáme čtyři parametry: i. počet γ -H2AX fokusů, velikost γ -H2AX fokusů, cirkularitu jednotlivých γ -H2AX fokusů (Obrázek 14) a jejich integrovanou denzitu signálu. Data jsou poté přepočítána do programu Microsoft Excel, kde jsou seřazena podle cirkularity [$cirkularita = 4\pi(\text{obsah}/\text{obvod}^2)$]. Následně jsou vybrány fokusy, kterým odpovídá hodnota cirkularity větší nebo rovna 0,85 a z těchto fokusů je vypočtena průměrná velikost. Průměrnou velikostí je poté vydělena velikost jednotlivých fokusů a pokud je výsledek násobně větší než průměrná velikost fokusů s příslušnou cirkularitou, je jejich počet podle toho upraven. Data jsou na závěr vyhodnocena ve statistickém programu NCSS ve formě BoxPlot.



Obr. 14 Schéma semiautomatického vyhodnocení zlomů v rámci mitotického spreadu

Mitotický spread je nejprve vyfotografován digitální kamerou (A). Fotografie se signálem je poté zpracována v Adobe Photoshopu (B,C,D). Nejprve je je obraz invertován a je vybrána vyhodnocovaná oblast (B). Obraz je poté přefiltrován aplikací „otisk“ (C) a tento přefiltrovaný obraz je poté využit k odstranění nežádoucího pozadí v původním obrázku (D). Obrázek je uložen, vyhodnocen v programu Image J (E) a následně v programu Microsoft Excel.

Interfázní jádra

Vyhodnocení interfázních jader je detailně popsáno v publikaci Mistrík et al., (2009) (Mistrík et al., 2009) . Imunofluorescenční vyhodnocení 8-oxoG bylo modifikováno na měření celojaderného signálu.

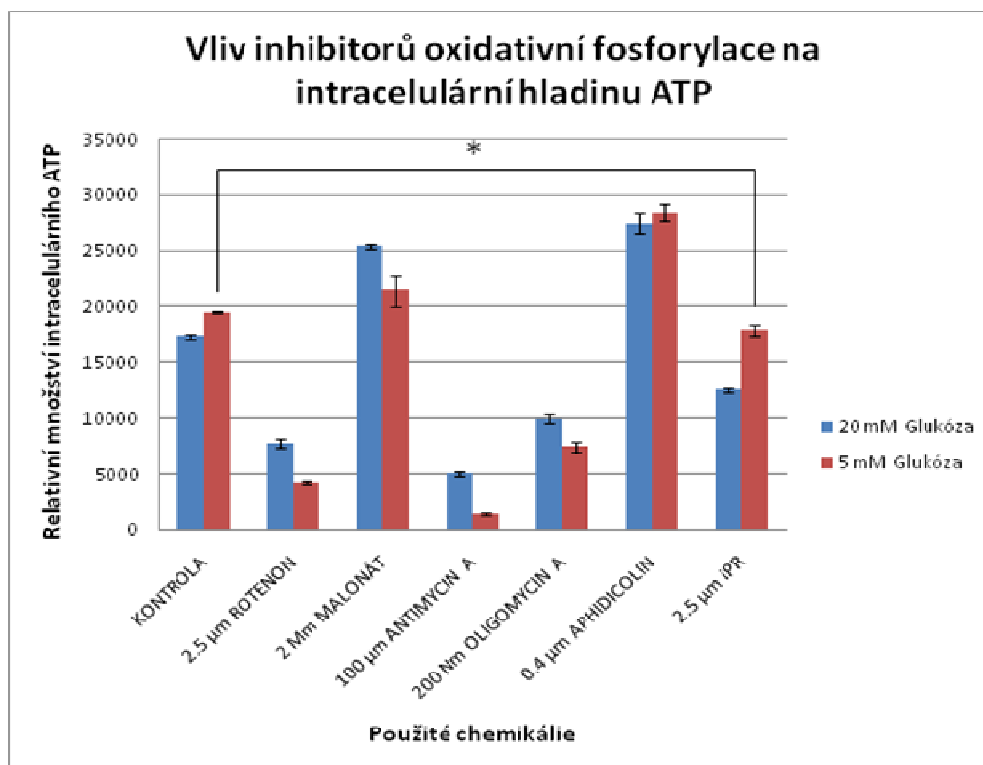
4.4 Použité přístroje

Při provedení experimentů byly použity následující přístroje: flow box (Gelaide Flow Laboratories), inkubátor (Heraeus), centrifuga (Jouan), vyvolávací automat snímků XR24PRO (Dürr Dental), světelný mikroskop CKX41 (Olympus), suchá lázeň (Major Science), průtokový cytometr FACSCalibur™ (BD Biosciences), ultrazvukový homogenizátor Sonoplus 2200 (Bandelin), spektrofotometr Helios β (Spectronic Unicam), blotovací aparatura (OWL HEP-1, Thermo Scientific), fluorescenční mikroskop BX50-F3 (Olympus), kobaltový, luminometr Reader Synergy HT (BioTek), digitální kamera Cool Snap HQ² (Photometrics).

