

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Anna Kabotová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Metody detekce replikační aktivity
lidských buněk a standardizace
jejich použití pro analýzu buněčného
cyklu**

Bakalářská práce

Anna Kabotová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Anna KABOTOVÁ
Osobní číslo: R17786
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Metody detekce replikační aktivity lidských buněk a standardizace jejich použití pro analýzu buněčného cyklu
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cílem práce studenta je porovnání základních přístupů používaných pro detekci DNA replikace z hlediska velikosti a specifity signálu a možnosti současné detekce dalších buněčných proteinů včetně fluorescenčně značených proteinů. Současně bude úkolem studenta porovnání jednotlivých metod z hlediska možnosti jejich použití pro analýzu buněčného cyklu. Důležitou částí bakalářské práce je vypracování literární rešerše týkající se základních přístupů používaných pro detekci DNA replikace.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- 1.Ligasová A., Koberna K. (2018) DNA Replication: From Radioisotopes to Click Chemistry. *Molecules*. 2018 Nov; 23(11): 3007.
- 2.Dimitrova D.S., Be-rezney R. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J. Cell Sci.* 2002;115:4037-4051.
- 3.Kennedy B.K., Barbie D.A., Classon M., Dyson N., Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev.* 2000;14:2855-2868.
- 4.Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105:2415-2420.
- 5.Ligasová A., Konečný P., Frydrych I., Koberna K. Looking for ugly ducklings: The role of the stability of BrdU-antibody complex and the improved method of the detection of DNA replication. *PLoS ONE.* 2017;12:e0174893.
- 6.Ligasová A., Konečný P., Frydrych I., Koberna K. Cell cycle profiling by image and flow cytometry: The optimised protocol for the detection of replicational activity using 5-Bromo-2-deoxyuridine, low concentration of hydrochloric acid and exonuclease III. *PLoS ONE.* 2017;12:e0175880.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Anna Ligasová, PhD.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 15. března 2019
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 21. března 2019

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Anna Kabotová
Název práce	Metody detekce replikační aktivity lidských buněk a standardizace jejich použití pro analýzu buněčného cyklu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	Replikace DNA, modifikované nukleosidy a nukleotidy, buněčný cyklus, imunofluorescence, obrazová cytometrie
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

SOUHRN

Předkládaná práce poskytuje přehled několika metod používaných pro detekci replikační aktivity buněk s využitím modifikovaných nukleosidů (5-bromo-2'-deoxyuridinu, BrdU a 5-etynyl-2'-deoxyuridinu, EdU) a nukleotidu (biotin-16-deoxyuridin-5'-trifosfátu). Součástí práce je porovnání těchto metod s ohledem na možnost provedení následné analýzy buněčného cyklu, na sílu poskytovaného signálu a na jejich vliv na fluorescenci fluorescenčních proteinů. Sledované metody byly testovány na pěti lidských buněčných liniích.

Výsledky ukázaly, že z testovaných metod byl pro analýzu replikační aktivity a současně analýzu buněčného cyklu buněk nejvhodnější nukleosid EdU, který je detekován klikací reakcí. Naopak nejméně vhodnou metodou bylo použití BrdU v kombinaci s jeho odhalením ve struktuře DNA pomocí 4 N HCl. Tento způsob vedl k denaturaci DNA, což znemožnilo následnou analýzu buněčného cyklu. Pro současnou lokalizaci fluorescenčních proteinů byla nejvhodnější metoda založená na BrdU a působení nukleáz.

Bibliographical identification

Autor's first name surname	Anna Kabotová
Title	Methods for the detection of replicational activity of human cells and standardization of their use for cell cycle analysis
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	RNDr. Anna Ligasová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	DNA replication, modified nucleosides and nucleotides, cell cycle, immunofluorescence, image cytometry
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

The thesis presented provides a review of several methods used for the detection of cellular replicational activity by modified nucleosides (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU and 5- ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) and nucleotide (biotin-16-deoxyuridine-5'-triphosphate). A part of the thesis concerns the comparison of these approaches with respect to the possibility of subsequent cell cycle analysis, the signal strength and their impact on the fluorescence of the fluorescence proteins as well. The investigated methods were tested on five human cell lines.

The results showed that nucleoside EdU detected by click reaction was the most suitable nucleoside for analysis of replicational activity and the concurrent cell cycle analysis. On the other hand, the least suitable approach represents the use of BrdU in combination with its revelation in DNA structure by 4 N HCl. This method led to the DNA denaturation making impossible the subsequent analysis of the cell cycle. Method based on BrdU and nucleases treatment emerged as the most convenient for the simultaneous analysis of fluorescent proteins.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Anny Ligasové, Ph.D., za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Podpis.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Anně Ligasové, Ph.D., za odborné vedení, konzultace a trpělivost při psaní mé práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Karlu Kobernovi, CSc., za seznámení s prací s fluorescenčním mikroskopem a paní laborantce Monice Masopustové za pomoc s laboratorními postupy. Tato práce byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví ČR (č. 15-31604A), projektem Technologické agentury ČR (č. TN01000013) a projektem Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt ENOCH (reg. č. : CZ.02.1.01/0.0/16_019/0000868).

OBSAH

Seznam symbolů a zkratk	vii
Seznam obrázků	ix
Seznam tabulek	x
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Organizace DNA	3
3.2 Replikace DNA.....	4
3.2.1 Replikace DNA v buněčném cyklu.....	4
3.2.2 Replikace jaderné DNA	5
3.2.3 Replikace telomer	9
3.2.4 Replikace mitochondriální DNA	10
3.3 Metody vizualizace syntézy DNA	11
3.3.1 Detekce syntézy DNA pomocí radioisotopů.....	12
3.3.2 Detekce syntézy DNA pomocí halogenových analogů nukleosidů.....	12
3.3.3 Detekce syntézy DNA pomocí EdU	14
3.3.4 Detekce syntézy DNA pomocí analogů nukleotidů.....	14
3.3.5 Ostatní způsoby detekce syntézy DNA.....	15
3.4 Nejčastější způsoby analýzy molekul používaných pro detekci replikace DNA	16
3.4.1 Fluorescenční mikroskopie	16
3.4.1.1 Fluorescenční barviva.....	17
3.4.1.2 Imunofluorescence jako nástroj pro detekci replikace DNA.....	17
3.4.2 Průtoková cytometrie	18
4 Materiál a metody.....	20
4.1 Biologický materiál	20
4.2 Použité chemikálie a roztoky.....	21
4.2.1 Použité chemikálie	21
4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava	22
4.2.3 Roztoky pro přípravu primárních a sekundárních protilátek a DAPI	25
4.3 Seznam použitých přístrojů	28
4.4 Seznam použitých pomůcek	28
4.5 Použité experimentální postupy.....	29

4.5.1 Inkubace buněk s nukleosidy a nukleotidy	29
4.5.2 Fixace a permeabilizace buněk	29
4.5.3 Detekce inkorporovaných nukleosidů a nukleotidů.....	30
4.5.3.1 Enzymatické odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA pomocí DNázy I a exonukleázy III.....	30
4.5.3.2 Odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA pomocí nízké koncentrace HCl a exonukleázy III	30
4.5.3.3 Odhalení inkorporovaného BrdU pomocí jednomocných kationtů mědi.....	31
4.5.3.4 Odhalení inkorporovaného BrdU pomocí 4 N HCl a 2 N HCl	31
4.5.3.5 Odhalení inkorporovaného EdU pomocí klikací reakce	32
4.5.3.6 Detekce inkorporovaného biotin-16-dUTP.....	32
4.6 Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu	33
5 Výsledky.....	34
5.1 Porovnání různých způsobů detekce replikační aktivity pomocí analogů nukleosidů a analogu nukleotidu a jejich vliv na hodnocení buněčného cyklu	34
5.1.1 BrdU.....	34
5.1.2 EdU	39
5.1.3 Biotin-16-dUTP	41
5.2 Vliv fixačních protokolů.....	42
5.3 Porovnání detekce replikace u různých typů buněčných linií	45
5.4 Vliv různých způsobů detekce replikace na fluorescenci fluorescenčních proteinů	47
6 Diskuze.....	50
7 Závěr.....	56
8 Literatura	57

Seznam symbolů a zkratek

A – adenin

And1 – WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1

ATR – Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

ATRIP – ATR-interagující protein

Biotin-dUTP – biotin-16-deoxyuridin-5'-trifosfát

bp – pár bází

BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridin

C – cytosin

CDC45 – cell division cycle 45 protein

CDC6 – cell division cycle 6 protein

Cdk – cyklin dependentní kináza

Cdt1 – chromatin licensing and DNA replication factor 1

CldU – 5-chloro-2'-deoxyuridin

DABCO - 1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol

DDK - Dbf4-dependentní kináza

Digoxigenin-dUTP – digoxigenin- 11-2'-deoxy-uridin-5' - trifosfát

D-MEM – Dulbeccova modifikace Eaglova média

DMSO – dimetylsulfoxid

DPB11 – regulátor replikace DNA DPB11

EdU – 5-etynyl-2'-deoxyuridin

E-MEM – Eaglovo minimální esenciální médium

FACS – Fluorescent Activated Cell Sorter

FBS – fetální telecí sérum

FITC – fluorescein isotiokyanát

FPC – komplex chránící replikační vidličku

FUCCI – Fluorescent Ubiquitination Cell Cycle Indicator

G – guanin

GFP – zelený fluorescenční protein

GIN5 komplex – go-ichi-ni-san (podle čtyř podjednotek komplexu Sld5, Psf1, Psf2 a Psf3)

H – těžké vlákno mitochondriální DNA

Chk1 – kináza kontrolního bodu 1
IC₅₀ – polovina maximální inhibiční koncentrace
IdU – 5-iodo-2'-deoxyuridin
kb – kilobáze
L – lehké vlákno mitochondriální DNA
MCM 10 protein – minichromosome maintenance protein
MCM 2-7 komplex – MCM (minichromosome maintenance) proteinový komplex
mtDNA – mitochondriální DNA
NCR – nekódující oblast uplatňující se při mitochondriální replikaci
NTP – nukleotid trifosfát
O_H – počátek replikace těžkého vlákna mitochondriální DNA
O_L – počátek replikace lehkého vlákna mitochondriální DNA
ORC – komplex rozpoznávající počátek
PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCNA – proliferační antigen buněčného jádra
pRB – retinoblastomový protein
R bod – restriktivní bod
RFC – replikační faktor C
RPA – replikační protein A
S-CDK – cyklin dependentní kinázy aktivované v S fázi
SLD2, SLD3 – regulátory replikace DNA SLD2 a SLD3
T – tymin
Tert – telomerázová reverzní transkriptáza
TR (Terc) – telomerázová RNA komponenta

Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma buněčného cyklu (Brody, L. C.; www.genome.gov [online]. [cit. 29. 4. 2020]. Dostupný na [www: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle](https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle))

Obrázek 2 Formování pre-RC a iniciace replikace DNA (Bryant a Aves, 2011)

Obrázek 3 Schéma replikace molekuly DNA (Leman a Noguchi, 2013)

Obrázek 4 Schéma mitochondriální DNA. New Study Confirms Genetic Link between Autism Spectrum Disorder and mtDNA | Genetics, Medicine | Sci-News.com. Breaking Science News | Sci-News.com [online]. Copyright © 2011 [cit. 30.06.2020]. Dostupné z: <http://www.sci-news.com/medicine/genetic-link-autism-spectrum-disorder-mtdna-04333.html>

Obrázek 5 Replikace mitochondriálního genomu (Falkenberg, 2018)

Obrázek 6 Detekce BrdU pomocí DNázy I a exonukleázy III v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 7 Detekce BrdU pomocí nízké koncentrace kyseliny chlorovodíkové a exonukleázy III v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 8 Detekce BrdU pomocí 4 N HCl v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 9 Detekce BrdU pomocí 2 N HCl v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 10 Detekce BrdU pomocí jednomocných kationtů mědi v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 11 Detekce EdU pomocí klik reakce v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 12 Detekce biotin-16-dUTP pomocí značené protilátky v jádrech buněk NCI-H2009

Obrázek 13 Porovnání vlivu fixačních protokolů na histogram signálu DAPI v jádrech NCI-H2009 buněk inkubovaných s 10 μ M BrdU.

Obrázek 14 Porovnání vlivu fixačních protokolů na histogram signálu DAPI v jádrech NCI-H2009 buněk

Obrázek 15 Porovnání vlivu různých způsobů detekce replikace na fluorescenci fluorescenčních proteinů u HeLa Fucci buněk.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Replikační proteiny a jejich funkce

Tabulka č. 2: Ředění a koncentrace enzymů

Tabulka č. 3: Použitá ředění primárních protilátek

Tabulka č. 4: Použitá ředění sekundárních protilátek a DAPI

Tabulka č. 5: Procentuální zastoupení replikujících buněk u vzorků fixovaných formaldehydem nebo etanolem

Tabulka č. 6: Porovnání poměru mezi signálem a šumem u různých buněčných linií

Tabulka č. 7: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleosidem BrdU

Tabulka č. 8: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleosidem EdU

Tabulka č. 9: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleotidem biotin-16-dUTP

Tabulka č. 10: Porovnání sledovaných parametrů u testovaných metod

1 Úvod

Replikace DNA je nezbytným procesem, který zajišťuje kontinuitu genetické informace a její přenos do následující generace. Detekce replikační aktivity buněk je důležitým nástrojem pro studování buněk a jejich buněčného cyklu. Tyto metody se široce uplatňují například při vývoji a testování léčiv. Analýzu replikace DNA lze provádět různými způsoby. Příkladem je použití radioisotopů nebo sledování replikačních proteinů (např. PCNA nebo Ki-67). V současnosti asi nejčastějšími způsoby jsou metody založené na použití modifikovaných nukleosidů či nukleotidů. Modifikované nukleosidy a nukleotidy jsou během syntézy DNA inkorporovány do DNA a následně jsou detekovány například pomocí imunofluorescence.

V předkládané práci jsem se v přehledové části zabývala průběhem replikace buněčné DNA a možnostmi její detekce, a to zejména pomocí modifikovaných nukleosidů nebo nukleotidů. V experimentální části jsem se zabývala porovnáním pěti metod pro analýzu replikační aktivity buněk s ohledem na možnost provedení následné analýzy buněčného cyklu, na sílu poskytovaného signálu a na jejich vliv na fluorescenci fluorescenčních proteinů. Sledované metody byly testovány na pěti lidských buněčných liniích.

2 Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma: Organizace a replikace DNA.
2. Vypracování literární rešerše na téma: Základní přístupy používané pro detekci replikace DNA.
3. Porovnání pěti přístupů detekce replikační aktivity pomocí analogů nukleosidů a analogu nukleotidu z hlediska síly replikačního signálu, závislosti na buněčné linii a zhodnocení jejich vlivu na analýzu buněčného cyklu a na fluorescenci fluorescenčních proteinů.

3 Literární přehled

Molekula DNA byla objevena švýcarským chemikem Friedrichem Miescherem v roce 1869 při sledování lidských bílých krvinek. Všiml si, že po přidání kyseliny k buněčnému roztoku došlo k oddělení substance, která se po chemické stránce lišila od proteinů. Substanci pojmenoval jako nuklein. Důvodem bylo jeho přesvědčení, že substance pochází z jádra (Dahm, 2007). V dalších letech se nukleinem zabýval například biochemik Albrecht Kossel, který ho na základě provedených experimentů pojmenoval jako deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Současně identifikoval všech pět nukleotidových bází, které jsou součástí DNA a RNA: adenin (A), guanin (G), thymin (T), cytosin (C) a uracil (U) (Kossel, 1911). Erwin Chargaff zjistil, že ačkoli se skladba bází DNA liší mezi druhy, v každém druhu jsou mezi bázemi zachovány stejné poměry. Počet adeninů odpovídá počtu thyminů a počet cytosinů odpovídá počtu guaninů (Chargaff *et al.* 1949; Chargaff, 1951). V roce 1952 Alfred Hershey a Martha Chase potvrdili, že DNA je nositelkou genetického materiálu (Hershey *et al.* 1952). O rok později Rosalind Franklin vytvořila rentgenové difrakční obrazce a pomocí nich poté James Watson a Francis Crick objasnili strukturu DNA (Watson *et al.* 1953).

Molekula DNA je nositelkou genetické informace jak u prokaryotických, tak i u eukaryotických organismů. Je nezbytná pro jejich vývoj, funkci a rozmnožování. Zatímco prokaryotní DNA se nachází v cytoplazmě, největší část eukaryotní DNA se nachází v buněčném jádře, které je odděleno od cytoplazmy dvojitou jadernou membránou. Kromě jaderné DNA obsahují eukaryotní buňky DNA i v mitochondriích nebo chloroplastech. U eukaryotních buněk včetně lidských buněk je organizace jaderné DNA velmi složitá a vyžaduje přítomnost celé řady proteinů. Důvodem je nutnost vysoké kondenzace chromatinu a současně zajištění efektivní replikace DNA, regulovaného přepisu do RNA a oprav DNA (Alberts *et al.*, 2002).