5 Výsledky

5.1 Rotenon, Antimycin A a Oligomycin A snižují množství intracelulárního ATP u buněčné linie MRC-5 *in vitro*

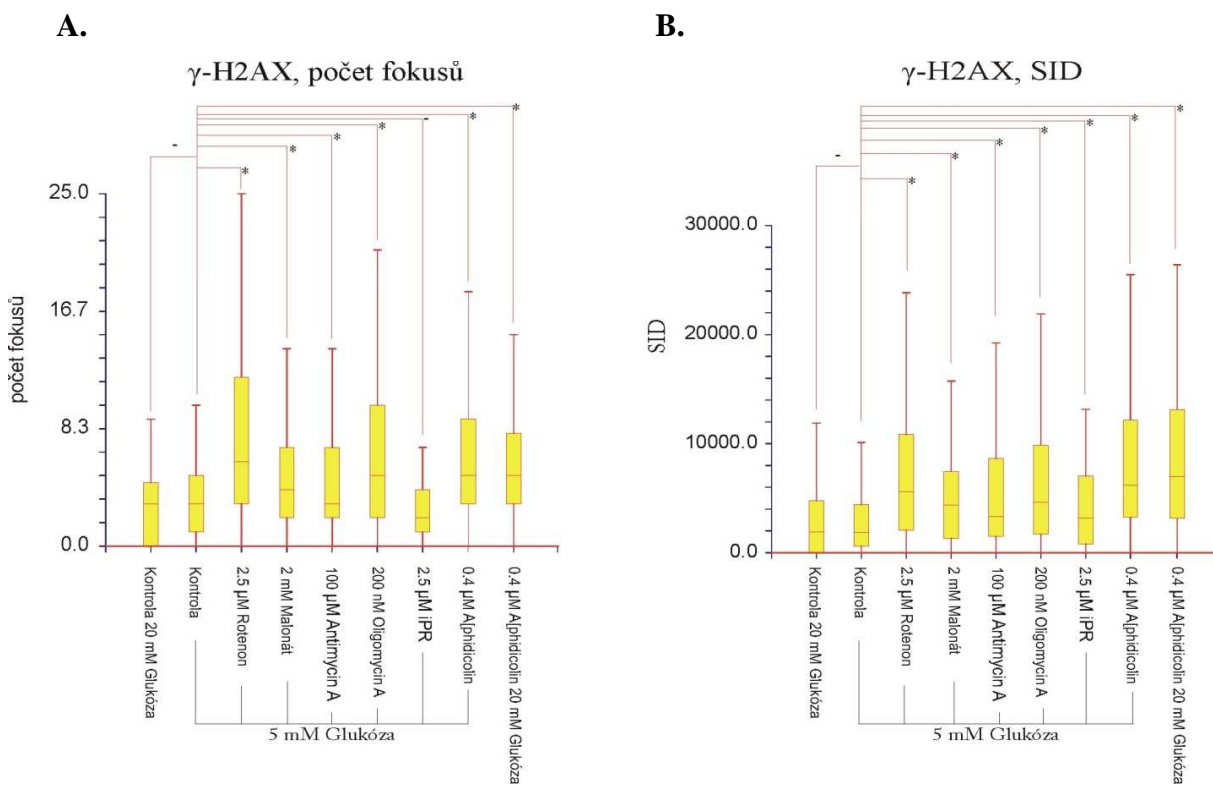
K testování hypotézy, že snížení dostupnosti intracelulárního ATP, v důsledku chemické inhibice oxidativní fosforylace, může interferovat s probíhající replikací, bylo potřeba nejprve ověřit účinnost vybraných chemických inhibitorů. Hladina intracelulárního ATP byla měřena u buněčné linie MRC-5 kultivované jak v běžném kultivačním médiu, obsahujícím 20 mM glukózu, tak v modifikovaném médiu obsahujícím 5 mM glukózu. Hladina glukózy v médiu byla snížena z důvodu přiblížení se fyziologické hladině glukózy v organismu. Výsledky měření pro obě hladiny glukózy jsou shrnuty v grafu (Obrázek 15). 2,5 μM Rotenon, 100 μM Antimycin A a 200 nM Oligomycin A signifikantně snížily množství intracelulárního ATP vzhledem k negativní kontrole. Snížení bylo výraznější v médiu s 5 mM glukózou. Malonát, nejen že množství intracelulárního ATP nesnížil, naopak došlo k jeho zvýšení. Tento výsledek u malonátu vyšel u testované buněčné linie opakovaně a na základě dostupné literatury se ho nepodařilo vysvětlit. Aphidicolin, inhibitor DNA polymeráz α , δ a ϵ (Cheng a Kuchta, 1993) byl v experimentu použit k prokázání faktu, že probíhající replikace významně spotřebovává ATP. Tato hypotéza se potvrdila, došlo k výraznému nárůstu ATP v buňkách exponovaných APH a to i v koncentraci (0,4 μM), která replikaci pouze zpomaluje. Jako další kontrolní látka byl použit iPR, který by měl na základě studia dostupné literatury snižovat hladinu intracelulárního ATP nezávisle na oxidativní fosforylaci či glykolýze (Ishii et al., 2002; Mlejnek and Doležel 2005).



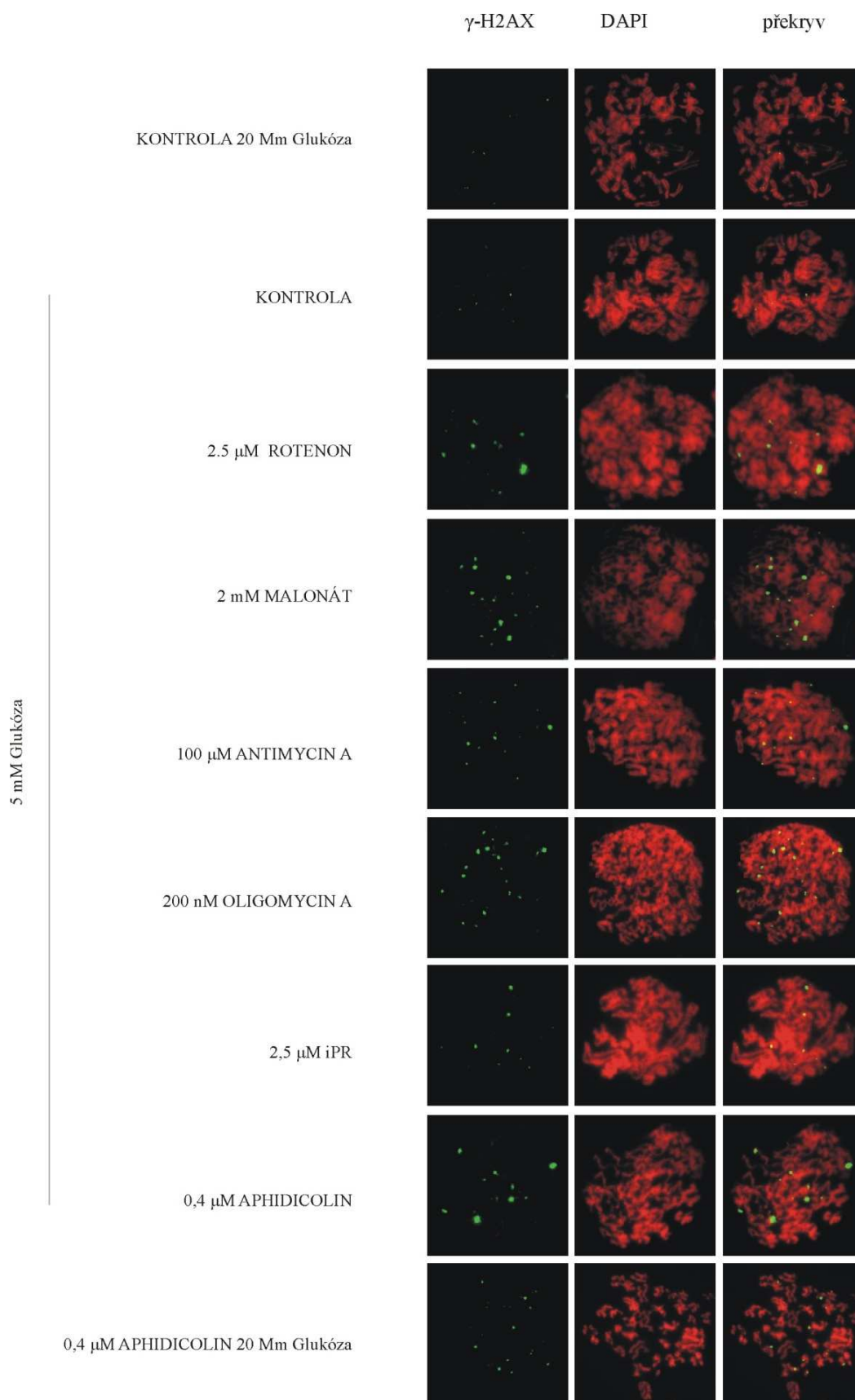
Obr. 15 Grafické vyjádření relativního intracelulárního množství ATP po 24 h trávení inhibitory oxidativní fosforylace (OXPHOS).

5.2 Vybrané chemické inhibitory OXPHOS indukují zvýšenou mitotickou fragilitu u primární buněčné linie MRC-5 *in vitro*

Mitotická fragilita je indukována replikačním stresem (Burhans and Weinberger, 2007) a lze ji využít jako indikátor míry tohoto stresu (Glover et al., 2005). Míra mitotické fragility u buněčné linie MRC-5 byla analyzována metodou imunofluorescenční detekce γ -H2AX (marker DSB), po aplikaci látek, vedoucí ke snížení intracelulární koncentrace ATP. Hypotéza předpokládá, že probíhající replikace může být náhlým poklesem ATP negativně ovlivněna a projeví se zpomalením a nestabilitou replikačních vidliček. Jako pozitivní kontrola byl použit 0,4 μ M APH, zavedený induktor replikačního stresu a mitotické fragility. Výsledky experimentu jsou zhrnuty v grafech na Obrázku 16. Aplikace rotenonu, malonátu, antimycinu A i oligomycinu A prokázaly signifikantní nárůst mitotické fragility u linie MRC-5. iPR sice neprokázal nárůst mitotické fragility, z předchozího experimentu však vyplývá, že není příliš účinný ve snižování intracelulárního ATP. Příklady vyhodnocovaných metafázních spreadů jsou uvedeny na obrázku 17.



Obr. 16 Grafické vyjádření poškození DNA v mitotických buňkách buněčné linie MRC-5 formou *BoxPlot*. Vyhodnoceno na základě počtu fokusů γ -H2AX (A) a na základě signálu integrované density jednotlivých fokusů γ -H2AX (B). * rozdíl je signifikantní (hladina významnosti 1 %); - rozdíl není signifikantní; každý plot představuje minimálně 50 mitotických spreadů

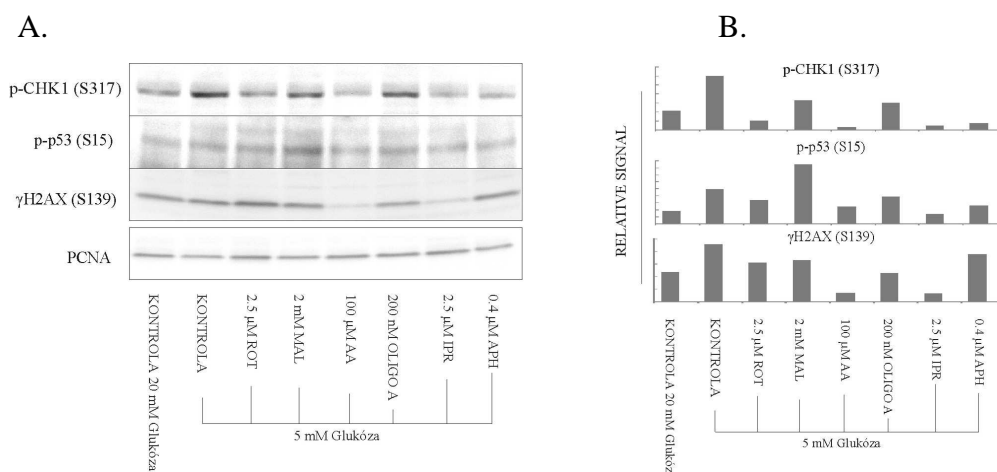


Obr. 17 Příklady vyhodnocovaných metafázích spreadů s neporušeným γ -H2AX epitopem

5.3 Analýza markerů DNA poškození způsobeného inhibicí OXPPOS u primární linie MRC-5 *in vitro*

Po prokázání zvýšené mitotické fragility, byl pomocí WB analyzován panel imunochemických markerů. Jelikož lze spekulovat, že prokázaná mitotická fragilita může být také důsledkem nárůstu oxidativního stresu, který dle některých pramenů může způsobit i indukovaná dysfunkce mitochondrií (Klungland and Bjelland, 2007; Saybasili et al., 2001), byly voleny markery relevantní pro replikační stres (p-CHK1) a oxidativní stres (celkový γ -H2AX a p-p53). Hypotéza předpokládala nárůst fosforylované kinázy CHK1, zatímco míra celkového poškození DNA by měla zůstat relativně nízká (stejně tak míra fosforylovaného p53), jak je typické pro replikační stres, zatímco u oxidativního stresu se množství fosforylovaného γ -H2AX a p53 výrazně zvyšuje. Výsledek experimentu je shrnut na obrázku 18. Efekt zkoumaných látek na míru fosforylované CHK1 není příliš konkluzivní, protože pozitivní kontrola (APH) nezpůsobila signifikantní nárůst fosforylované formy tohoto proteinu.

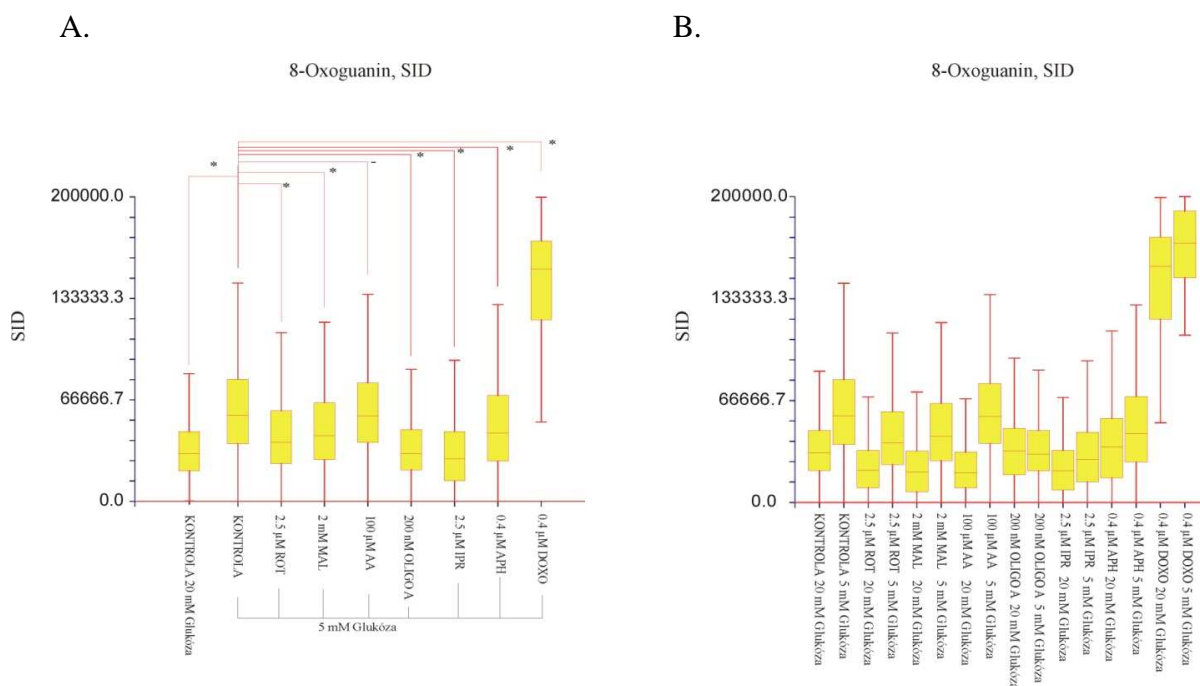
Nárůst signálu γ -H2AX je u aplikovaných látek celkově minimální (stejně tak p-p53), svědčící o tom, že buňky pravděpodobně netrpí nárůstem oxidativního stresu (vztaženo na APH).



Obr. 18 A. Western blot analýza vybraných markerů DNA poškození po 24 h trávění inhibitory OXPPOS. B. Kvantitativní vyhodnocení integrované denzity signálu jednotlivých markerů DNA poškození. Signál vztažen na množství naneseného proteinu PCNA; zkratky: ROT – rotenon; MAL – malonát; AA – antimycin A; OLIGO A – oligomycin A; iPR - N6-isopentenyladenosin; APH – aphidicolin