3.1 Organizace DNA

Molekula DNA je složena z nukleotidů, které jsou tvořeny fosfátovou skupinou, sacharidem 2'-deoxy-D-ribózou a bází. Báze může být adenin, guanin, cytosin a thymin. Molekula DNA je upořádána do dvoušroubovice složené ze dvou polynukleotidových vláken (Watson *et al.* 1953). Nukleotidy jsou v řetězci spojeny kovalentními fosfodiesterovými vazbami mezi C_{3'} uhlíkem cukerné pentózy a fosfátovou skupinou navázanou na C_{5'} uhlíku. Fosfodiesterová vazba určuje orientaci celého polynukleotidového vlákna. Báze nukleotidů jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky. Vazba mezi jednotlivými bázemi je daná

pravidlem komplementarity, tj. adenin se váže s thyminem, a to dvěma vodíkovými můstky a guanin s cytosinem třemi můstky. Vlákna DNA jsou komplementární a mají antiparalelní orientaci. Jedno vlákno má orientaci 5' → 3' a druhé 3' → 5' (Alberts *et al.*, 2002).

Jaderná DNA je vysoce organizovaná a asociovaná s proteiny. Tento komplex se označuje jako chromatin. Základní strukturální jednotkou chromatinu je nukleozom. Nukleozom je tvořen oktamerem proteinů histonové povahy (H2A, H2B, H3 a H4). Kolem tohoto tzv. histonového jádra se obtáčí DNA o délce 147 párů bází. Histony chrání úsek DNA na nukleozomovém jádře před štěpením endonukleázami. Jednotlivé nukleozomy jsou velké asi 10–11 nm a jsou stabilizovány tzv. „linkerovým“ histonem H1 (Snustad *et al.*, 2009; Bártová, 2009). Komplex nukleozomů se dále stáčí do 30 nm vlákna a následně vytváří další strukturu chromatinu a to 60–130 nm vlákno chromonem (Bártová, 2009). Přesná struktura chromatinu však není zcela objasněna. V tomto ohledu byly navrženy různé modely uspořádání chromatinu, například model solenoidu nebo „zig-zag“ model (Grigoryev *et al.*, 2009). Organizace chromatinu se výrazně mění v závislosti na přítomnosti genů, jejich aktivitě a rovněž se mění v průběhu buněčného cyklu. Příkladem vysoce kondenzovaného chromatinu jsou metafázní chromozomy (Snustad *et al.*, 2009; Bártová, 2009).

3.2 Replikace DNA

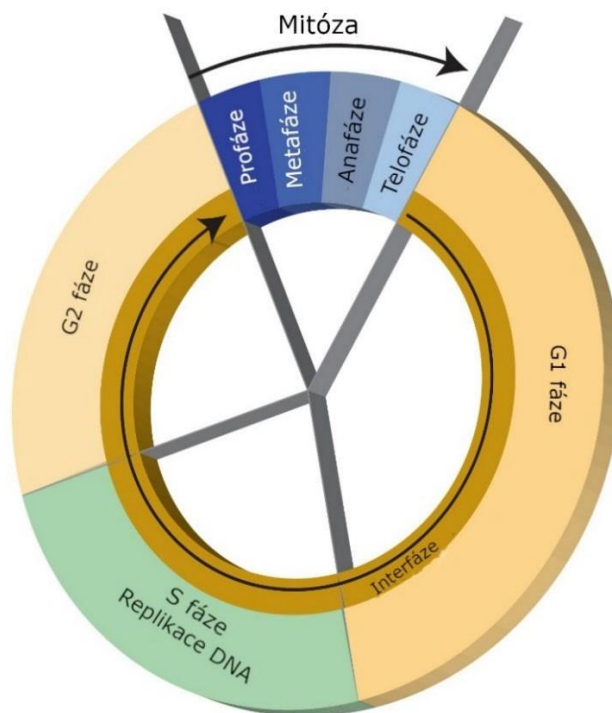
3.2.1 Replikace DNA v buněčném cyklu

Replikace DNA je základní a regulovaný proces, který probíhá ve všech živých organismech (Gonzalez *et al.*, 2005). Je nezbytná pro dělení buněk a předávání genetické informace z generace na generaci (Berg *et al.*, 2002). Syntéza DNA probíhá v S fázi (syntetické) buněčného cyklu. Buněčný cyklus je rozdělen do dvou základních fází: interfáze a mitotické fáze (M fáze, mitóza). Interfáze je o mnoho delší než mitóza a je rozdělena na další tři fáze – G1, S a G2 (viz obr. 1). Kromě těchto fází mohou buňky projít do tzv. fáze G0. Ta bývá označována jako klidová a buňky neprocházejí buněčným cyklem a nereplikují svou DNA. Buňky do ní můžou vstoupit v průběhu G1 fáze. G0 fáze je typická pro diferencované buňky (Cooper, 2000).

G1 fáze je většinou nejdelší fází buněčného cyklu (Cooper, 2000). V časně G1 fázi se kromě jiného rozhoduje, zda buňka bude dále pokračovat do S fáze buněčného cyklu. K tomu jsou nezbytné růstové faktory. V případě jejich dostatku buňky pokračují do pozdní G1 fáze a dále v cyklu. Přejdem mezi časnou a pozdní G1 fází je tzv. R bod (restriktivní bod). Za tímto bodem už růstové faktory nejsou nezbytné a buňka již projde celým buněčným cyklem (Pardee, 1974). Buněčný cyklus je regulován souborem kontrolních bodů, které se nachází na

rozhraní fází G1/S, G2/M a na rozhraní metafáze/anafáze (Novák *et al.*, 2003). Tyto kontrolní body jsou regulované cyklin-dependentními kinázami (Cdk). Aktivita těchto kináz je regulována regulačními proteiny – cykliny. Ty spolu s Cdk tvoří komplex cyklin/Cdk (Sancar *et al.*, 2004). Cykliny společně s Cdk regulují postup buněk přes G1, S, G2 a M fáze buněčného cyklu. V G1 fázi je cykliny typu D aktivována Cdk4/Cdk6 kináza a následně je aktivována Cdk2 kináza cyklinem E. Tyto cyklin/Cdk komplexy napomáhají vstupu buněk do S fáze inaktivací retinoblastomového proteinu (pRB). Aktivace cyklin A2/Cdk2 kinázy umožňuje postup buněk S fází a jejich vstup do G2 fáze. V G2 fázi jsou aktivní komplexy cyklinu A2/Cdk1 kinázy a cyklinu B2/Cdk1 kinázy a dovolují přechod buněk do M fáze (Chotiner *et al.*, 2019).

Každá diploidní buňka může svou DNA replikovat pouze jednou během buněčného cyklu. To je zabezpečeno degradací některých proteinů (Cdt1 a Cdc6) z počátků replikace během S fáze buněčného cyklu (viz podkapitola 3.2.2). Současně je znemožněno opětovné navázání těchto proteinů na replikační počátky v průběhu stejné S fáze (Araki, 2010).



Obrázek 1 Schéma buněčného cyklu (Brody, L. C.; www.genome.gov [online]. [cit. 29. 4. 2020]. Dostupný na [www: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle](http://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle))

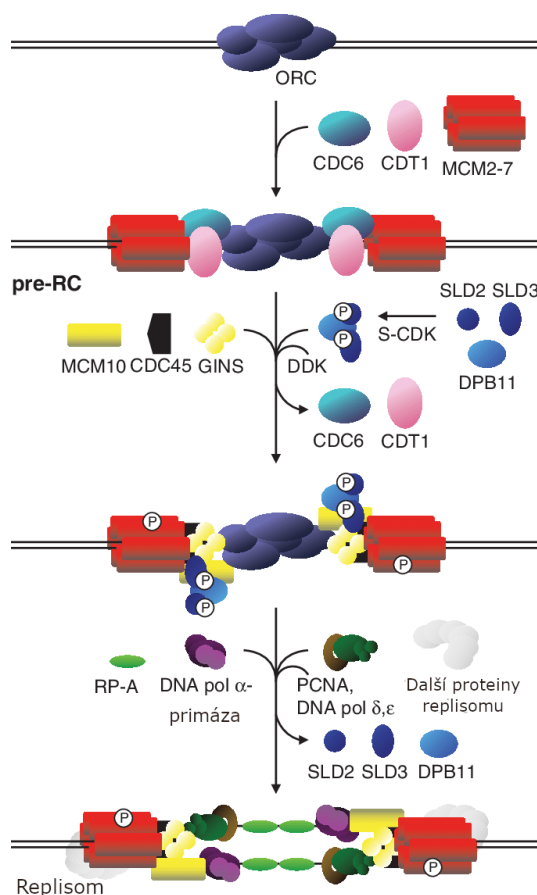
3.2.2 Replikace jaderné DNA

Replikace DNA probíhá z velkého množství replikačních počátků. Tyto počátky jsou aktivovány v průběhu S fáze buněčného cyklu. Části DNA, které jsou replikovány z jednoho

replikačního počátku, jsou označovány jako replikony. Lidský genom jich obsahuje kolem 40 000 (Singer *et al.*, 1996). V průběhu S fáze je ve stejnou dobu aktivní jen určitá část replikonů. Předpokládá se, že je to kolem 10–15 % z celkového počtu replikonů (Jackson *et Pombo*, 1998). Replikace probíhá z replikačního počátku obousměrně pomocí dvou replikačních vidliček a končí, když se potkají dvě sousední vidličky (Chagin *et al.*, 2010).

Iniciace replikace DNA probíhá ve dvou časově oddělených krocích – licencování replikačních počátků a vytvoření replikační vidličky (Moldovan *et al.*, 2007). Již během G1 fáze se k replikačním počátkům váže komplex proteinů vytvářející tzv. pre-replikační komplex (pre-RC; viz obr. 2). Celý tento proces je vysoce regulovaný a probíhá v přesném pořadí. Nejdříve se k replikačním počátkům váže proteinový komplex šesti proteinů - origin recognition complex (ORC). Přímo k ORC se následně váže Cdc6 protein a k tomuto komplexu se váže Cdt1 protein. Komplex proteinů ORC, Cdc6 a Cdt1 umožňuje vazbu hexamerního helikázového MCM 2-7 komplexu (minichromosome maintenance protein complex) (Chong *et al.*, 1996) na DNA (Bell *et Dutta*, 2002). Aby nedocházelo k opětovnému vytvoření pre-replikačního komplexu na stejném replikačním počátku, je Cdt1 protein inhibován vazbou proteinu gemininu a současně dochází k fosforylaci Cdc6 proteinu a jeho uvolnění z pre-replikačního komplexu (Montanari *et al.*, 2006).

V dalším kroku se formuje iniciační komplex, kdy dochází k postupné vazbě dalších replikačních faktorů jako je protein Cdc45 nebo GINS komplex (z japonského go-ichi-ni-san, což znamená 5-1-2-3, po čtyřech příbuzných podjednotkách komplexu Sld5, Psf1, Psf2 a Psf3) (MacNeill, 2010). K tomu je nutné působení cyklin-dependentní kinázy Cdk2 a eukaryotní Dbf4-dependentní kinázy/Cdc7 (DDK) (Aparicio *et al.*, 2009). Následně se na replikační vidličce formuje multiproteinový komplex, replisom. Hlavními proteiny replisomu jsou helikázový komplex, replikační protein A (RPA), replikační faktor C (RFC), PCNA (proliferální antigen buněčného jádra), komplex DNA polymerázy α /primázy, DNA polymerázy δ a ϵ (Yu *et al.*, 2014), ribonukleázy H1 a FEN1, DNA ligáza I a topoizoméráza I a II. Po vytvoření replisomu začíná samotná syntéza DNA (Zheng *et Shen*, 2011). Stručný přehled replikačních proteinů a jejich funkce jsou uvedeny v Tabulce č. 1.



Obrázek 2 Formování pre-RC a iniciace replikace DNA (Bryant a Aves, 2011)

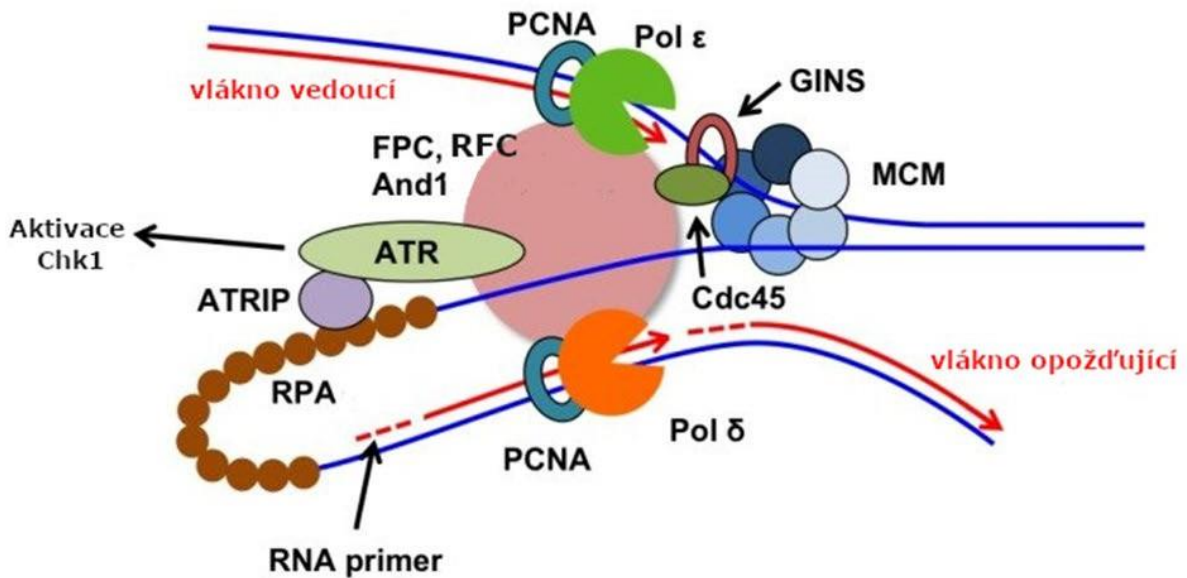
Tabulka č. 1 Replikační proteiny a jejich funkce

Název proteinu	Funkce
ORC	- komplex šesti proteinových podjednotek, váže se k replikačním počátkům (Popova <i>et al.</i> , 2018)
CDC6	- váže se k ORC komplexu, důležitá role v uspořádání dalších replikačních proteinů v pre-replikačním komplexu (Dutta <i>et Bell</i> , 1997)
Cdt1	- klíčová úloha v uspořádání pre-replikačního komplexu (Bell <i>et Dutta</i> , 2002)
geminin	- inhibice opětovné formace pre-replikačního komplexu vazbou na Cdt1 protein (Bell <i>et Dutta</i> , 2002)
MCM2-7	- komplex proteinů, váže se k replikačním počátkům, součástí helikázového komplexu (Forsburg, 2004; Vijayraghavan <i>et Schwacha</i> , 2012)
CDC45	- regulace replikace DNA, úloha při iniciaci a elongaci replikace DNA, součást helikázového komplexu (Broderick <i>et Nasheuer</i> , 2009, Vijayraghavan <i>et Schwacha</i> , 2012)
GINS komplex	- spolu s MCM2-7 a Cdc45 proteiny jsou součástí helikázového komplexu (Vijayraghavan <i>et Schwacha</i> , 2012)
MCM 10	- pomáhá při správnému složení replikační vidličky (Du <i>et al.</i> , 2012)
S-CDK	- fosforylují SLD2 a SLD3 proteiny (Zegerman <i>et Diffley</i> , 2007)
SLD2, SLD3	- vážou se k DPB 11 (Tanaka <i>et al.</i> , 2007)

Pokračování Tabulky č. 1

DPB 11	- váže se ke GINS komplexu a umožňuje interakci komplexů GINS a MCM 2-7 (Tanaka <i>et al.</i> , 2013)
FPC	- stabilizuje replisom během replikace DNA (Leman <i>et</i> Noguchi, 2013)
And1	- součást replisomu, slouží k regulaci replikace DNA (Jaramillo <i>et al.</i> , 2013)
ATR	- přenos signálu přes kontrolní body buněčného cyklu (Abraham, 2001), důležitá role v regulaci buněčné odpovědi na poškození DNA (Namiki <i>et</i> Zou, 2006)
ATRIP	- váže se k RPA a umožňuje komplexu ATR-ATRIP rozpoznat poškozenou strukturu DNA (Namiki <i>et</i> Zou, 2006)
Chk1	- fosforyluje CDK1 (Patil <i>et al.</i> , 2013)

Syntéza DNA (viz obr. 3) začíná působením DNA helikázového komplexu, který rozvíjí DNA a stabilizací jednovláknové DNA proteinem RPA. V rozvolňování struktury DNA hrají důležitou roli topoizomerázy, které zabezpečují relaxaci šroubovice DNA. Komplex DNA polymerázy α /primázy nejdříve syntetizuje krátký úsek RNA (Chagin *et al.*, 2010), který následně prodlouží o cca 20 bází sekvenci DNA (Fisher *et al.*, 1979). V dalším kroku se k tomuto krátkému úseku váže protein RFC zabezpečující vazbu proteinu PCNA k DNA. Protein PCNA je důležitý pro udržení vazby DNA polymerázy δ a ϵ na DNA. Po vazbě těchto polymeráz je z replisomu uvolněna DNA polymeráza α /primáza a dochází k syntéze DNA (Chagin *et al.*, 2010). DNA polymerázy mají DNA syntetickou aktivitu ve směru $5' \rightarrow 3'$ a proofreadingovou aktivitu ve směru $3' \rightarrow 5'$. (Stillman, 2008; Fazlieva *et al.*, 2009). To vyžaduje použití odlišné strategie při syntéze párujících vláken DNA. Řetězec, který je orientován ve směru $5' \rightarrow 3'$, je syntetizován kontinuálně. Toto vlákno je nazýváno jako vedoucí řetězec (Stillman, 2008). Druhé vlákno, které je orientované opačně, je syntetizované formou kratších, tzv. Okazakiho fragmentů (Okazaki *et al.*, 1968). Jedná se o krátké úseky RNA (cca 200 bází) syntetizované enzymem primázou (Hübscher *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 1986). Toto vlákno je označováno jako opožďující řetězec. Krátké RNA úseky jsou nakonec odstraněny ribonukleázou H1 (Tannous *et al.*, 2015) a FEN1. Jednotlivé Okazakiho fragmenty jsou spojeny DNA ligázou I (Zheng *et* Shen, 2011).