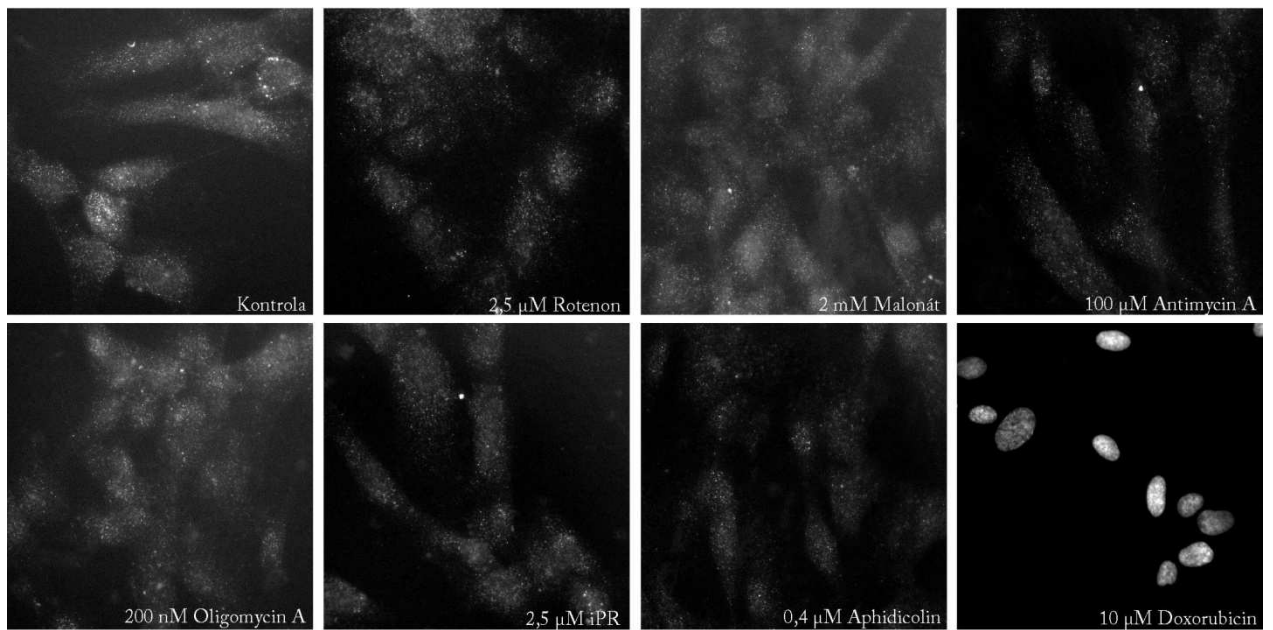
5.4 Inhibice OXPHOS vybranými chemickými inhibitory neindukuje nárůst produkce 8-oxoguaninu v jaderné DNA

Pro vyloučení možnosti, že zvýšená mitotická fragilita je způsobena oxidativním, nikoliv replikačním stresem, byla zvolena metoda analýzy míry 8-oxo-guaninu v jaderné DNA u primární buněčné linie MRC-5 po aplikaci vybraných inhibitorů OXPHOS. Kvantifikace 8-oxoG byla postavena na analýze digitálního obrazu imunofluorescenčního signálu. Výsledky experimentu jsou shrnuty na obrázku **19** a ukázky vyhodnocovaných vzorků jsou uvedeny na obrázku **20**. Jako pozitivní kontrola byl zvolen 10 μ M doxorubicin, významný induktor oxidativního stresu (Mizutani et al., 2005). Rotenon, malonát a oligomycin a, významně snížili míru oxidativního stresu. Došlo také k významnému snížení v případě iPR. Jedině antimycin A nevykázal významný efekt na míru signálu 8-oxoG. Experiment navíc prokázal významný nárůst oxidativního stresu v případě přechodu z kultivace v médiu s 20 mM glukózou na 5 mM glukózu, čímž se potvrdil předcházející WB experiment.

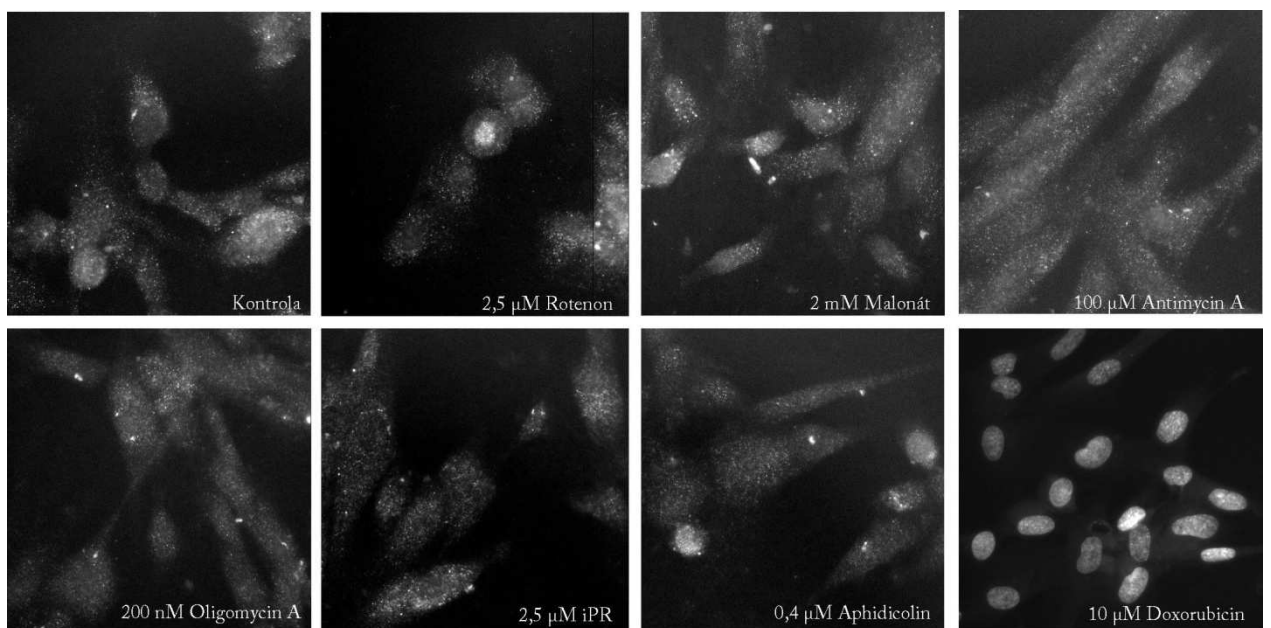


Obr. 19 Grafické vyjádření integrované denzity jaderného signálu 8-oxoG u buněčné linie MRC-5 formou BoxPlot. A. Srovnání integrované denzity jaderného signálu 8-oxoG u buněk MRC-5, kultivovaných v kultivačním médiu s 5 mM glukózou in vitro, trávených 24 h vybranými inhibitory OXPPOS B. Srovnání integrované denzity jaderného signálu 8-oxoG u buněk MRC-5, kultivovaných v kultivačním médiu s 20 mM a 5 mM glukózou in vitro, trávených 24 h vybranými inhibitory OXPPOS. * rozdíl je signifikantní (hladina významnosti 1 %); - rozdíl není signifikantní; zkratky: ROT – rotenon; MAL – malonát; AA – antimycin A; OLIGO A – oligomycin A; iPR - N6-isopentenyladenosin; APH – aphidicolin; každý plot představuje minimálně 200 hodnocených buněčných jader

A.