Obrázek 3 Schéma replikace molekuly DNA (Leman a Noguchi, 2013)

3.2.3 Replikace telomer

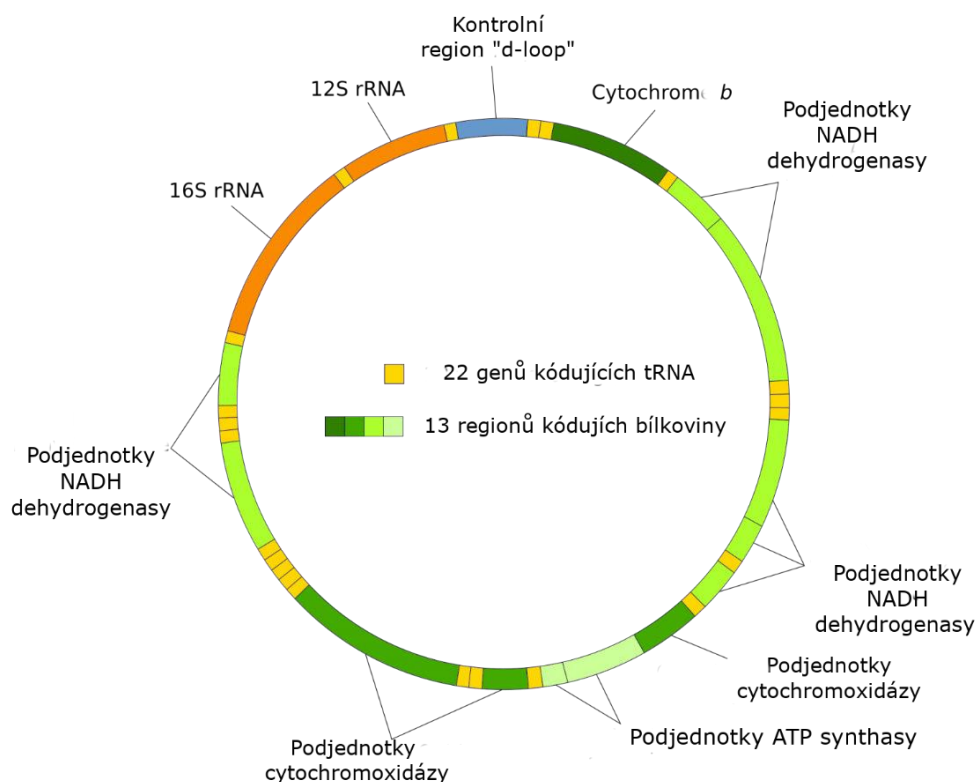
DNA polymerázy nejsou schopny replikovat molekuly DNA na koncích lineárních chromozomů (Lingner *et al.*, 1995), proto by při každém buněčném dělení docházelo k jejich zkracování (Allsopp *et al.*, 1992). Z toho důvodu se na koncích lineárních chromozomů nachází nukleoproteinové komplexy – telomerázy. Tento komplex se skládá z telomerázové RNA (TR nebo taky Terc), telomerázové reverzní transkriptázy (Tert) a dyskerinu. TR je funkční RNA, která slouží jako templát pro syntézu sekvence telomery. Tert je katalytickou podjednotkou enzymu telomerázy a dyskerin je protein, který váže RNA (Cao *et al.*, 2008). Tyto složky jsou nezbytné pro telomerázovou aktivitu. V lidských buňkách je telomerázová aktivita přítomna pouze během embryogeneze. U dospělého člověka zůstává telomeráza aktivní pouze v zárodečných buňkách a v určitých kmenových buňkách. Znovuobnovení telomerázové aktivity se objevuje například v aktivovaných lymfocytech a rakovinových buňkách (Jiang *et al.*, 2007).

Telomerická savčí DNA je tvořena repetitivními sekvencemi DNA – TTAGGG (Harley *et al.*, 1990). Počet repeticí je různý, u lidí se předpokládá, že se délka telomer pohybuje od 5 do 15 kb (Samassekou *et al.*, 2010). Telomerická DNA interaguje s proteiny a vytváří komplex zvaný „sheltrin“ (de Lange, 2005), který je složený z několika proteinů. Sheltrin interaguje s enzymy, například s telomerázou a dalšími proteiny potřebnými pro správnou podporu a funkci telomer (Diotti *et Loayza*, 2011).

3.2.4 Replikace mitochondriální DNA

Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) je dvouvláknová, cirkulární molekula o velikosti 16,6 kb. mtDNA obsahuje 37 genů, které jsou uspořádány do komplexů proteinů a DNA uvnitř mitochondriální matrix (Taanman, 1999).

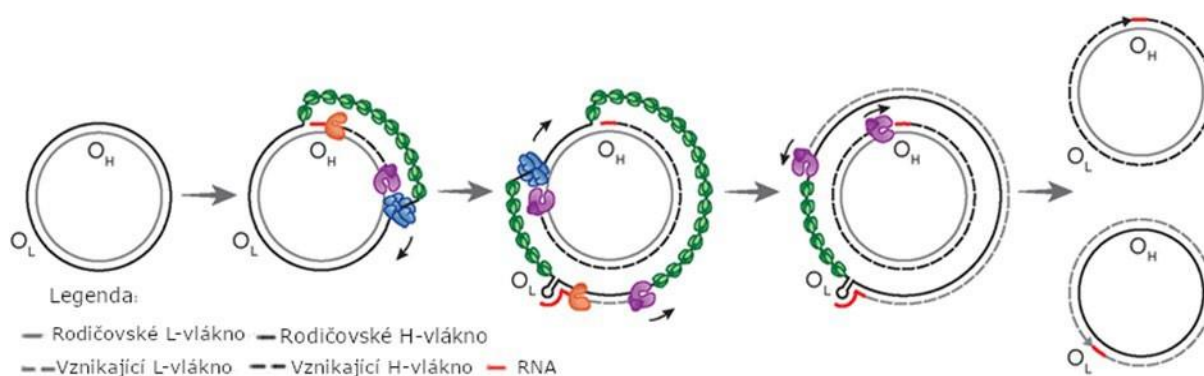
Většina mitochondriálních proteinů je kódována jadernou DNA. mtDNA nese geny jen pro některé mitochondriální proteiny (viz obr. 4) (Falkenberg, 2018), které jsou syntetizovány odděleným mitochondriálním translačním systémem (Anderson *et al.*, 1981).



Obrázek 4 Schéma mitochondriální DNA. New Study Confirms Genetic Link between Autism Spectrum Disorder and mtDNA | Genetics, Medicine | Sci-News.com. Breaking Science News | Sci-News.com [online]. Copyright © 2011 [cit. 30.06.2020]. Dostupné z: <http://www.sci-news.com/medicine/genetic-link-autism-spectrum-disorder-mtdna-04333.html>

Mitochondriální DNA je na rozdíl od jaderné DNA děděna výhradně po matce (Giles *et al.*, 1980) a její replikace probíhá kdykoliv v průběhu buněčného cyklu (Chatre *et Ricchetti*, 2013). Párující vlákna mtDNA se odlišují podle skladby nukleotidů a jsou označována jako lehká (L) nebo těžká (H) (Bielawski *et Gold*, 2002). Těžké vlákno obsahuje více guaninů, což umožňuje oddělení těžkého (H) a lehkého (L) vlákna (Berk *et Clayton*, 1974). Většina genů je součástí těžkého vlákna. Lehké vlákno kóduje jen osm tRNA (transferových) a jeden polypeptid. Všech 13 proteinových produktů jsou komponenty enzymových komplexů systému oxidativní fosforylace (Taanman, 1999).

Mitochondrie mají svůj vlastní systém replikace. Ten zahrnuje specifické mitochondriální proteiny, jako jsou DNA polymeráza γ , Twinkle DNA helikáza, vazebný protein vážící jednovláknovou mitochondriální DNA a mitochondriální RNA polymerázu. Kromě uvedených proteinů se uplatňují také enzymy jako RNáza H1, DNA ligáza III a topoizomerázy (Holt *et* Reyes, 2012), které jsou kódovány jadernými geny a jsou klíčovými komponenty v replikačním systému mtDNA (McKinney *et* Oliveira, 2013). mtDNA obsahuje jednu delší nekódující oblast (NCR – noncoding region), která je také nazývána jako kontrolní oblast. Kromě promotorů pro polycystronickou transkripci se v této oblasti nachází počátek replikace vlákna H (O_H). Druhý počátek pro DNA replikaci vlákna L (O_L) se nachází mimo NCR ve shluku tRNA přibližně 11 000 bp po proudu od O_H (Falkenberg, 2018). Podle modelu prezentovaného v roce 1972 Vinogradem a jeho kolegy (Robberson *et al.*, 1972), probíhá syntéza DNA kontinuálně na obou vláknech H i L (Clayton, 1991). Schéma replikace mtDNA je znázorněna na Obr. 5.



Obrázek 5 Replikace mitochondriálního genomu (Falkenberg, 2018)

3.3 Metody vizualizace syntézy DNA

Replikace DNA slouží jako spolehlivý marker buněčné proliferace. Proto se techniky na její sledování široce uplatňují ve studiu změn buněčného cyklu nebo v oblastech vývoje nových léčiv. V průběhu let byla vypracována celá řada metod umožňujících detekci replikace DNA. Většina z nich je založena na inkorporaci modifikovaných nukleosidů nebo nukleotidů do replikující se DNA a jejich následné vizualizaci. První nukleosidy, které byly použity pro značení replikačně aktivních buněk, byly radioaktivně značeny (viz podkapitola 3.3.1). Později byly nahrazovány halogen deriváty nukleosidů (viz podkapitola 3.3.2). Po inkorporaci do DNA jsou halogen deriváty nukleosidů vizualizovány imunocytochemicky pomocí specifických protilátek (Beltz *et* Visser, 1955). Jiným v současnosti hojně používaným modifikovaným nukleosidem je 5-etynyl-2'-deoxyuridin (EdU; viz podkapitola 3.3.3). Je to nukleosid

s etynylovou skupinou, který je vizualizován pomocí klik reakce (Salic *et Mitchison*, 2008). Kromě nukleosidů se pro detekci replikace používají i modifikované nukleotidy (viz podkapitola 3.3.4). Jejich nevýhodou je nutnost použití speciálních procedur pro jejich vnesení do buněk (Koberna *et al.*, 1999).

Ačkoli je možné použít i imunocytochemickou detekci proteinů účastnících se syntézy DNA jako je například PCNA (Foley *et al.*, 1991), tyto metody nejsou tak spolehlivé a hodnocení je někdy obtížné (Alvarez *et al.*, 2019). Proto se používají mnohem méně. Jinou alternativu představují konstrukty, které lze přímo sledovat v živých buňkách, jako jsou například FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) konstrukty s fluoreskujícími proteiny (viz podkapitola 3.3.5). Rovněž tato technologie je ve srovnání s použitím nukleosidových derivátů méně častá. Důvodem je mimo jiné časová a materiálová náročnost přípravy buněčných linií s těmito konstrukty (Zielke *et Edgar*, 2015).

3.3.1 Detekce syntézy DNA pomocí radioisotopů

Prvními izotopicky značenými nukleosidy byly N^{15} tymidin a C^{14} tymidin (Reichard *et Estborn*, 1951; Friedkin *et al.*, 1956; Downing *et Schweigert*, 1956). V roce 1957 byla pro značení replikace DNA vyvinuta metoda založená na inkorporaci H^3 -tymidinu do DNA a jeho detekci pomocí autoradiografie (Taylor *et al.*, 1957). Metoda využívá interakci radioaktivního záření s fotografickou emulzí. To umožňuje poměrně přesnou lokalizaci zdrojů radiace ve vzorku. Autoradiografie byla úspěšně použita například při studiu replikace v natažených vláknech savčí chromozomální DNA (Huberman *et Riggs*, 1966) nebo při studiu časového průběhu lokalizace míst syntézy DNA (Milner, 1969).

Ačkoliv autoradiografie umožnila významné objevy týkající se replikace DNA, její značnou nevýhodou je nutnost používat dlouhé expoziční doby. Ty se běžně pohybují v řádu týdnů až měsíců. Nevýhodou je rovněž poměrně nízký poměr signálu a pozadí, což vedlo ke snahám o nalezení alternativních přístupů detekce replikační aktivity (Ligasová *et Koberna*, 2018).

3.3.2 Detekce syntézy DNA pomocí halogenových analogů nukleosidů

První široce využívanou alternativou izotopicky značených nukleosidů byly halogenové deriváty tymidinu. Ty jsou modifikovány v páté pozici tymidinového kruhu atomem halogenu (brom, fluor, jód, chlór). Nejvíce používaným zástupcem této skupiny je 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) (Tuttle *et al.*, 2010). Výhodou BrdU je jeho relativně nízká toxicita. Současně je efektivně inkorporován do DNA buněčnými polymerázami. Ačkoli radioaktivně

značený BrdU je možné detekovat rovněž pomocí autoradiografie (Repka *et al.*, 1992), vývoj monoklonálních protilátek proti BrdU (Gratzner, 1982) umožnil jeho rychlejší a přesnější lokalizaci v nově syntetizované DNA (Gratzner, 1975; Gratzner *et al.*, 1982). Imunodetekce BrdU se postupně stala nejpoužívanější metodou pro detekci replikační aktivity buněk a důležitým nástrojem pro popis buněčné proliferace a buněčného cyklu.

BrdU a rovněž další halogenové deriváty tymidinu, které jsou inkorporovány do DNA, jsou ukryté v chromatinové struktuře a nejsou přístupné pro reakci se specifickými protilátkami. Proto je nutné použít pro jejich odhalení ve struktuře DNA speciální kroky (např. Ageno *et al.*, 1969; Sasaki *et al.*, 1988, Li *et al.* Darzynkiewicz, 1995; Kennedy *et al.*, 2000; Dimitrova *et al.* Berezney, 2002, Ligasová *et al.*, 2017a, Ligasová *et al.*, 2012). Postupně bylo vyvinuto několik způsobů odhalení BrdU. Jednou z často používaných metod je použití silných kyselin. Příkladem je kyselina chlorovodíková ($2\text{--}4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCl}$) (Dimitrova *et al.* Berezney, 2002). Použití vysoce koncentrovaných roztoků kyselin je zpravidla doprovázeno částečnou destrukcí buněčných komponent. Navíc vede použití silných kyselin k podstatnému snížení signálu barviv, které se vážou k buněčné DNA (např. DAPI, Hoechstovo barvivo nebo propidium jodid) (Sasaki *et al.*, 1988). Současně dochází např. k silnému poškození dalších buněčných složek, což běžně znesnadňuje jejich detekci (Dimitrova *et al.* Berezney, 2002). Zmíněné problémy vedly ke snaze o nahrazení použití kyselin alternativními přístupy.

Jeden z nich je založen na štěpení DNA nukleázami. Buď se jedná o jednu nukleázu, nebo o směs různých nukleáz, které vytvářejí krátké jednovláknové úseky DNA. Tyto úseky pak umožňují vazbu protilátky k BrdU (Dimitrova *et al.* Berezney, 2002). Další alternativu představuje štěpení DNA jednomocnými kationty mědi. Tento způsob je založen na oxidativním ataku deoxyribózy jednomocnými kationty mědi v přítomnosti kyslíku (Ligasová *et al.*, 2012). Kromě toho se pro odhalení BrdU používá například fotolýza DNA s inkorporovaným BrdU a detekce indukovaných zlomů (Li *et al.* Darzynkiewicz, 1995) nebo málo koncentrovaná HCl ($5\text{--}40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v kombinaci s exonukleázou III (Ligasová *et al.*, 2017a). Ve druhém jmenovaném případě jsou pro vytvoření jednořetězcových úseků DNA využity zlomy indukované kyselinou chlorovodíkovou a následným enzymatickým zvýrazněním těchto zlomů exonukleázou III. Zmíněný způsob odhalení BrdU poskytuje vysoký poměr mezi signálem a pozadím. Navíc oproti vysoce koncentrovaným roztokům silných kyselin uchovává mnohem lépe buněčné struktury (Ligasová *et al.*, 2017a). Značení pomocí BrdU je využíváno nejen pro detekci syntézy jaderné DNA, ale i pro značení replikace mtDNA (Lentz *et al.*, 2010; Ligasová *et al.* Koberna, 2018).

Z dalších halogen derivátů tymidinu jsou využívány IdU (5-iodo-2'-deoxyuridin) a CldU (5-chloro-2'-deoxyuridin), a to především pro dvojité značení replikace DNA. I v tomto případě je nutné nejprve nukleosidy odhalit ve struktuře DNA. Pro daný účel jsou používány stejné metody jako v případě BrdU (Merrick *et al.*, 2004).

Právě nutnost odhalení inkorporovaných halogen derivátů tymidinu je jednou z hlavních nevýhod jejich použití. Proto byly hledány další způsoby detekce syntézy DNA.

3.3.3 Detekce syntézy DNA pomocí EdU

Nutnost použití speciálních kroků k odhalování inkorporovaných halogen derivátů v DNA vedla k vyvinutí dalšího přístupu detekce nově replikované DNA. Ten je založen na inkorporaci EdU a jeho detekci pomocí klik reakce (Salic *et Mitchinson*, 2008). EdU je rovněž tymidinový analog, který má v páté pozici nahrazenou koncovou metylovou skupinu alkynovou skupinou. EdU je podobně jako BrdU inkorporováno do DNA během replikace. Inkorporované EdU je poté detekováno klik reakcí. Jedná se o Cu(I) katalyzovanou cykloadici [3+2], kdy koncová alkynová skupina reaguje s fluorescenčně značeným azidem (Tornøe *et al.*, 2002). Tato metoda je velmi senzitivní a je také rychlejší než detekce s využitím BrdU, jelikož nevyžaduje denaturaci pomocí HCl nebo jiný způsob odhalení. Na druhou stranu je EdU pro buňky vysoce toxické a dlouhá inkubace buněk v médiu s EdU vede k jejich smrti (např. Kohlmeier *et al.*, 2013, Ligasová *et Koberna*, 2018).

3.3.4 Detekce syntézy DNA pomocí analogů nukleotidů

Dalšími způsoby, které byly a jsou používány pro značení syntézy DNA, je značení replikované DNA pomocí analogů nukleotidů. Pro detekci replikace DNA se používá například biotin-16-deoxyuridin-5'-trifosfát (biotin-dUTP), digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-trifosfát (digoxigenin-dUTP) nebo nukleotidy přímo konjugovány s fluorochromy (Kill *et al.*, 1991). Propustnost buněčné membrány je ale pro tyto molekuly nízká. Proto bylo pro vpravení nukleotidů do buněk vyvinuto několik technik (McNeil, 1988).

Příkladem je permeabilizace buněk změnou elektrického napětí. Takto indukované zvýšení permeability membrány umožňuje dočasnou výměnu molekul mezi médiem a buňkami (Sale *et Hemilton*, 1968).

Nukleotidy mohou být do buněk vpraveny rovněž pomocí pinocytotických částic (Steinman *et al.*, 1974, 1976). V jednom z popsaných přístupů pro pinocytotický transport molekul jsou buňky inkubovány v médiu s vysokou koncentrací sacharózy, polyetylglykolu a molekul, které mají být transportovány do buněk. Objem buněk se vlivem působení

hypertonického média sníží. Sacharóza současně vyplňuje pinocytotické částice, které se vytvářejí během jejich vystavení hypertonickému médiu. Následně jsou buňky přemístěny do hypotonického média, čímž dochází k růstu objemu cytoplazmy a pinocytosomů se sacharózou. V důsledku nasávání vody do pinocytosomu dochází k jejich prasknutí a uvolnění jejich obsahu do cytosolu. (Okada *et* Rechsteiner, 1982; Rechsteiner, 1987).

Jinou možností je použití mikroinjekce, kdy se pomocí skleněné mikrojechly vnese malé množství makromolekul do cytoplazmy (Graessman *et al.*, 1974). Touto metodou mohou být do cytoplazmy nebo jádra transportovány makromolekuly téměř jakékoliv velikosti (Graessmann *et* Graessmann, 1983).

Alternativně je možné použít fúzi liposomů s kultivovanými buňkami (Poste *et al.*, 1976). Liposomy jsou mikroskopické struktury, které se skládají z jedné nebo více koncentrických lipidových dvouvrstev, které se uzavírají před vodným prostředím. Liposomy mohou interagovat s buňkami a mohou být využity k fúzi buněk, k transportu léků, enzymů nebo protinádorových léčiv do buněk (Pagano *et* Weinstein, 1978).

Jednoduchým způsobem transportu makromolekul přes membránu je použití hypotonických roztoků. Podstatou je krátké vystavení buněk působení hypotonického prostředí s transportovanou molekulou, kdy v důsledku nárůstu buněčného objemu a pravděpodobně i v důsledku indukovaného poškození cytoplazmatické membrány dochází k průchodu molekul do buněk. Uvedená metoda umožňuje transport různých molekul. Příkladem jsou peptidy, fosfatázové substráty konjugované s fluorochromy, nabitá barviva nukleových kyselin nebo různé (modifikované) nukleotidy (Koberna *et al.*, 1999).

Nedávno byly pro transport nukleotidových trifosfátů (NTP) vyvinuty syntetické nukleotidové trifosfátové transportéry. Tyto transportéry jsou složeny z receptoru, který s trifosfátovým aniontem vytváří nekovalentní komplex a proteinu, který umožňuje přenesení celého komplexu přes plazmatickou membránu. NTP jsou poté z komplexu uvolněny do vnitřního prostoru buňky a transportovány do buněčného jádra a jádérka. Transport NTP do buněk je v řádu sekund až minut. Fluorescenčně nebo nefluorescenčně značené NTP můžou být použity například pro metabolické značení DNA v živých buňkách (Zawada *et al.*, 2018).

3.3.5 Ostatní způsoby detekce syntézy DNA

Kromě výše uvedených metod se pro sledování replikace DNA používá detekce replikačních proteinů. Jedním z nich je PCNA, který se účastní replikace a oprav DNA. Zvýšené hodnoty PCNA mohou být nicméně způsobeny i růstovými faktory nebo poškozením DNA (de Oliveira *et al.*, 2008). Jako další marker buněčné proliferace je někdy používán i protein Ki-67.

Tento protein je exprimován během pozdní G1, S, G2 a M fáze, ale například buňky, které se nacházejí v G0 fázi, ho postrádají (Ihmann *et al.*, 2004). Ki-67 tedy není specifickým proteinem pro replikující buňky, nicméně je často používán například v klinické diagnostice (Li *et al.*, 2014).

Způsobem, kterým lze monitorovat fáze buněčného cyklu v živých buňkách je použití buněčné linie s fluorescenčními sondami, například FUCCI. FUCCI sondy využívají vlastnost dvou proteinů účastnících se licencování, kdy je jejich množství v buňkách závislé na konkrétní fázi buněčného cyklu. Jedná se o protein Cdt1 a geminin (Yoshida *et al.*, 2004). V případě Cdt1 je k jeho fragmentu připojen Kusabira-Orange 2 fluorescenční protein (Kaida *et al.*, 2012). Tato sonda slouží k indikaci buněk v G1 fázi a vychází z toho, že množství Cdt1 je nejvyšší v G1 fázi a jeho množství postupně klesá od počátku S fáze (Nishitani *et al.*, 2004). K fragmentu proteinu gemininu je naopak připojen fluorescenční protein Azami-Green 1, který umožňuje sledovat buňky v S, G2 a M fázi. V případě gemininu je jeho nejvyšší množství během S a G2 fáze a v průběhu mitózy dochází k jeho postupné degradaci (McGarry *et al.*, 1998). V průběhu cyklu je proto možné sledovat červeně značené buňky v G1 fázi, oranžové buňky, které jsou na rozhraní G1 a S fáze a zelené buňky v S, G2 a M fázi (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008).

3.4 Nejčastější způsoby analýzy molekul používaných pro detekci replikace DNA

K analýze molekul používaných pro detekci replikace DNA jsou používány různé způsoby. Jedním z nich je světelná mikroskopie, zejména fluorescenční mikroskopie (viz podkapitola 3.4.1) využívající fluorescenční barviva. Speciální formou detekce a vizualizace je imunofluorescenční mikroskopie. Ta využívá reakci protilátek s antigeny, přičemž je buď přímo protilátka proti sledovanému antigenu, nebo druhá protilátka namířená proti první značena fluorescenční značkou (Rost, 1999). Druhým široce používaným způsobem detekce markerů DNA replikace je průtoková cytometrie (viz podkapitola 3.4.2).

3.4.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se využívá pro pozorování fluorescence látek. Je to jev, při kterém molekuly některých látek absorbují světelné záření určité vlnové délky a část energie ve velmi krátkém čase opět vyzáří v podobě světla o delší vlnové délce, tj. s nižší energií a jinou barvou. Tento posun ve vlnové délce se nazývá Stokesův posun (Albani, 2004). Látky, které po ozáření světlem určité vlnové délky vyzářují světlo delší vlnové délky, se nazývají

fluorochromy. Příkladem jsou fluorescenční barviva. Přirozeně mohou fluoreskovat proteiny obsahující větší množství aromatických aminokyselin jako je např. tryptofan, tyrozin nebo fenylalanin (Teale *et* Weber, 1957).

3.4.1.1 Fluorescenční barviva

Pro fluorescenční mikroskopii jsou používána fluorescenční barviva, která se specificky vážou na určitou skupinu v daném preparátu, nebo barviva, která jsou konjugována se specifickou protilátkou (Lichtman *et* Conchello, 2005). Fluorescenční mikroskopy separují emitované světlo od excitovaného světla pomocí optických filtrů. Excitační filtr vymezuje rozsah vlnových délek použitých pro excitaci a emisní filtr umožňuje vyčlenit část spektra zahrnující požadovaný signál. Kombinací těchto filtrů je dosaženo minimalizace signálu pozadí (Coling *et* Kachar, 2001). Fluorochromy, často ve spojení s dalšími molekulami, umožňují zobrazení procesů a buněčných složek, které by jinak nebyly viditelné. Používají se například k identifikaci různých buněčných populací, buněčných povrchových receptorů, vnitrobuněčných organel, detekci nukleových kyselin nebo pro detekci replikovaných úseků DNA (Mullins *et al.*, 2009).

Mezi často používané fluorochromy patří fluorescein isothiokyanát (FITC), rhodamin, Texas Red (Titus *et al.*, 1982) nebo fykoerythrin (Oi *et al.*, 1982). Mezi novější pak patří fluorochromové rodiny, například z řady Alexa (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999).

Další skupinou široce používaných fluorochromů jsou molekuly, které se vážou k DNA a umožňují tím vizualizaci jaderného chromatinu. Jedná se např. o Hoechst barviva a DAPI, které se vážou do malého žlábků DNA v oblastech bohatých na A:T páry (Chazotte, 2011), etidium bromid (Seonghyun *et al.*, 2016), propidium jodid (Lehtinen *et al.*, 2004) nebo akridinovou oranž, která se váže mezi páry bází v molekule DNA (Geacintov *et al.*, 1981).

3.4.1.2 Imunofluorescence jako nástroj pro detekci replikace DNA

Řada z metod používaných pro detekci replikace DNA je založena na interakci protilátky s antigenem, kterým je v tomto případě modifikovaný nukleosid/nukleotid (Sano *et al.*, 1992).

Protilátky neboli imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které jsou součástí imunitního systému a rozpoznávají makromolekulární agens, jsou označovány jako antigeny (Litman *et al.*, 1993). Oblast protilátky, která reaguje s antigenem, se nazývá paratop a oblast antigenu, která reaguje s protilátkou, se nazývá epitop nebo antigenní determinant. Mezi vazebnými místy protilátky a determinantními skupinami antigenu vzniká specifická vazba a vznikají tzv.

imunokomplexy. Intenzita reakce mezi protilátkou a antigenem je vyjádřena afinitou protilátky (Manz *et al.*, 2004). Vazebné místo protilátky je vytvářeno variabilními doménami lehkého a těžkého řetězce (Schroeder *et Cavacini*, 2010).

Existují dva způsoby imunodetekce, a to přímá a nepřímá. U přímé imunodetekce se jedná o jednokrokový proces, kdy je protilátka kovalentně vázaná k jednoduše detekovatelné značené molekule, kterou může být například fluorescenční barvivo nebo i enzym (Hierck *et al.*, 1994). U nepřímé imunodetekce se nejdříve neznačená primární protilátka váže k antigenu (např. BrdU) a následně se k primární protilátce váže sekundární protilátka. Sekundární protilátka může být označena navázaným fluorochromem, enzymem nebo jinou molekulou (Bower *et Chantler*, 1991). Výhodou nepřímé imunodetekce je zpravidla vyšší signál (Abcam, 2021) a fakt, že není nutné provádět konjugaci fluorochromu pro každou použitou protilátku (Goding, 1996).

3.4.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je často používaným způsobem analýzy buněčného cyklu a replikace DNA. Kromě toho tato metoda umožňuje sledovat i další optické či fluorescenční charakteristiky buněk či jejich komponent v roztoku. Základním principem průtokové cytometrie je rozptyl světla a fluorescenční emise, přičemž rozptyl světla je přímo spojen se strukturálními a morfologickými vlastnostmi buněk a fluorescenční emise pocházející z detekčních prób je úměrná množství této próby navázané na buňce nebo buněčné komponentě (Adan *et al.*, 2016).

Pro analýzu je nezbytné, aby buňky byly ve formě suspenze. V průběhu měření buňky procházejí středem laserového paprsku. Současně se měří optické vlastnosti každé buňky. Významnou roli v průtokové cytometrii hraje tzv. hydrodynamická fokusace, která zajišťuje separaci jednotlivých částic v průběhu měření (Lee *et al.*, 2001). Průtokové cytometry, které se vyznačují schopností třídit fluorescenčně značené buňky z heterogenní směsi buněk do dvou nebo více nádob na základě specifických charakteristik každé buňky, se běžně označují jako FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) (Herzenberg *et al.*, 1976). Pomocí průtokové cytometrie je možné získat informace o parametrech buněčného cyklu, obsahu DNA, replikaci DNA či délce jednotlivých fází buněčného cyklu. (Skarstad *et al.*, 1995).

Pro sledování replikace DNA se velice často používá značení buněk pomocí BrdU a protilátek anebo pomocí EdU. Následně se změří signál u BrdU nebo EdU inkorporovaného během replikace DNA (Gratzner, 1982; Salic *et Mitchison*, 2008). Jinou možností je detekce inkorporovaného BrdU „zhasením“ fluorescence například Hoechstova barviva 33258 (Latt *et*

al., 1975). V tomto případě se využívá skutečnost, že po inkorporaci BrdU do DNA dochází ke „zhasnutí“ fluorescence generované barvivem Hoechst 33258. V případě buněk, které jsou mimo S fázi, k tomuto zhášení nedochází. Proto je možné rozlišit buňky na ty, které replikují, a tudíž obsahují BrdU, a na buňky, které nereplikují a BrdU neobsahují. Měření je založeno na rozdílech intenzity fluorescence (Mozdziak *et al.*, 2000).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V experimentech byly použity tyto buněčné linie: HeLa (dar od Dr. Staňka z ÚMG AV ČR v.v.i.), NCI-H2009 (dar od doc. Hajdúcha, ÚMTM LF UP), HeLa.S-FUCCI2 (HeLa Fucci, dar od Dr. Mistříka, ÚMTM LF UP), BJ (dar od doc. Hajdúcha, ÚMTM LF UP), IMR-90 (ATCC® CCL-186™) a MRC-5 (dar od doc. Hajdúcha, ÚMTM LF UP). HeLa buňky pocházejí z nádorové buněčné linie odvozené z rakovinných buněk děložního čípku. NCI-H2009 buněčná linie je nádorového původu izolována z karcinomu plic. Buněčná linie HeLa.S-FUCCI2 je odvozena od HeLa linie a obsahuje tzv. FUCCI konstrukt. Tento konstrukt umožňuje monitorování buněčného cyklu v živých buňkách. Principem je závislost množství replikačních faktorů Cdt1 a gemininu na fázi buněčného cyklu. Cdt1 je protein důležitý pro licencování replikačních počátků a jeho množství je vysoké v G1 fázi, kdy dochází k licencování těchto míst. Je proto využíván jako indikátor fáze G1 (Sakaue-Sawano *et al.*, 2008). K části Cdt1 je připojen fluorescenční protein Kusabira-Orange 2 a buňky v G1 fázi jsou zbarveny červeně (Karasawa *et al.*, 2004). V S a G2 fázi je tento protein postupně degradován. Naproti tomu, geminin inhibuje aktivitu Cdt1 proteinu a v konstruktě slouží k identifikaci S, G2 a M fáze. K fragmentu gemininu je připojený fluorescenční protein Azami-Green 1 a v S, G2 a M fázi jsou buňky zbarveny zeleně (Karasawa, *et al.*, 2003). Na rozmezí G1 a S fáze je možné pozorovat žluté buňky. Důvodem je fakt, že v této části buněčného cyklu se snižuje množství proteinu Cdt1 a zvyšuje se množství gemininu (Zielke *et Edgar*, 2015).

Dalšími použitými buněčnými liniemi byly diploidní fibroblasty. BJ buněčná linie pochází z kůže předkožky, MRC-5 a IMR-90 jsou buňky izolované z plicní tkáně.