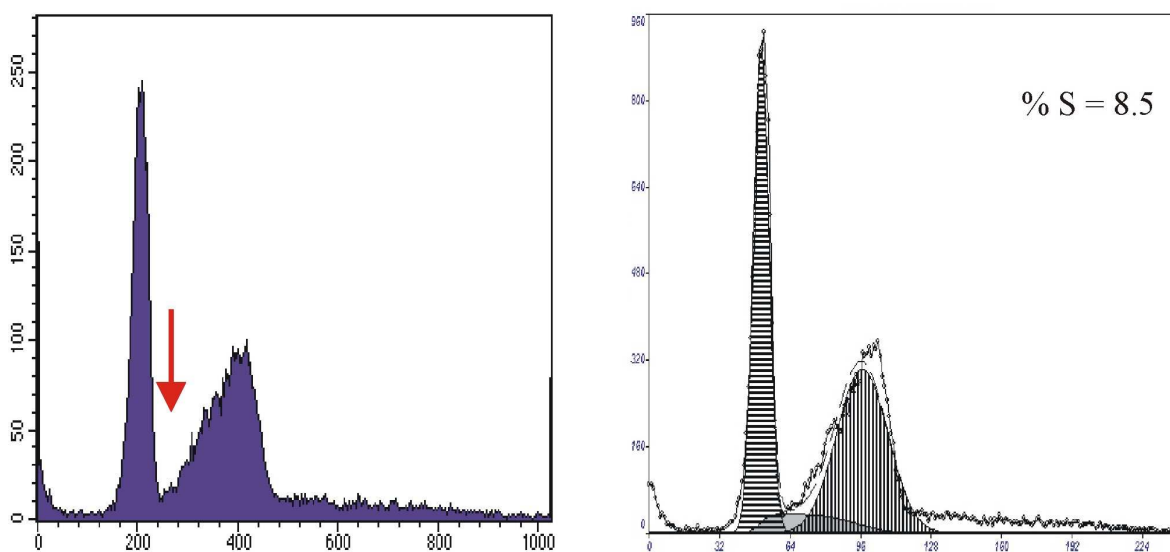
B.



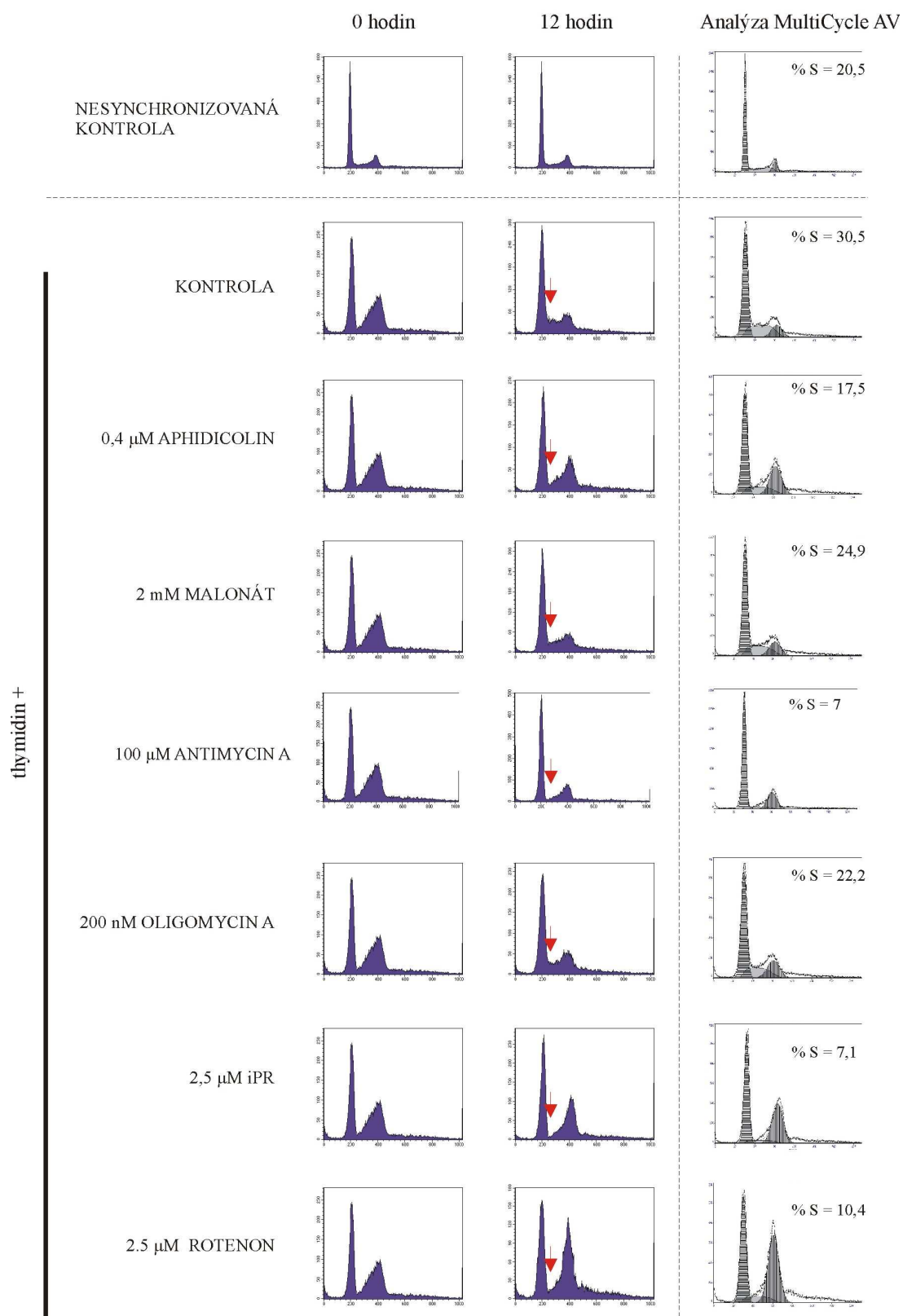
Obr. 20 Příklady buněk MRC-5 vyhodnocovaných na základě integrované density jaderného signálu 8-oxoG. Imunofluorescenční detekce 8-oxoG. A. 20 mM glukóza B. 5 mM glukóza.

5.5 Vybrané chemické inhibitory OXPPOS způsobují zpomalení S fáze

Jako další experimentální přístup, podporující teorii, že prokázaná zvýšená mitotická fragilita, u buněk vystavených působení inhibitorů oxidativní fosforylace a/nebo způsobujících pokles intracelulárního ATP, je způsobena zpomalením replikace (replikačním stresem) byla provedena analýza buněčného cyklu na synchronizované MRC-5 buněčné linii, vystavené působení těchto látek po dobu 12 hodin. Buňky byly nejprve synchronizovány 24 hodinovou aplikací tymidinu, který způsobil významný pokles buněk v rané S fázi a zablokování buněčného cyklu v G1, v pozdní S a v G2 fázi (Obrázek 21). Po znovu vypuštění buněk do proliferace (vymytí tymidinu) byly buňky exponovány studovaným chemickým látkám po dobu 12 hodin. Množství S fázových buněk bylo vyhodnoceno analýzou buněčného cyklu v programu Multicycle AV. Výsledky experimentu shrnuje obrázek 22. V případě všech užitých chemických látek došlo ke snížení množství S fázových buněk ve srovnání s kontrolou. Nejméně účinným se z tohoto hlediska jeví malonát, který zároveň prokázal nejmenší schopnost snižovat hladinu intracelulárního ATP.