Buněčné linie HeLa, NCI-H2009 a HeLa Fucci byly kultivovány v Dulbecově modifikovaném Eaglově médiu (D-MEM), ke kterému bylo přidáno 10% fetální bovinní sérum (FBS), 7,5% NaHCO₃ a gentamicin (80 mg·ml⁻¹). Buněčné linie BJ, IMR-90 a MRC-5 byly kultivovány v Eaglově minimálním esenciálním médiu (E-MEM), ke kterému bylo přidáno 20% FBS, NaHCO₃, pyruvát sodný a gentamicin (80 mg·ml⁻¹). Při kultivaci buněk byla kultivační média odsáta z kultivační nádoby a buňky byly opatrně opláchnuty sterilním pufrům (1x PBS, solný fosfátový pufr). Pufr byl odstraněn a k buňkám byl přidán 0,05% roztok Trypsin-EDTA (přidané množství se odvíjelo od použité kultivační nádoby: 0,5 ml nebo 1 ml nebo 2 ml/25 nebo 75 nebo 150 cm² kultivační plochy). Poté, co se buňky oddělily od dna kultivačních nádob, byl roztok neutralizován přidáním kultivačního média s FBS (přidané

množství se odvíjelo od použité kultivační nádoby: 4,5 ml nebo 9 ml nebo 18 ml/25 nebo 75 nebo 150 cm² kultivační plochy). Buněčná suspenze byla opatrně rozmíchána. Následně bylo alikvotní množství buněčné suspenze přidáno do nové kultivační nádoby s médiem a buňky byly inkubovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) (Carbosynth, kat. č. NB06315)
- 5-etylnyl-2'-deoxyuridin (EdU) (Carbosynth, kat. č. NE08701)
- Biotin-16-deoxyuridin-5'-trifosfát (biotin-16-dUTP) (1 mM roztok; Carbosynth, kat. č. NB320581501)
- Etanol (absolutní, ≥99,8%) (VWR, kat. č. 20821.321)
- Paraformaldehyd (Merck, kat. č. 818715)
- CaCl₂ (Lach Ner, kat. č. 30974)
- Glycin (Sigma Aldrich, kat. č. G8898)
- Trizma base (Sigma Aldrich, kat. č. T6066)
- Askorbát sodný (Sigma Aldrich, kat. č. 11140)
- NaCl (Sigma Aldrich, kat. č. S9888)
- KCl (Serva, kat. č. 26868)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, kat. č. X100)
- HCl (35%) (Lach Ner, kat. č. 10033-A35)
- Hepes (Sigma Aldrich, kat. č., H4034)
- Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich, kat. č. 71649)
- NaOH (Sigma Aldrich, kat. č. 06203)
- KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, kat. č. P5655)
- CuSO₄.5H₂O (Sigma Aldrich, kat. č. 209198)
- Hydrochinon (Sigma Aldrich, kat. č. H9003)
- MgCl₂ (Sigma Aldrich, kat. č. M8266)
- DMSO (Sigma Aldrich, kat. č. 34943)
- 5-FAM konjugovaný s azidem (Lumiprobe, kat. č. E4130)
- Alexa Fluor 647 konjugovaná s azidem (Invitrogen, kat. č. A10277)
- Primární protilátka proti BrdU, klon Bu20a (Exbio, kat. č. 11-682-C100)

- Primární protilátka proti biotinu (Abcam, kat. č. Ab53494)
- DNáza I (ThermoFisher Scientific, kat. č. EN0525)
- Exonukleáza III (ThermoFisher Scientific, kat. č. EN0191)
- Sekundární protilátka proti myši konjugovaná s AlexaFluor 488 (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 115-545-146)
- Sekundární protilátka proti králíkovi konjugovaná s AlexaFluor 488 (JacksonImmunoResearch, kat. č. 111-545-144)
- Sekundární protilátka proti myši konjugovaná s DyLight 649 (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 715-495-151)
- Sekundární protilátka proti králíkovi konjugovaná s DyLight 649 (Jackson ImmunoResearch, kat. č. 715-655-144)
- DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (ThermoFisher Scientific, kat. č. D3571)
- DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane) (Sigma Aldrich, kat. č. 055K3447)
- Glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G7893)

4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava

- Příprava roztoku 2% formaldehydu v 1x PBS: Do kádinky bylo odměřeno přibližně 250 ml deionizované vody a bylo k ní přidáno 10 g paraformaldehydu. Následně byla kádinka umístěna na varnou plotýnku do digestoře. Jakmile byl roztok formaldehydu zahřátý přibližně na 60 °C, bylo k němu přidáno přibližně 8 kapek 1 mol·l⁻¹ NaOH. K vychlazenému formaldehydu bylo přidáno 50 ml pufru 10x PBS a následně byl roztok doplněn deionizovanou vodou na požadovaný objem 500 ml. Roztok byl promíchán a uchován při -20 °C.
- Příprava 0,2% formaldehydu v 1x PBS: K 9 ml 1x PBS byl přidán 1 ml 2% formaldehydu a roztok byl promíchán. Roztok byl připraven těsně před použitím.
- Příprava 0,2% Tritonu X-100 v 1x PBS: Do falkony bylo odměřeno 49,9 ml 1x PBS a následně k němu bylo přidáno 100 µl 100% Tritonu X-100. Roztok byl umístěn na vortex a byl zde ponechán do úplného rozpuštění Tritonu X-100. Roztok byl připraven těsně před použitím.
- Příprava 70% etanolu: K 149,3 ml deionizované vody bylo přidáno 350,7 ml 99,8% etanolu a roztok byl promíchán. Připravený roztok etanolu byl uchován při -20 °C.
- Příprava 10 mmol·l⁻¹ BrdU: 10 mg BrdU bylo rozpuštěno v 3,26 ml deionizované vody. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.

- Příprava 10 mmol·l⁻¹ EdU: 10 mg EdU bylo rozpuštěno v 3,97 ml DMSO. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Příprava 0,2 mmol·l⁻¹ biotin-16-dUTP v 1x KHB pufru: 4 µl 1 mM biotin-16-dUTP a 2 µl 10x KHB pufru bylo přidáno k 19,4 µl deionizované vody a roztok byl promíchán. Roztok byl připraven těsně před použitím.
- Příprava 1 mmol·l⁻¹ DAPI: 10 mg DAPI bylo rozpuštěno v 21,86 ml deionizované vody. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mmol·l⁻¹ Alexa Fluor 647 azidu: 0,5 mg Alexa Fluor 647 azidu bylo rozpuštěno v 58,8 µl DMSO. Roztok byl promíchán a uchován při -20 °C.
- Příprava 4 N HCl: K 129,11 ml deionizované vody bylo opatrně přidáno 70,89 ml 35% HCl ($\rho = 1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 2 N HCl: K 5 ml deionizované vody bylo přidáno 5 ml 4 N HCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 20 mmol·l⁻¹ HCl v 150 mmol·l⁻¹ NaCl a 3 mmol·l⁻¹ KCl: K 9,95 ml roztoku 150 mmol·l⁻¹ NaCl a 3 mmol·l⁻¹ KCl bylo přidáno 50 µl 4 N HCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 150 mmol·l⁻¹ NaCl a 3 mmol·l⁻¹ KCl: K 423,5 ml deionizované vody bylo přidáno 75 ml 1 mol·l⁻¹ NaCl a 1,5 ml 1 mol·l⁻¹ KCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ NaCl: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 58,44 g NaCl. NaCl byl rozpuštěn a poté byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 1 l. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ KCl: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 74,55 g KCl. KCl byl rozpuštěn a poté byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 1 l. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ Hepes: 47,66 g Hepes bylo rozpuštěno ve 150 ml deionizované vody a roztok byl promíchán. Následně bylo upraveno pH pomocí 1 mol·l⁻¹ NaOH na 7,4. Poté byl roztok doplněn na 200 ml a uchován při 4 °C.
- Příprava 10x KHB: K 300 ml deionizované vody bylo přidáno 150 ml 1 mol·l⁻¹ KCl a 50 ml 1 mol·l⁻¹ Hepes, pH 7,4. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Příprava 1x KHB: K 9 ml deionizované vody byl přidán 1 ml 10x KHB. Roztok byl promíchán. Roztok byl připraven těsně před použitím.

- Příprava 10x PBS: Ve 400 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 40 g NaCl, 7,1 g Na₂HPO₄, 1 g KCl a 1,22 g KH₂PO₄, pH bylo upraveno na 7,4 pomocí 1 mol·l⁻¹ NaOH a roztok byl doplněn deionizovanou vodou na 500 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu. Připravený roztok byl uchován při 4 °C.
- Příprava 1x PBS: K 900 ml deionizované vody bylo přidáno 100 ml 10x PBS. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 10x pufru pro exonukleázu III: K 16,67 ml deionizované vody bylo přidáno 33 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8 a 330 μl 1 mol·l⁻¹ MgCl₂. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 12,11 g Trizma base. Následně bylo pomocí 1 mol·l⁻¹ HCl upraveno pH na 8. Objem byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- 1 mol·l⁻¹ MgCl₂: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 9,52 g MgCl₂. Roztok byl promíchán a doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ CaCl₂: 1,1 g CaCl₂ bylo rozpuštěno v 8 ml deionizované vody. Roztok byl promíchán, doplněn do 10 ml a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mmol·l⁻¹ CaCl₂: K 9,99 ml deionizované vody bylo přidáno 10 μl 1 mol·l⁻¹ CaCl₂. Roztok byl promíchán a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5: K 80 ml deionizované vody bylo přidáno 12,11 g Trizma base. Následně bylo pomocí 1 mol·l⁻¹ HCl upraveno pH na 7,5. Objem byl doplněn deionizovanou vodou na 100 ml. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl: K 480,9 ml deionizované H₂O bylo přidáno 12,5 ml 1 mol·l⁻¹ roztoku Tris-HCl, pH 7,5 a 75 ml 1 mol·l⁻¹ NaCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 100 mmol·l⁻¹ Tris, pH 7,5: K 45 ml deionizované vody bylo přidáno 5 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 10 mmol·l⁻¹ 5-FAM-azidu: 5 mg 5-FAM azidu bylo rozpuštěno v 1,1 ml DMSO. Roztok byl promíchán, rozpipetován a uchován při -20 °C.
- Klikací směs pro detekci EdU: K 187,8 μl deionizované vody byly přidány 2 μl 200 mmol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 0,2 μl 10 mmol·l⁻¹ 5-FAM-azidu a 10 μl 200 mmol·l⁻¹ hydrochinonu. Připravená směs byla promíchána. Směs byla připravena těsně před použitím.

- Příprava 200 mmol·l⁻¹ hydrochinonu: K 400 ml deionizované vody bylo přidáno 11,01 g hydrochinonu. Roztok byl promíchán, rozpipetován do 2ml zkumavek a uchován na -20 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O: K 800 ml deionizované vody bylo přidáno 249,7 g CuSO₄·5H₂O. Po rozmíchání byl roztok doplněn deionizovanou vodou na objem 1000 ml. Následně byl roztok promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 200 mmol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O: K 400 ml deionizované vody bylo přidáno 100 ml 1 mol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 8 mmol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O a 200 mmol·l⁻¹ NaCl: K 76 ml deionizované vody byly přidány 4 ml 200 mmol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O a 20 ml 1 mol·l⁻¹ NaCl. Roztok byl promíchán a uchován při 4 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ askorbátu sodného: K 40 ml deionizované vody bylo přidáno 9,9 g askorbátu sodného. Roztok byl promíchán, doplněn na 50 ml a uchován při -20 °C.
- Příprava 1 mol·l⁻¹ glycinu: K 40 ml deionizované vody bylo přidáno 3,75 g glycinu. Roztok byl promíchán, doplněn na 50 ml a uchován při -20 °C.
- Příprava 20 mmol·l⁻¹ askorbátu sodného s 40 mmol·l⁻¹ glycinem: K 9,4 ml deionizované vody bylo přidáno 200 µl 1 mol·l⁻¹ askorbátu sodného a 400 µl 1 mol·l⁻¹ glycinu. Roztok byl promíchán a uchován při -20 °C.
- Příprava montovacího média (2,5% DABCO, 90% glycerol, 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8): 625 mg DABCA bylo rozmícháno v 22,5 ml 100% glycerolu. Následně bylo přidáno 1,25 ml deionizované vody a roztok byl míchán dvě hodiny na pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 1,25 ml 1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8, roztok byl promíchán a centrifugován. Roztok byl rozpipetován do 1,5 ml zkumavek. Jedna zkumavka byla ponechána na pokojové teplotě a zbytek byl uchován při -20 °C.

4.2.3 Roztoky pro přípravu primárních a sekundárních protilátek a DAPI

- **Roztok primární protilátky pro enzymatické odhalení BrdU ve struktuře DNA pomocí DNázy I a exonukleázy III**
 A) Vzorky fixované formaldehydem: K 54,81 µl deionizované vody bylo přidáno 7 µl 10x pufru pro exonukleázu III, 0,14 µl exonukleázy III (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 2), 0,7 µl DNázy I (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 2), 7 µl 1 mmol·l⁻¹ CaCl₂ (konečná koncentrace = 0,1 mmol·l⁻¹) a 0,35 µl primární protilátky (ředění a koncentrace viz tabulka č. 3).

B) Vzorky fixované etanolem: K 55,16 μl deionizované vody bylo přidáno 7 μl 10x pufru pro exonukleázu III, 0,14 μl exonukleázy III (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 2), 0,35 μl DNázy I (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 2), 7 μl 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CaCl_2 (konečná koncentrace = 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,35 μl primární protilátky (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 3).

- **Roztok primární protilátky pro odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA pomocí nízké koncentrace HCl a exonukleázy III nebo pomocí jednomocné mědi**

K 62,51 μl deionizované vody bylo přidáno 7 μl 10x pufru pro exonukleázu III, 0,14 μl exonukleázy III (ředění a koncentrace enzymů viz tabulka č. 2) a 0,35 μl primární protilátky (ředění a koncentrace viz tabulka č. 3).

- **Roztok primární protilátky pro odhalení inkorporovaného BrdU pomocí 4 N nebo 2 N HCl**

K 69,65 μl 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl bylo přidáno 0,35 μl primární protilátky proti BrdU (ředění a koncentrace viz tabulka č. 3).

- **Roztok primární protilátky pro odhalení inkorporovaného biotin-16-dUTP**

K 69,3 μl 1x PBS bylo přidáno 0,7 μl primární protilátky proti biotinu (ředění a koncentrace viz tabulka č. 3).

Tabulka č. 2: Ředění a koncentrace enzymů

Enzym	Ředění	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace
Exonukleáza III	1:500	200 U/ μl	0,4 U/ μl
DNáza I pro buňky fixované v etanolu	1:200	1 U/ml	5 U/ μl
DNáza I pro buňky fixované ve formaldehydu	1:100	1U/ μl	10 U/ μl

Tabulka č. 3: Použitá ředění primárních protilátek

Primární protilátka proti	Ředění	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace
BrdU, klon Bu20a, produkován v myši	1:200	1 mg·ml ⁻¹	5 µg·ml ⁻¹
Biotin-16-dUTP, produkován v králíkovi	1:100	1 mg·ml ⁻¹	10 µg·ml ⁻¹

- **Roztok sekundární protilátky proti myši**

K 294 µl 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl byly přidány 3 µl anti-myší protilátky konjugované s fluorochromem Alexa Fluor 488 nebo DyLight 649 (ředění a koncentrace viz tabulka č. 4) a 3 µl 1 mmol·l⁻¹ DAPI (ředění a koncentrace viz tabulka č. 4).

- **Roztok sekundární protilátky proti králíkovi**

K 68,6 µl 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ bylo přidáno 0,7 µl sekundární protilátky konjugované s fluorochromem Alexa Fluor 488 nebo DyLight 649 (ředění a koncentrace viz tabulka č. 4) a 0,7 µl 1 mmol·l⁻¹ DAPI (ředění a koncentrace viz tabulka č. 4).

- **Roztok DAPI**

K 69,3 µl 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ bylo přidáno 0,7 µl 1 mmol·l⁻¹ DAPI (ředění a koncentrace viz tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Použitá ředění sekundárních protilátek a DAPI

Sekundární protilátka	Ředění	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace
Anti-myší protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹
Anti-králičí protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 488	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹

Pokračování Tabulky č. 4

Anti-myší protilátka konjugovaná s DyLight 649	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹
Anti-králičí protilátka konjugovaná s DyLight 649	1:100	1,5 mg·ml ⁻¹	15 µg·ml ⁻¹
DAPI	1:100	1 mmol·ml ⁻¹	10 µmol·ml ⁻¹

4.3 Seznam použitých přístrojů

- Vortex (Ika)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Mikrovlnná trouba (Zanussi)
- Lednice (Liebherr)
- Analytické váhy (Kern)
- Míchačka (P-Lab)
- Vortex (P-Lab)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX83 (Olympus)

4.4 Seznam použitých pomůcek

- Pipety (Gilson)
- Minutky (Roth)
- Špičky (Gilson)
- Podložní skla (Marienfeld)
- Krycí skla (Marienfeld)
- Filtrační papír (Whatman)
- Parafilm (Bemis)
- Pinzeta (Dumont)
- Petriho misky (Corning)

4.5 Použité experimentální postupy

4.5.1 Inkubace buněk s nukleosidy a nukleotidy

Buňky byly kultivovány na kruhových sklech o průměru 12 mm v Petriho misce v kultivačním médiu. Druhý den byl k buňkám přidán modifikovaný nukleosid, a to buď BrdU nebo EdU, oba dva v konečné koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky byly inkubovány v CO_2 inkubátoru při 5% CO_2 a teplotě 37°C po dobu 30 minut.