Obr. 21 Efekt aplikace (24 hodin) tymidinu na buněčnou linii MRC-5. Červená šipka značí patrný úbytek raně S fázových buněk; Pravá část obrázku znázorňuje analýzu v programu Multicycle AV



Obr. 22 Analýza vlivu vybraných chemických inhibitorů OXPHOS na buněčný cyklus měřená pomocí FACS profilu. Červené šipky označují množství buněk naměřených v S fázi; osa y znázorňuje počet buněk, osa x znázorňuje množství DNA

6 Diskuse

Genetická nestabilita rakovinných buněk je často spojována s replikačním stresem. Replikační stres je definován jako neefektivní DNA replikace, způsobující zpomalení či zastavení replikačního aparátu a může být způsoben mnoha vnějšími a vnitřními faktory, doprovázejících nádorovou transformaci. Jedním z hlavních znaků nádorové transformace je přitom zásadní změna metabolismů cukrů, přechod z oxidativní fosforylace na glykolýzu. Spojitost metabolické změny rakovinných buněk a replikačního stresu nebyla dosud detailně studována a mechanismus inhibice oxidativní fosforylace nádorovými buňkami také není dosud plně objasněn. Důležitá je přitom otázka, zda buňka zásadně mění metabolismus vlivem zvýšené genetické nestability, hypoxie a dalších znaků provázejících nádorovou transformaci, nebo může v případě ztráty mechanismu oxidativní fosforylace nebo úplné dysfunkce mitochondrií na aerobní glykolýzu přecházet, a tím způsobovat nestabilitu genomu či replikační stres. Navíc nebylo stále prokázáno, zda je zvýšená genetická nestabilita příčinou vzniku rakoviny či je indukována v důsledku vzniku a progresu nádoru. V této diplomové práci jsem se snažil prokázat případnou spojitost metabolického zvratu rakovinných buněk, jakožto charakteristického znaku, doprovázejícího většinu transformovaných buněk a vzniku genetické nestability, taktéž jednoho z hlavních znaků rakoviny. Zaměřil jsem se proto na inhibici oxidativní fosforylace, která je v případě nádorového metabolismu také potlačována, avšak stále není detailně prostudováno jakými mechanismy, a její spojitosti s expresí fragilních míst v podobě mitotických zlomů, jež jsou typickým znakem, doprovázející zvýšený replikační stres. Jak bylo popsáno, vlivem hypoxie a některých jiných forem metabolického stresu, jako je například deficiencie folátu či tymidinu, dochází k specifické expresi fragilních míst, jež jsou často popisovány ve spojitosti s replikačním stresem (Coquelle et al., 1998; Durkin and Glover, 2007; Zhu et al., 2006). Inhibice oxidativní fosforylace a z ní vyplývající pokles intracelulární hladiny ATP by mohl mít podobný efekt, podílející se na indukci DNA poškození skrze replikační stres.

Z mých výsledků, prezentovaných v této diplomové práci vyplývá, že inhibice oxidativní fosforylace (OXPHOS) látkami interferujícími s proteinovými komplexy elektron transportního řetězce mitochondrií (ETC), způsobují, až na výjimku v podobě malonátu, inhibitoru komplexu II, pokles hladiny intracelulárního ATP u netransformovaných buněk. Malonát neměl na hladinu intracelulárního ATP vliv

opakovaně. Na základě dostupné literatury se však tento výsledek nepodařilo vysvětlit. Je možné, že malonát jako kompetitivní inhibitor komplexu II ETC není v důsledku tak účinný jako jiné použité chemikálie. Je třeba také podotknout, že efekt chemických inhibitorů na pokles hladiny ATP se výrazněji projevil až po snížení koncentrace glukózy v kultivačním médiu na 5 mM, což je koncentrace blížíící se fyziologické koncentraci glukózy v organismu. Je možné, že v případě nadbytku glukózy, jak je to běžné u kultivačních médií, buňka nereaguje na ztrátu systémů oxidativní fosforylace. Glykolýza je velmi rychlá metabolická dráha a nadbytek glukózy by mohl buňce zprostředkovávat dostatečné množství energie ve formě ATP. Rozhodl jsem se proto kultivovat buněčnou linii MRC-5 v médiu s 5 mM glukózou a následující experimenty provádět na takto kultivované linii. Pokles hladiny ATP by však mohl mít zásadní efekt na replikační aparát. Navíc aphidicolin (APH), který byl při studiu hladiny intracelulárního ATP použit k prokázání faktu, že probíhající replikace významně spotřebovává ATP, potvrdil hypotézu, a při inhibici DNA polymeráz (Cheng and Kuchta, 1993) nedocházelo k výrazné spotřebě ATP, a naopak docházelo k významnému nárůstu intracelulárního ATP v buňkách exponovaných APH a to i v koncentraci (0,4 μ M), která replikaci pouze zpomaluje.

Jak již bylo zmíněno, mitotická fragilita je spojována s replikačním stresem (Burhans and Weinberger, 2007; Glover et al., 2005) a lze ji využít jako indikátoru míry tohoto stresu. Rozhodl jsem se proto využít metody imunofluorescenční detekce γ -H2AX (markeru DSB) na metafázních spredech. Po aplikaci látek, vedoucích ke snížení intracelulární koncentrace ATP došlo k významnému nárůstu mitotické fragility u linie MRC-5. Naopak iPR neprokázal významné zvýšení mitotické fragility. Mechanismus, kterým iPR snižuje hladinu intracelulárního ATP, však není dosud zcela objasněn (Mlejnek and Dolezel, 2005). I přesto, že pokles hladiny ATP po aplikaci iPR byl významný, nebyl navíc tak výrazný jako u látek inhibujících OXPHOS (s výjimkou malonátu). Jako pozitivní kontrola byl použit 0,4 μ M APH, zavedený induktor replikačního stresu a mitotické fragility. Mitotická fragilita způsobená APH navíc není náhodná. Studium exprese specifických fragilních míst v důsledku inhibice oxidativní fosforylace může být předmětem další studie.

Po prokázání zvýšené mitotické fragility, bylo dále potřeba vyvrátit, že prokázaná mitotická fragilita nemůže být způsobena také důsledkem nárůstu oxidativního stresu, který dle některých pramenů může způsobit i indukovaná dysfunkce mitochondrií

(Klungland and Bjelland, 2007; Saybasili et al., 2001). Abych ověřil mou hypotézu a vyvrátil možnost indukce mitotické fragility oxidativním stresem, provedl jsem imunochemickou detekci vybraných markerů, relevantních pro replikační stres (p-CHK1) a oxidativní stres (celkový γ -H2AX a p-p53). Hypotéza předpokládala nárůst fosforylované kinázy CHK1, zatímco míra celkového poškození DNA by měla zůstat relativně nízká (stejně tak míra fosforylovaného p53), jak je typické pro replikační stres, zatímco u oxidativního stresu se množství fosforylovaného γ -H2AX a p53 výrazně zvyšuje (Kastan and Bartek, 2004; Zou and Elledge, 2003). Efekt zkoumaných látek na míru fosforylované CHK1 nebyl však příliš konkluzivní, a to i z toho důvodu, že APH, jako pozitivní kontrola, nezpůsobil signifikantní nárůst fosforylované formy tohoto proteinu. Pravděpodobně nebyl zvolen správný časový interval (24 hodin), a účinek APH již přestal být na linii MRC-5 patrný (může se jednat o ochuzení v buněčné populaci o buňky S fáze). Přesto jsou patrné jisté výkyvy v množství p-CHK1, přičemž zajímavý je poměrně významný nárůst v případě kontroly kultivované v 5 mM glukóze oproti 20 mM glukóze, který koreluje také s nárůstem celkového γ -H2AX. Mohlo by se jednat o projev blíže nespecifikovaného stresu, kterému je buňka, pěstovaná v podmínkách *in vitro* vystavena, v případě užití média s nižší koncentrací glukózy. Lze spekulovat, že tento stres může souviset s vysokým obsahem kyslíku, kterému jsou buňky ve standardních *in vitro* kultivacích vystaveny, a jehož negativní efekt se projeví právě až po snížení hladiny glukózy v médiu.

Na druhou stranu, nárůst signálu γ -H2AX je u aplikovaných látek celkově minimální (stejně tak p-p53), svědčící o tom, že buňky pravděpodobně netrpí nárůstem oxidativního stresu (vztaženo na APH).

Podle mnoha publikací inhibice OXPHOS či úplná dysfunkce mitochondrií indukuje tvorbu ROS a zvyšuje míru oxidativního stresu (Esposito et al., 1999; Klungland and Bjelland, 2007; Saybasili et al., 2001). Pro vyloučení možnosti, že je zvýšená mitotická fragilita způsobena oxidativním, nikoliv replikačním stresem, byla zvolena metoda analýzy míry přítomnosti 8-oxo-guaninu, markeru oxidativního poškození DNA. Z mých výsledků vyplývá, že inhibice OXPHOS nejenom, že nezvyšuje produkci ROS a míru oxidativního stresu, ale u rotenonu, malonátu a oligomycinu a dokonce snižuje míru oxidativního poškození u jaderné DNA. Experiment navíc prokázal signifikantní nárůst oxidativního stresu v případě přechodu z kultivace v médiu s 20 mM glukózou na 5 mM glukózu. Na základě těchto dat lze usuzovat, že prokázaná zvýšená mitotická fragilita indukovaná aplikací OXPHOS inhibitorů či látek snižujících hladinu ATP nemůže být

důsledkem jaderného oxidativního stresu a podporuje hypotézu přímého ovlivnění replikace v důsledku poklesu intracelulárního ATP.

Jako další experimentální přístup, podporující teorii, že prokázaná zvýšená mitotická fragilita, u buněk vystavených působení inhibitorů oxidativní fosforylace a/nebo způsobujících pokles intracelulárního ATP, je způsobena zpomalením replikace (replikačním stresem) byla provedena analýza buněčného cyklu na synchronizované buněčné linii. V případě všech užitých chemických látek došlo ke snížení množství S fázových buněk ve srovnání s kontrolou. Významný nárůst G2/M frakce buněk u rotenonu lze přisuzovat jeho efektu na mikrotubuly dělicího vřeténka, způsobující zastavení buněk v mitóze (Srivastava and Panda, 2007). Na základě tohoto experimentu lze usuzovat, že vstup a progresse buněk S fázi je vlivem aplikací zkoumaných látek zpomalen. Tento fakt opět potvrzuje hypotézu, že by mohlo docházet k indukci replikačního stresu. Aphidicolin, zavedený induktor replikačního stresu a mitotické fragility, způsobuje podobný efekt vysvětlitelný zpomalením replikace.

Dohromady data prezentována v této diplomové práci podporují hypotézu, že by inhibice oxidativní fosforylace, a následný pokles intracelulárního ATP, mohl v důsledku způsobovat replikační stres v rané S fázi u netransformovaných buněk. Indukce replikačního stresu bude dále studována s využitím metod, přímo se zaměřujících na studium replikace jako je například DNA combing.

7 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu chemické inhibice oxidativní fosforylace na stabilitu genomu a indukci replikačního stresu. Hypotéza byla testována na primární buněčné linii plicních fibroblastů MRC-5. Z výsledků prezentovaných v této diplomové práci vyplývá, že inhibice oxidativní fosforylace na komplexu I, III a V způsobuje snížení hladiny intracelulárního ATP. Snížení intracelulárního ATP by mohlo mít vliv na probíhající replikaci, což je velmi energeticky náročný proces. Na základě této skutečnosti byla pomocí metody metafází spreadů s γ -H2AX epitopem testována mitotická fragilita. Je zřejmé, že inhibice oxidativní fosforylace indukuje zvýšenou mitotickou fragilitu u vybrané buněčné linie. Poškození systémů oxidativní fosforylace však na druhou stranu nezpůsobuje výrazné zvýšení aktivace markerů DNA poškození v celkové buněčné populaci. To by v důsledku mohlo znamenat specifické ovlivnění replikace DNA, odrážejícím se v indukci mitotické fragility. Dále bylo prokázáno, že poškození DNA v mitotických buňkách pravděpodobně není způsobeno zvýšenou indukcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Inhibice oxidativní fosforylace chemickými inhibitory nezvyšovala hladinu přítomného 8-oxoguaninu, markeru oxidativního stresu, vyvolaného produkcí ROS, v jaderné DNA. Navíc inhibice oxidativní fosforylace působila na buněčný cyklus podobným efektem, jako v případě aphidicolinu, což by mohlo znamenat, že nedostatek ATP, způsobuje zpomalení replikace DNA.

8 Seznam použité literatury

1. Airley, R., Loncaster, J., Davidson, S., Bromley, M., Roberts, S., Patterson, A., Hunter, R., Stratford, I., and West, C. (2001). Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin. Cancer Res.* 7, 928-934.
2. Allen, J.W., Khetani, S.R., Johnson, R.S., and Bhatia, S.N. (2006). In vitro liver tissue model established from transgenic mice: role of HIF-1alpha on hypoxic gene expression. *Tissue Eng* 12, 3135-3147.
3. Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238-245.
4. Bartek, J., and Mailand, N. (2006). TOPping up ATR activity. *Cell* 124, 888-890.
5. Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B., Henshaw, R., Rosen, B., and Hyman, B.T. (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 61, 1147-1150.
6. Betarbet, R., Sherer, T.B., Di Monte, D.A., and Greenamyre, J.T. (2002). Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol.* 12, 499-510.
7. Bifulco, M., Malfitano, A.M., Proto, M.C., Santoro, A., Caruso, M.G., and Laezza, C. (2008). Biological and pharmacological roles of N6-isopentenyladenosine: an emerging anticancer drug. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 200-204.
8. Branzei, D., and Foiani, M. (2009). The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair (Amst)* 8, 1038-1046.
9. Burhans, W.C., and Weinberger, M. (2007). DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.* 35, 7545-7556.
10. Casciari, J.J., Sotirchos, S.V., and Sutherland, R.M. (1992). Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. *J. Cell Physiol* 151, 386-394.
11. Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F., and Glover, T.W. (2002). ATR regulates fragile site stability. *Cell* 111, 779-789.
12. Chauvin, C., De, O.F., Ronot, X., Mousseau, M., Lerverve, X., and Fontaine, E. (2001). Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J. Biol. Chem.* 276, 41394-41398.

13. Cheng, C.H., and Kuchta, R.D. (1993). DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry* 32, 8568-8574.
14. Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230-233.
15. Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616-627.
16. Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A., and Debatisse, M. (1998). A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol. Cell* 2, 259-265.
17. Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
18. Dasu, A., Toma-Dasu, I., and Karlsson, M. (2003). Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Phys. Med. Biol.* 48, 2829-2842.
19. David, S.S., O'Shea, V.L., and Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.
20. Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 54-61.
21. Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* 8, 705-713.
22. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bersimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G., and d'Adda di, F.F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
23. Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 225-242.
24. Durkin, S.G., and Glover, T.W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* 41, 169-192.
25. Durocher, D., and Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 225-231.
26. Esposito, L.A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B.A., and Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4820-4825.

27. Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605-611.
28. Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S.W., and Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109, 3812-3819.
29. Fulda, S., and Debatin, K.M. (2007). HIF-1-regulated glucose metabolism: a key to apoptosis resistance? *Cell Cycle* 6, 790-792.
30. Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891-899.
31. Glover, T.W., Arlt, M.F., Casper, A.M., and Durkin, S.G. (2005). Mechanisms of common fragile site instability. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No. 2, R197-R205.
32. Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 18, 165-173.
33. Han, Y.H., Kim, S.H., Kim, S.Z., and Park, W.H. (2008). Antimycin A as a mitochondria damage agent induces an S phase arrest of the cell cycle in HeLa cells. *Life Sci.* 83, 346-355.
34. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
35. Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28, 739-745.
36. Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* 40, 209-235.
37. Hawkins, R.A., and Phelps, M.E. (1988). PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 7, 119-142.
38. He, Z., Henriksen, L.A., Wold, M.S., and Ingles, C.J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374, 566-569.
39. Ishii, Y., Hori, Y., Sakai, S., and Honma, Y. (2002). Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ.* 13, 19-26.
40. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., and Semenza, G.L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162.