Pro hypotonické vpravení biotin-16-dUTP do buněk byla použita metoda hypotonie dle Koberna a kolektiv (Chromosoma, 1999). Byl připraven sterilní hypotonický pufr – 1x KHB, který byl vytemperován na 37°C . Kultivační médium bylo rovněž vytemperováno na 37°C . Dále byl připraven hypotonický roztok složený z 1x KHB a $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ biotin-16-dUTP. Hypotonické vpravení bylo provedeno v laminárním boxu za sterilních podmínek. Petriho misky s buňkami na sklech byly přeneseny z CO_2 inkubátoru do laminárního boxu a byly rychle opláchnuty připraveným pufrem 1x KHB. Postupně byla skla s buňkami vyndána pomocí pinzety z Petriho misky, pufr byl odsát filtračním papírem a skla s buňkami směřujícími nahoru byla položena do připravené nové sterilní Petriho misky. Takto připravená skla byla převrstvena $20 \mu\text{l}$ připraveného hypotonického roztoku. Buňky byly inkubovány v inkubátoru 10 minut. Následně byly buňky přeneseny do laminárního boxu, kde k nim bylo opatrně přidáno kultivační médium. Buňky byly následně inkubovány v inkubátoru dalších 30 minut.

4.5.2 Fixace a permeabilizace buněk

Buňky byly fixovány dvěma způsoby: a) 70% etanolem; b) 2% formaldehydem.

- a) Z Petriho misky bylo vylito médium a buňky byly třikrát promyty pufrem 1x PBS. Následně byl k buňkám přidán 70% etanol a buňky byly inkubovány 60 minut na teplotě -20°C .
- b) Kultivační médium bylo z Petriho misky vylito a buňky byly třikrát promyty pufrem 1x PBS. Následně byly buňky inkubovány v 2% formaldehydu po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly buňky třikrát promyty pufrem 1x PBS a následně byly permeabilizovány v 0,2% Tritonu X-100 v 1x PBS.

4.5.3 Detekce inkorporovaných nukleosidů a nukleotidů

4.5.3.1 Enzymatické odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA pomocí DNázy I a exonukleázy III

Thermomixer byl nastavena na 37 °C. Dále byla připravena vlhká komůrka, do které byl umístěn parafilm a na něj bylo nanášeno 30 μl roztoku primární protilátky. Fixované a permeabilizované buňky (viz podkapitola 4.5.2) byly třikrát promyty 1x pufr pro exonukleázu III a přeneseny na připravenou kapku primární protilátky (viz podkapitola 4.2.3). Vlhká komůrka byla umístěna do předehřáté třepačky Thermomixer a byla zde inkubována po dobu 30 minut. Po inkubaci byla skla přemístěna na kapky 1x PBS. Na nich byla 3x rychle promyta a přenesena na kapku 0,2% formaldehydu, kde byla inkubována 10 minut. Následně byla skla přemístěna na kapku 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a zde byla inkubována 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Po promytí byla skla s buňkami přenesena na připravené směsi sekundární protilátky a DAPI (viz podkapitola 4.2.3). Skla zde byla inkubována po dobu 30 minut. Po inkubaci byly buňky na sklech přemístěny na kapku 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a zde byly inkubovány po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Pufr byl odsát a skla byla umístěna na kapku (3 μl) montovacího média na podložním skle. Následně byla takto připravená skla nasnímána a vyhodnocena.

4.5.3.2 Odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA pomocí nízké koncentrace HCl a exonukleázy III

Nejprve byl Thermomixer nastaven na teplotu 25 °C. Fixované a permeabilizované buňky (viz kapitola 4.5.2) byly třikrát promyty připraveným roztokem 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Roztok byl vylit a k buňkám byla přidána 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl ve 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a 3 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl. Vzorby byly inkubovány v Thermomixeru po dobu 20 minut při teplotě 25 °C. Následně byly buňky třikrát promyty 1x pufr pro exonukleázu III. Mezitím byla připravena vlhká komůrka a Thermomixer byl nastaven na 37 °C. Směs primární protilátky (30 μl , viz podkapitola 4.2.3) byla napipetována do připravené vlhké komůrky a promytá skla byla přemístěna na kapky. Vlhká komůrka byla přenesena do Thermomixeru a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace byla skla přemístěna na kapky 1x PBS, kde byla rychle 3x promyta. Poté byla přemístěna na kapku 0,2% formaldehydu v 1x PBS a byla zde inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po dokončení inkubace byla sklíčka umístěna na kapku pufru 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a zde

byla ponechána po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Následně byla skla s buňkami inkubována na připravené směsi sekundární protilátky a DAPI (viz podkapitola 4.2.3) po dobu 30 minut. Po inkubaci byly buňky na sklech přemístěny na kapku $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a zde byly inkubovány po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Pufr byl odsát a skla byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Takto připravená sklíčka byla nasnímána a vyhodnocena.

4.5.3.3 Odhalení inkorporovaného BrdU pomocí jednomocných kationtů mědi

Nejprve byl Thermomixer nastaven na teplotu $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. K fixovaným a permeabilizovaným buňkám (viz podkapitola 4.5.2) byly přidány 2 ml roztoku složeného z $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ askorbátu sodného a $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycinu. Následně byl roztok vylit a k buňkám byl přidán 1 ml $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ askorbátu sodného a $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycinu. Pak byl k roztoku přidán 1 ml roztoku složeného z $8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CuSO_4 a $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Připravené buňky byly umístěny do předehřátého Thermomixeru a buňky v něm byly inkubovány po dobu 10 minut při otáčkách 300 RPM. Po dokončení inkubace byl roztok vylit a buňky byly třikrát opláchnuty roztokem $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5. Po posledním oplachu byl v Petriho misce ponechán $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5, buňky byly umístěny opět do Thermomixeru a inkubovány po dobu 10 minut při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkách 300 RPM. Během promývání byla připravena směs primárních protilátek (viz podkapitola 4.2.3). Po promytí buněk byla sklíčka s buňkami přemístěna na kapky směsi protilátek ($30 \mu\text{l}$) připravené na parafilmu ve vlhké komůrce. Thermomixer byl nastaven na teplotu $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Komůrka byla umístěna do Thermomixeru a zde byla inkubována po dobu 30 minut. Následně byla sklíčka s buňkami umístěna na kapku pufru $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, kde byla ponechána po dobu 5 minut, aby byla promyta. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Po dokončení promývání byla sklíčka přenesena na připravenou směs sekundární protilátky ($30 \mu\text{l}$ kapky, viz podkapitola 4.2.3). Buňky byly inkubovány ve směsi sekundární protilátky po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sklíčka třikrát promyta po dobu 5 minut roztokem $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,5 a $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, pufr byl odsát a skla byla umístěna na $3 \mu\text{l}$ kapky montovacího média. Skla byla nafocena a vyhodnocena.

4.5.3.4 Odhalení inkorporovaného BrdU pomocí 4 N HCl a 2 N HCl

Nejprve byl Thermomixer nastaven na teplotu $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. K fixovaným a permeabilizovaným buňkám (viz podkapitola 4.5.2) byla přidána 4 N nebo 2 N HCl. Sklíčka s buňkami v Petriho misce byla umístěna do Thermomixeru a buňky v něm byly inkubovány

po dobu 20 minut při 25 °C. Během inkubace byly připraveny směsi primárních protilátek (viz podkapitola 4.2.3). Po inkubaci byla skla třikrát promyta nejprve pufrům 1x PBS a poté třikrát 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl. Následně byla sklíčka s buňkami přemístěna na kapky primárních protilátek (30 µl) a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byla sklíčka umístěna na kapku 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl, kde byla ponechána po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Pak byla skla inkubována na kapkách připravených směsí sekundárních protilátek (30 µl, viz podkapitola 4.2.3) a to po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byla sklíčka promyta na třech kapkách pufru 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl, přičemž každé promytí trvalo 5 minut. Pufr byl odsát a skla byla umístěna na kapku montovacího média na podložním skle. Poté byla sklíčka nafocena a vyhodnocena.

4.5.3.5 Odhalení inkorporovaného EdU pomocí klikací reakce

Fixované a permeabilizované buňky (viz podkapitola 4.5.2) byly umístěny na kapku pufru 1x PBS na parafilmu. Následně byla skla přemístěna na kapky čerstvě připraveného roztoku pro detekci EdU (klikací směs - viz podkapitola 4.2.2; 30 µl) a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byla sklíčka umístěna na kapku 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl, kde byla ponechána po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Následně byla sklíčka inkubována v roztoku 10 µmol·l⁻¹ DAPI v 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl (30 µl viz podkapitola 4.2.3) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté byla sklíčka opět umístěna na kapku 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl, kde byla ponechána po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Následně byl pufr odsát a skla byla přemístěna na kapku montovacího média na podložním sklíčku. Skla byla následně nafocena a vyhodnocena.

4.5.3.6 Detekce inkorporovaného biotin-16-dUTP

Fixované a permeabilizované buňky (viz podkapitola 4.5.2) byly umístěny na kapku pufru 1x PBS na parafilmu. Následně byla skla přemístěna na kapky připravené primární protilátky proti biotinu (30 µl, viz podkapitola 4.2.3) a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sklíčka umístěna na kapku pufru 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl a byla zde ponechána po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě dvakrát opakován. Poté byla skla přemístěna na kapky sekundární protilátky (30 µl, viz podkapitola 4.2.3) a byla s ní inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po promytí vzorků na třech kapkách 25 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl, přičemž každé promytí trvalo

5 minut, byl pufr odsát a skla byla přemístěna na kapku montovacího média na podložním sklíčku. Takto připravená sklíčka byla nafocena a vyhodnocena.

4.6 Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu

Pro vyhodnocení a analýzu inkorporovaných nukleosidů BrdU a EdU a nukleotidu biotin-16-dUTP byla skla nejprve nafocena pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX83 (Olympus), který byl osazen kamerou Zyla Andor a objektivem UPLFLN -2PH, 10x, NA 0,3 (Olympus). Snímky byly snímány při rozlišení 1024 x 1024 pixelů. Ke snímání byl použit program CellSens Dimension (Olympus). Obrazová data byla analyzována pomocí programu CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006; Kamentsky *et al.*, 2011) a následně zpracována v programu Microsoft Excel, ve kterém byly připraveny i finální grafy.

U vzorků byly snímány fluorescenční signály DAPI a Alexa Fluor 488. V případě HeLa Fucci linie byly snímány fluorescenční signály DAPI a Alexa Fluor 488, Cy3 a DyLight 649. Signál DAPI identifikoval buněčná jádra. Signály Alexa Fluor 488, Cy3 a DyLight 649 detekovaly replikační aktivitu buněk.

Ze získaných obrázků byly nejdříve ručně odstraněny nečistoty jako vzduchové bubliny nebo špína, které by mohly vést k nesprávnému hodnocení pomocí programu CellProfiler. Úpravy byly provedeny v programu ImageJ. Na upravených obrázcích byly následně analyzovány integrální intenzity DNA a průměrné intenzity replikačního signálu. Vypočtené hodnoty pak byly použity pro sestavení histogramů DNA nebo replikačního signálu. Z histogramů replikačního signálu byla stanovena hraniční hodnota signálu jako minimální hodnota v histogramu mezi maximem pro neznačené a značené buňky. Množství replikujících buněk pak bylo dáno součtem všech buněk nad hraniční hodnotou. Pro stanovení buněk v G1 a G2/M fázi byly v histogramech DNA replikující buňky pomocí dělení jejich integrálních intenzit deseti posunuty před G1 buňky. Tím došlo k separaci G1 a G2/M buněk výrazným minimem. Veškeré buňky nad tímto minimem byly hodnoceny jako G2/M buňky. Množství G1 buněk byl následně vypočten jako rozdíl všech buněk a buněk v S a G2/M fázi. Z vypočtených hodnot bylo následně vypočítáno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Dále byl u jednotlivých metod vypočítán poměr signálu a šumu a to tak, že bylo 30 % nejvyšších signálů vyděleno 50 % nejnižších signálů.

Jednotlivé experimenty byly provedeny ve třech opakováních. Data jsou vypočítána jako průměrná hodnota z těchto opakování \pm směrodatná odchylka.

5 Výsledky

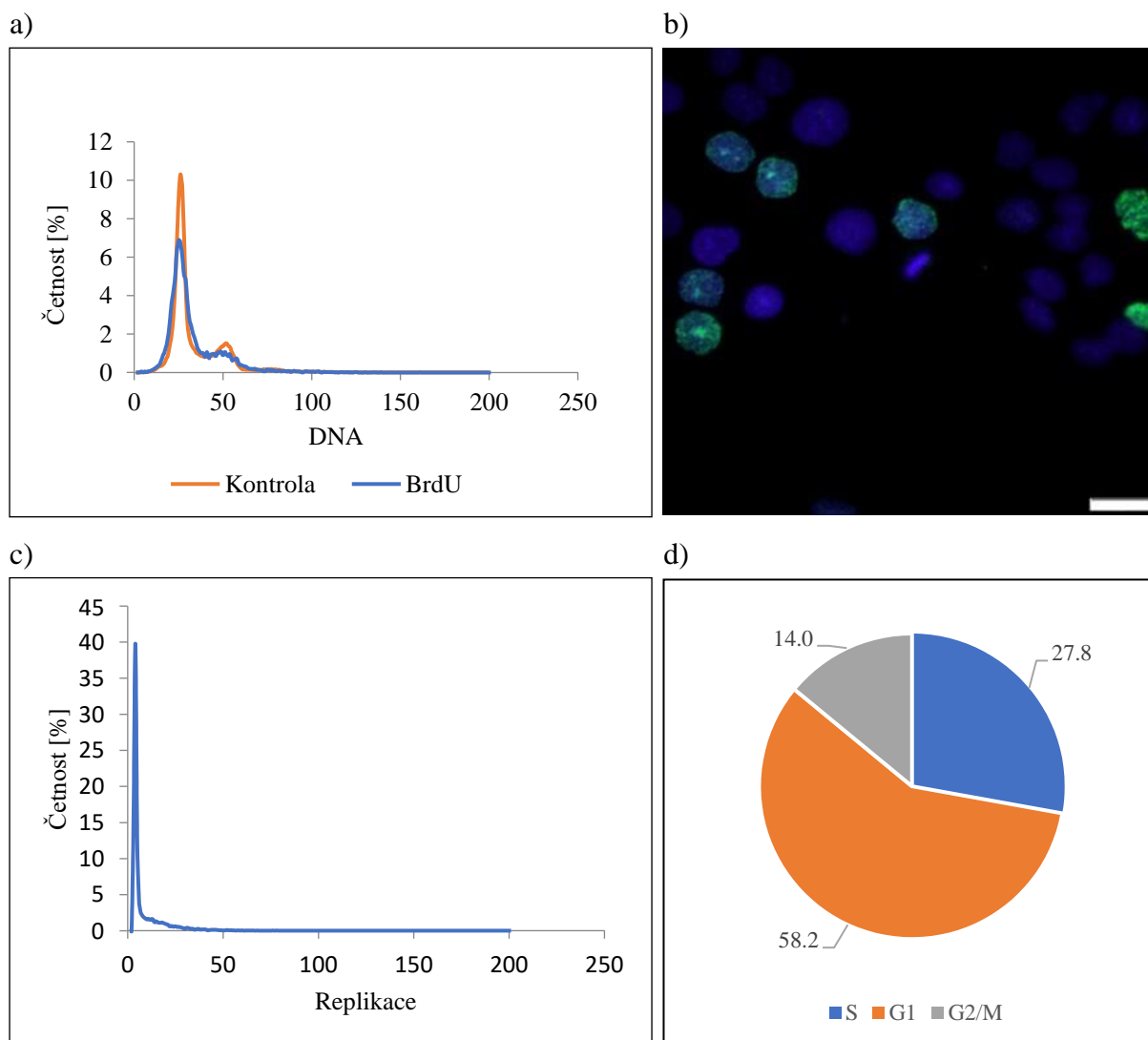
5.1 Porovnání různých způsobů detekce replikační aktivity pomocí analogů nukleosidů a analogu nukleotidu a jejich vliv na hodnocení buněčného cyklu

V práci byly nejprve porovnávány různé způsoby detekce replikační aktivity buněk a vliv těchto způsobů na hodnocení buněčného cyklu. V těchto experimentech byla použita lidská nádorová buněčná linie NCI-H2009. Pro stanovení replikační aktivity byly použity modifikované nukleosidy 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) a 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) a modifikovaný nukleotid - biotin-16-deoxyuridin-5'-trifosfát (biotin-16-dUTP).

5.1.1 BrdU

Pro odhalení inkorporovaného BrdU ve struktuře DNA bylo použito několik různých metod: i) enzymatické odhalení pomocí DNázy I a exonukleázy III; ii) odhalení pomocí málo koncentrované kyseliny chlorovodíkové a exonukleázy III; iii) 4 N HCl; iv) 2 N HCl a v) použití jednomocných kationtů mědi. V těchto testech byly buňky fixovány pomocí 2% formaldehydu při 25 °C.