41. Jackson, S.P., and Jeggo, P.A. (1995). DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem. Sci.* 20, 412-415.
42. Jeggo, P.A., Taccioli, G.E., and Jackson, S.P. (1995). Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *Bioessays* 17, 949-957.
43. Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
44. Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14973-14977.
45. Klungland, A., and Bjelland, S. (2007). Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* 6, 481-488.
46. Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Harris, A.L., and Sivridis, E. (2006). Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 66, 632-637.
47. Kunz, M., and Ibrahim, S.M. (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol. Cancer* 2, 23.
48. Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (2006). Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif.* 39, 231-240.
49. Laginha, K.M., Verwoert, S., Charrois, G.J., and Allen, T.M. (2005). Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin. Cancer Res.* 11, 6944-6949.
50. Lavin, M.F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7749-7758.
51. Lee, K., Roth, R.A., and LaPres, J.J. (2007). Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 229-246.
52. Lieber, M.R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283, 1-5.
53. Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 127-133.
54. Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J.M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* 67, 9013-9017.

55. Marcelain, K., De La Torre, C., Gonzalez, P., and Pincheira, J. (2005). Roles of nibrin and AtM/ATR kinases on the G2 checkpoint under endogenous or radio-induced DNA damage. *Biol. Res.* 38, 179-185.
56. Matsuno-Yagi, A., and Hatefi, Y. (1993). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F₀ by venturicidin and organotin compounds. *J. Biol. Chem.* 268, 6168-6173.
57. Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001a). Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 293-299.
58. Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001b). The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 502, 365-376.
59. Milosevic, M., Fyles, A., Hedley, D., and Hill, R. (2004). The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Semin. Radiat. Oncol.* 14, 249-258.
60. Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., and Caro, J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* 277, 6183-6187.
61. Mistrik, M., Oplustilova, L., Lukas, J., and Bartek, J. (2009). Low-dose DNA damage and replication stress responses quantified by optimized automated single-cell image analysis. *Cell Cycle* 8, 2592-2599.
62. Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., and Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76, 1439-1453.
63. Mlejnek, P., and Dolezel, P. (2005). Apoptosis induced by N6-substituted derivatives of adenosine is related to intracellular accumulation of corresponding mononucleotides in HL-60 cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 985-990.
64. Pergola, F., Zdzienicka, M.Z., and Lieber, M.R. (1993). V(D)J recombination in mammalian cell mutants defective in DNA double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* 13, 3464-3471.
65. Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504-507.
66. Richards, R.I. (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics* 17, 339-345.
67. San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229-257.

68. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39-85.
69. Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-514.
70. Saybasili, H., Yuksel, M., Haklar, G., and Yalcin, A.S. (2001). Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices. *Antioxid. Redox. Signal.* 3, 1099-1104.
71. Shchepina, L.A., Pletjushkina, O.Y., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Fetisova, E.K., Izyumov, D.S., Saprunova, V.B., Vyssokikh, M.Y., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2002). Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 8149-8157.
72. Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3, 901-908.
73. Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14, 289-300.
74. Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247-258.
75. Spadari, S., Foher, F., Sala, F., Ciarrocchi, G., Koch, G., Falaschi, A., and Pedrali-Noy, G. (1985). Control of cell division by aphidicolin without adverse effects upon resting cells. *Arzneimittelforschung.* 35, 1108-1116.
76. Srivastava, P., and Panda, D. (2007). Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J.* 274, 4788-4801.
77. Stubblefield, E., Klevecz, R., and Deaven, L. (1967). Synchronized mammalian cell cultures. I. Cell replication cycle and macromolecular synthesis following brief colcemid arrest of mitosis. *J. Cell Physiol* 69, 345-353.
78. Sutherland, G.R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197, 265-266.

79. Treznik, K., Smith, E., Smith, S., and Costanzo, V. (2006). ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J.* 25, 1764-1774.
80. Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol* 552, 335-344.
81. Tzagoloff, A. (1970). Assembly of the mitochondrial membrane system. 3. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity-conferring protein of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245, 1545-1551.
82. Vermeulen, K., Strnad, M., Havlicek, L., Van, O.H., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2002). Plant cytokinin analogues with inhibitory activity on cyclin-dependent kinases exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis initiated by the mitochondrial pathway: determination by a multiparametric flow cytometric analysis. *Exp. Hematol.* 30, 1107-1114.
83. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5510-5514.
84. Wyman, C., and Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 40, 363-383.
85. Yu, T., MacPhail, S.H., Banath, J.P., Klovov, D., and Olive, P.L. (2006). Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst)* 5, 935-946.
86. Zhu, Y., McAvoy, S., Kuhn, R., and Smith, D.I. (2006). RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene* 25, 2901-2908.
87. Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M., and McIntosh, J.R. (1980). Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. *Nocodazole accumulated mitotic cells. Exp. Cell Res.* 126, 397-405.
88. Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

9 Seznam použitých zkratek

8-oxoG/A - 8-oxoguanin/adenin
53BP1 - 53-Binding Protein 1
ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP – adenosin trifosfát
ATR - ATM- and Rad3-Related
bax – Bcl2-associated X protein
BER - base excision repair
BRCA 1, 2 - Breast Cancer 1, 2
CBP – CREB binding protein
CDK - cyklin dependentní kináza
CFS – common fragile site
Chk1 – Checkpoint Kinase 1
Chk2 - Checkpoint Kinase 2
COX – cytochrom c oxidáza
CREB – cAMP responsive element binding protein
DDR – DNA damage response
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs - DNA - Dependent Protein Kinase control subunit
dNTP - dinukleotidtrifosfát
DSB – double strand break
ETC – elektron transportní řetězec
FDG-PET – fluorodeoxyglukóza – pozitronová emisní tomografie
FH – fumarát hydratáza
FIH-1 - faktor inhibující HIF
GLUT – glukózový transportér
HIF-1 – Hypoxia Inducible Factor-1
HK - hexokináza
HR - homologous recombination
HRE – hypoxia responsible elements
iPR - N6-isopentenyladenosin
LDH – laktát dehydrogenáza

LONP1 – LON proteáza 1
MCTA - monokarboxylátový transportér
Mdc1 - Mediator of DNA damage checkpoint 1
Mre11 - Meiotic Recombination 11
MRN komplex - Mre11-Rad50-Nbs1
mtDNA - mitochondriální DNA
MXI1 - MAX-interacting protein 1
NADH - nikotinamid adenin dinukleotid redukovaný
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukovaný
Nbs1 - Nijmegen Breakage Syndrome 1
NER - Nucleotide Excision Repair
NHEJ - non-homologous end-joining
ODD – oxygen dependent degradation domain
OXPHOS – oxidativní fosforylace
PCNA - Proliferating cell nuclear antigen
PDH – pyruvát dehydrogenáza
PDK1 - pyruvát dehydrogenáza kináza 1
PEP – fosfoenolpyruvát
PFK1 - fosfofruktokináza 1
PFKFB - 6-fosfofruko-2-kináza/fruktóza 2,6-bisfosfatáza
PGK - fosfoglycerát kináza
PGI - fosfoglukóza izomeráza
PGM - fosfoglycerát mutáza
PHD - kyslík-dependentní prolyl hydroxyláza
PI3K - fosfatidilinositol-3 kináza
PK – pyruvát kináza
PTEN – phosphatase and tensin homolog
ROS – reaktivní kyslíkové radikály
RPA - Replication protein A
RFC - Replication factor C
SDH – sukcinát dehydrogenáza
SMC1 - Structural Maintenance of Chromosomes 1
SRC – Rous sarcoma oncogene

SSB -single strand break

TFAM – transkripční faktor A

TopBP1 - Topoisomerase Binding Protein 1

TPI - triózafosfát izomeráza

V(D)J - Variable Diversity Joining Recombination

VHL – von Hippel-Lindau protein