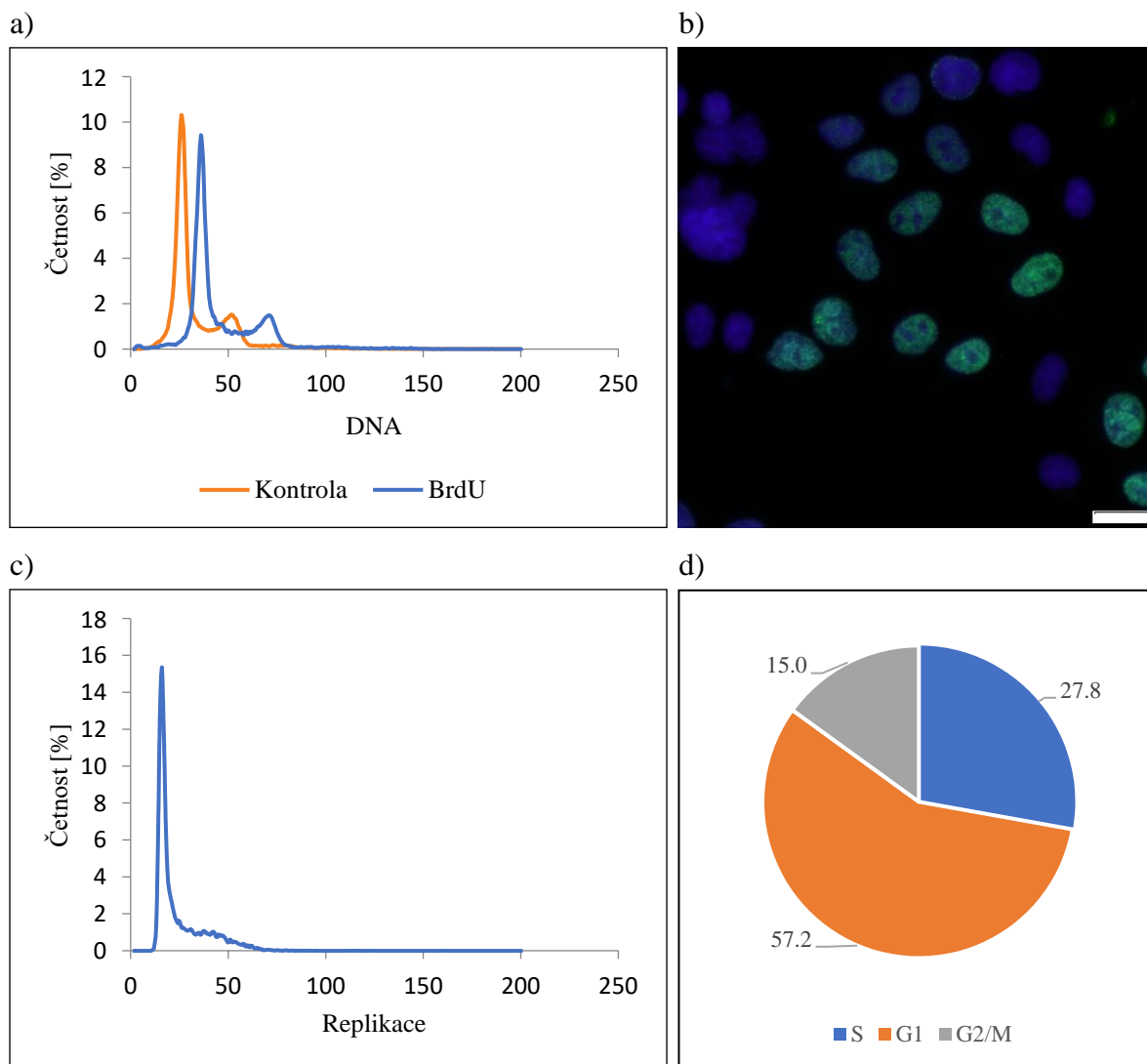
První sledovanou metodou bylo enzymatické odhalení BrdU pomocí DNázy I a exonukleázy III. Působením uvedených enzymů dochází mimo jiné k vytvoření jednovláknových úseků DNA, což umožňuje vazbu protilátky k BrdU (Dimitrova *et* Berezney, 2002). Z provedených analýz integrálních intenzit DAPI signálu v jádrech buněk inkorporovaným BrdU a kontrolních neovlivněných buněk bylo patrné, že došlo k mírnému poklesu četnosti jader s vysokou intenzitou signálu a rovněž k mírnému nárůstu šíře pásu četnosti jader na opačném konci histogramu (viz obr. 6a). Z mikroskopického pozorování a výpočtů (viz obr. 6b a 6c) bylo zjevné, že metoda poskytuje vysoký poměr mezi signálem a šumem. Tento poměr byl $5 \pm 0,5$. Podle analýzy signálu BrdU a DAPI bylo zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu následovné: v G1 fázi se nacházelo $58,2 \pm 9,1$ %, v G2/M fázi $14,0 \pm 1,1$ % a v S fázi $27,8 \pm 9,1$ % buněk (viz obr. 6d).



Obrázek 6 Detekce BrdU pomocí DNázy I a exonukleázy III v jádrech buněk NCI-H2009
a) Histogram integrálních intenzit DAPI v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) BrdU.
b) Příklad mikroskopické detekce DNA replikace pomocí BrdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
c) Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s BrdU.
d) Grafické znázornění procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Dalším sledovaným způsobem odhalení BrdU byla metoda využívající kombinaci málo koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl) a enzymu exonukleázy III. Působením HCl jsou vytvořeny v DNA jednořetězcové zlomy. V oblasti zlomů jsou následně exonukleázou III vytvořeny jednořetězcové úseky (Ligasová *et al*, 2017a). Jak je patrné z porovnání kontrolních a buněk značených BrdU, byla u značených buněk křivka průběhu histogramu integrální intenzity DAPI v buněčném jádře posunuta směrem k vyšším hodnotám oproti kontrolním buňkám (viz obr. 7a). V ostatních parametrech si byly obě křivky velice podobné. Současně tato metoda poskytovala dostatečně vysoký replikační signál (viz obr. 7b a 7c). Poměr mezi

signálem a šumem byl $3,9 \pm 0,8$. Analýza rozdělení buněčného cyklu ukázala, že cca $57,2 \pm 5,3$ % buněk se nacházelo ve fázi G1, $15,0 \pm 1,7$ % buněk ve fázi G2/M a $27,8 \pm 6,9$ % buněk ve fázi S (viz obr. 7d).



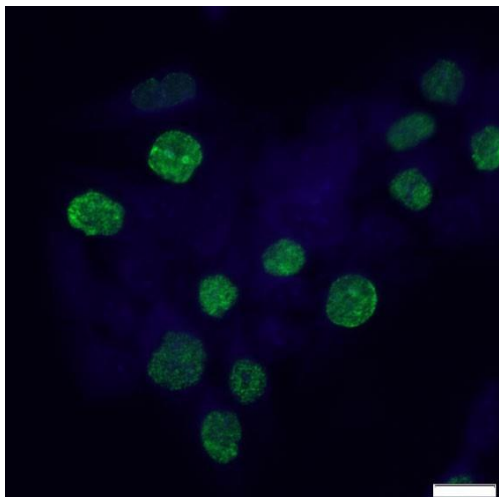
Obrázek 7 Detekce BrdU pomocí nízké koncentrace kyseliny chlorovodíkové a exonukleázy III v jádrech buněk NCI-H2009.

- a) Histogram integrálních intenzit DAPI v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) BrdU.
b) Příklad mikroskopické detekce replikace DNA pomocí BrdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
c) Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s BrdU.
d) Grafické znázornění zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

V případě použití vysoce koncentrovaného roztoku kyseliny chlorovodíkové byla v experimentech použita kyselina chlorovodíková ve dvou koncentracích - 2 N a 4 N.

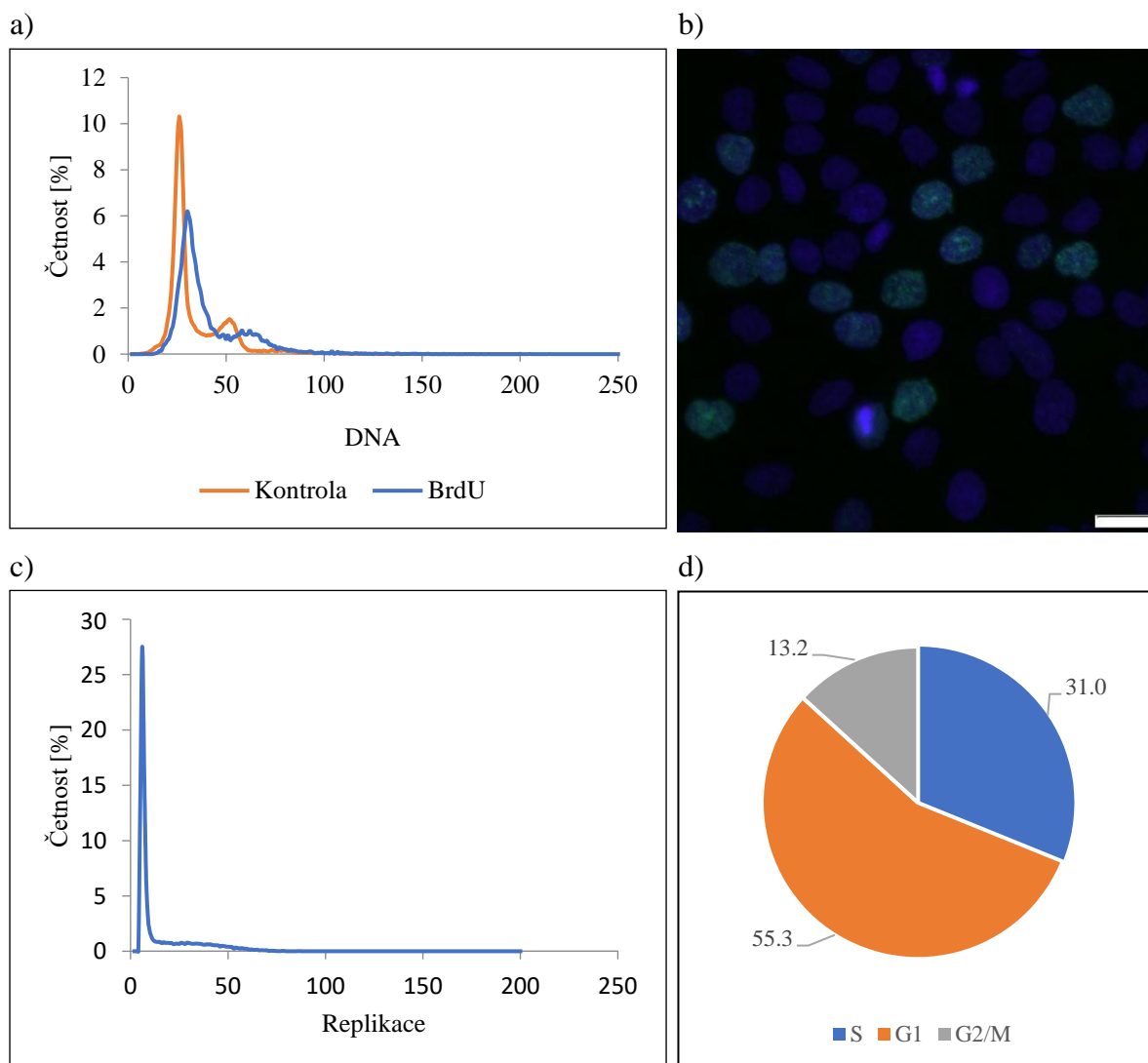
Inkubace ve 4 N kyselině chlorovodíkové vedla k silné denaturaci DNA a tím k výraznému snížení signálu DAPI. Nízký signál DAPI neumožnil definování buněčných jader

a následnou analýzu buněčného cyklu. Ačkoli bylo z mikroskopických snímků patrné, že replikační signál je vysoký (viz obr. 8), nebylo možné díky absenci signálu DAPI analyzovat průběh buněčného cyklu. Současně nebylo možné pomocí automatické softwarové analýzy určit poměr mezi signálem a šumem. Je zřejmé, že tato metoda je vhodná pouze v případě, kdy není nutná současná analýza buněčného cyklu.



Obrázek 8 Detekce BrdU pomocí 4 N HCl v jádrech buněk NCI-H2009
Příklad mikroskopické detekce replikace pomocí BrdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μ m.

Výrazně odlišné výsledky poskytla poloviční koncentrace kyseliny chlorovodíkové (2N). Použití 2N HCl na rozdíl od 4N HCl nevedlo k potlačení signálu DAPI, a tudíž bylo možné provést automatickou softwarovou detekci buněčných jader (viz obr. 9a a 9b). Z obdržných dat je zjevné, že histogram integrální intenzity DAPI v jádrech u buněk inkubovaných s BrdU byl podobný histogramu kontrolních buněk (viz obr. 9a). Rozdílem byl mírný nárůst šíře histogramu a pokles vrcholu odpovídajícího G1 buňkám. Metoda poskytovala poměrně vysoký replikační signál (viz obr. 9b a 9c). Poměr mezi replikačním signálem a šumem byl $5,5 \pm 1,8$. Analýza buněčného cyklu ukázala, že se v G1 fázi nacházelo $55,3 \pm 2,5$ % buněk, v G2/M fázi $13,2 \pm 3,6$ % buněk a v S fázi $31,0 \pm 1,3$ % buněk (viz obr. 9d).

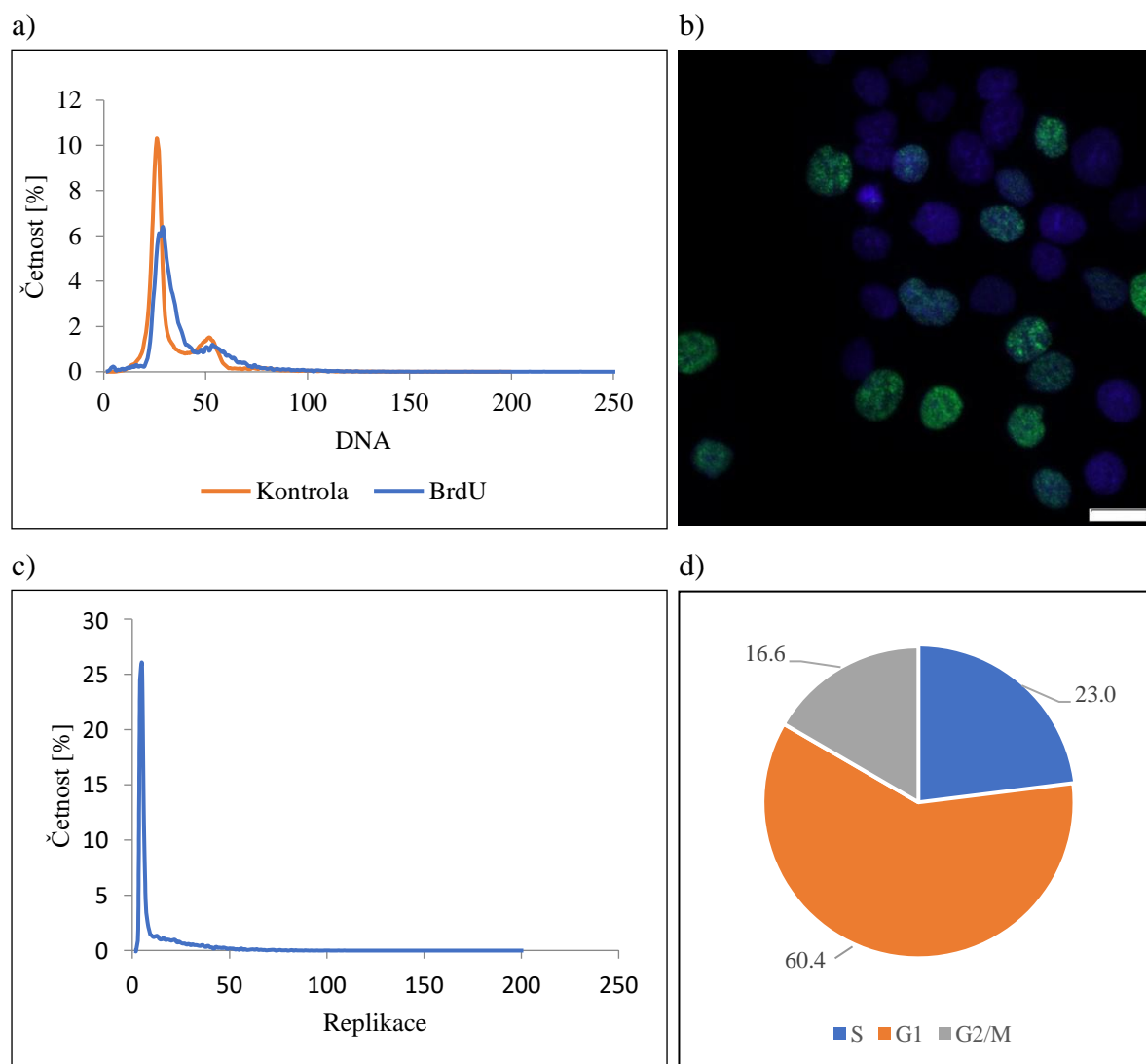


Obrázek 9 Detekce BrdU pomocí 2 N HCl v jádrech buněk NCI-H2009

- a) Histogram integrálních intenzit DAPI v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) BrdU.
 b) Příklad mikroskopické detekce DNA replikace pomocí BrdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
 c) Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s BrdU.
 d) Grafické znázornění zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Poslední metodou, která byla testována pro odhalení inkorporovaného BrdU v nově syntetizované DNA, byla inkubace vzorků v roztoku jednomocných iontů mědi a následná inkubace vzorků s exonukleázou III (Ligasová *et al.*, 2012). Metoda je založena na oxidativním ataku deoxyribózy jednomocnými ionty mědi v přítomnosti kyslíku. Podobně jako v případě použití roztoků obsahující nízké koncentrace kyseliny chlorovodíkové, dochází k vytvoření zlomů v DNA. Tyto zlomy následně umožňují vytvoření jednořetězcových úseků DNA působením exonukleázy III (Ligasová *et al.*, 2012; Ligasová *et al.*, 2017b). V případě histogramu integrálních intenzit DAPI v buněčném jádře došlo oproti kontrolním buňkám

k rozšíření histogramu, což vedlo ke snížení vrcholu odpovídajícího G1 buňkám a G2/M buňkám (viz obr. 10a). Metoda poskytla silný fluorescenční signál odpovídající lokalizaci BrdU i DAPI (viz obr. 10a až 10c). Vypočtený poměr mezi signálem a šumem byl $5,9 \pm 0,83$. Podle obdržných dat se v G1 fázi buněčného cyklu nacházelo $60,4 \pm 4,2$ % buněk, v G2/M fázi se nacházelo $16,6 \pm 1,5$ % buněk a v S fázi pak $23,0 \pm 2,9$ % buněk (viz obr. 10d).

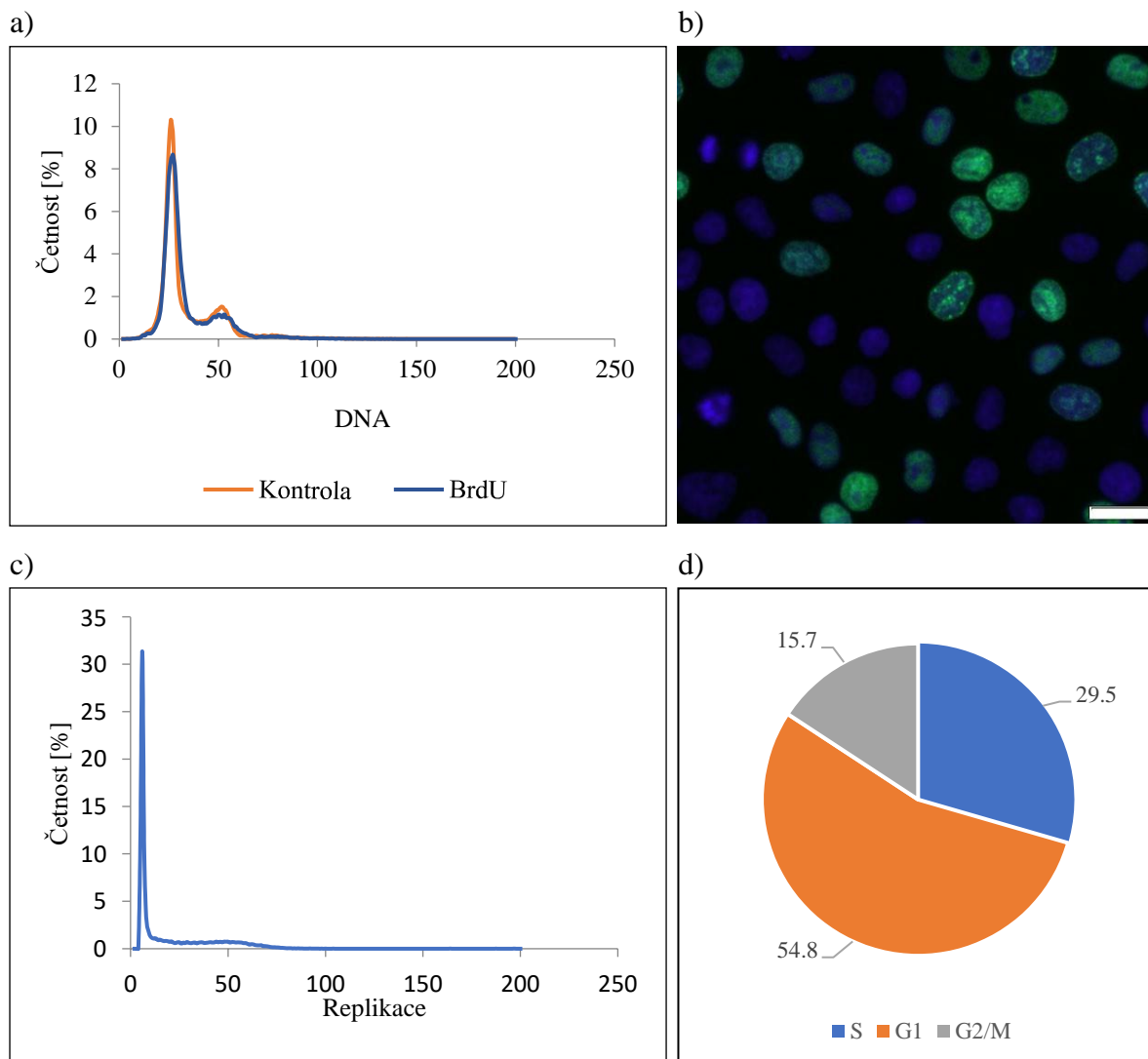


Obrázek 10 Detekce BrdU pomocí jednomocných kationtů mědi v jádrech buněk NCI-H2009
a) Histogram integrálních intenzit DNA v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) BrdU.
b) Příklad mikroskopické detekce replikace DNA pomocí BrdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
c) Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s BrdU.
d) Grafické znázornění zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

5.1.2 EdU

Pro detekci EdU byla použita tzv. klik reakce. Tato reakce je katalyzována Cu(I) cykloadicí [3+2], kdy koncová alkylová skupina reaguje s fluorescenčně značeným azidem

(Salic *et Mitchison*,2008). Metoda poskytla velice podobný histogram integrálních intenzit DAPI v buněčném jádře (viz obr. 11a) jako v případě kontrolních neznačených buněk. U buněk značených EdU došlo jenom k nízkému poklesu vrcholu odpovídajícímu G1 a G2/M buňkám. Současně tato metoda neměla negativní vliv na hodnocení replikační aktivity (viz obr. 11b a 11c). Poměr mezi signálem a šumem byl rovněž vysoký a odpovídal hodnotě $7,7 \pm 0,1$. Analýza buněčného cyklu ukázala, že v G1 fázi se nacházelo $54,8 \pm 5,4$ % buněk, v G2/M fázi $15,7 \pm 3,5$ % a v S fázi $29,5 \pm 1,9$ % buněk (viz obr. 11d).

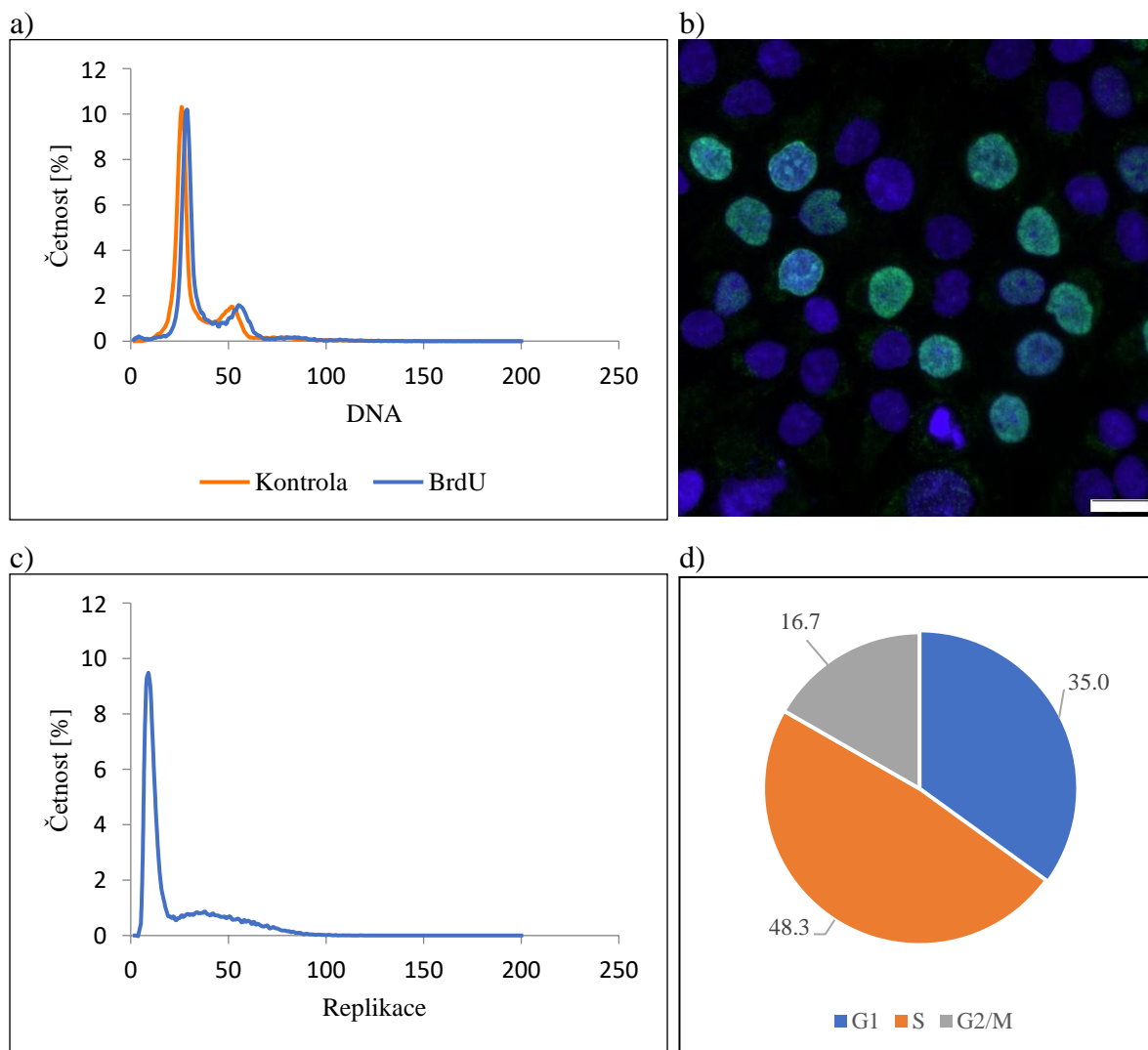


Obrázek 11 Detekce EdU pomocí klik reakce v jádrech buněk NCI-H2009

- Histogram integrálních intenzit DNA v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) EdU.
- Příklad mikroskopické detekce DNA replikace pomocí EdU (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
- Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s EdU.
- Grafické znázornění zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

5.1.3 Biotin-16-dUTP

Biotin-16-dUTP není na rozdíl od modifikovaných nukleosidů volně transportován přes buněčné membrány do buněk. Proto byl vpraven do buněk pomocí hypotonického roztoku (Koberna *et al.*, 1999). Následně byl detekován nepřímou imunofluorescencí pomocí primární a sekundární protilátky. Průběh histogramu integrálních intenzit DAPI v buněčné jádře buněk s inkorporovaným biotin-16-dUTP se lišil od kontrolních buněk velice mírně (viz obr. 12a). Odlišnost byla v mírném posunu grafu směrem k vyšším hodnotám signálu DAPI.



Obrázek 12 Detekce biotin-16-dUTP pomocí značené protilátky v jádrech buněk NCI-H2009
a) Histogram integrálních intenzit DAPI v jádrech buněk neznačených (oranžově) nebo značených (modře) biotin-16-dUTP.
b) Příklad mikroskopické detekce DNA replikace pomocí biotin-16-dUTP (zeleně) a DNA pomocí DAPI (modře), měřítko = 20 μm .
c) Histogram průměrných hodnot replikačního signálu v jádrech buněk inkubovaných s biotin-16-dUTP.
d) Grafické znázornění zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Testovaná metoda rovněž umožnila spolehlivé mikroskopické hodnocení replikační aktivity buněk (viz obr. 12b a 12c). Poměr mezi signálem a šumem byl $5,7 \pm 0,4$. Analýza buněčného cyklu ukázala, že $48,3 \pm 3,0$ % buněk se nacházelo v G1 fázi, $16,7 \pm 1,0$ % buněk bylo v G2/M a $35,0 \pm 4,0$ % buněk bylo v S fázi (viz obr. 12d).

V souhrnu lze konstatovat, že většinu testovaných způsobů detekce replikace DNA je možné považovat za vhodnou pro současnou analýzu replikace DNA a buněčného cyklu. V případě použití BrdU jako značícího nukleosidu byl poměr mezi signálem a šumem ve všech případech kromě 4 N HCl nad hodnotou 3 a umožňoval jasné rozlišení mezi replikujícími a nereplikujícími buňkami. V případě 4 N HCl nebyl poměr signál/šum vypočítán, protože při jejím použití nebylo možné určit buněčná jádra pomocí DAPI. Z tohoto pohledu je tato metoda zcela nevhodná pro analýzu buněčného cyklu. Nicméně mikroskopické obrázky ukázaly, že i v případě použití 4 N HCl je poměr mezi signálem a šumem poměrně vysoký a v případě, že není nutná současná analýza buněčného cyklu, je možné použít i tuto metodu pro kontrolu replikace.

5.2 Vliv fixačních protokolů

V dalších experimentech byl porovnán vliv fixace na replikační signál DNA u NCI-H2009 buněk pomocí vybraných protokolů detekce replikace DNA. Vedle fixace 2% formaldehydem byla v experimentech použita fixace 70% etanolem.

Každá z testovaných fixačních metod funguje na jiném principu. Fixace formaldehydem vede k vytvoření kovalentních vazeb mezi proteiny, primárně mezi amino skupinami např. lyzinu. Po fixaci ve formaldehydu byly vzorky permeabilizovány. Jedná se krok, který slouží především k permeabilizaci buněčné membrány (Jamur *et Oliver*, 2009). Etanol fixuje vzorky snížením rozpustnosti proteinových molekul a rozrušením hydrofobních interakcí, které proteinům umožňují vytvoření terciární struktury. V případě etanolu již není zpravidla nutná permeabilizace (Troiano *et al.*, 2009).

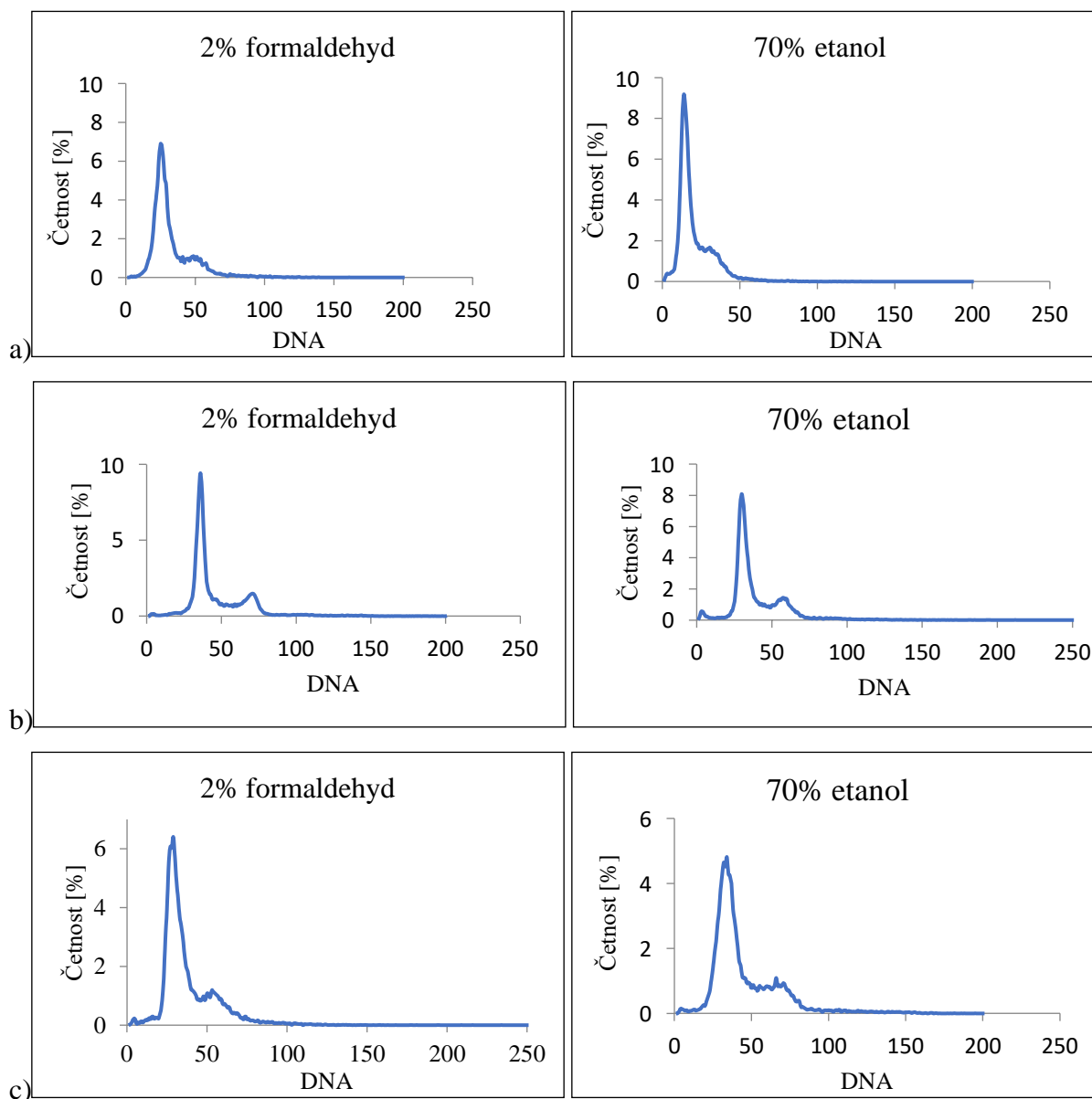
Replikační aktivita buněk byla sledována pomocí těchto protokolů: i) BrdU a DNázy I a exonukleázy III; ii) BrdU a nízké koncentrace kyseliny chlorovodíkové; iii) BrdU a jednomocné mědi; iv) EdU a klik reakce a v) biotin-16-dUTP a protilátky. Následně byly jednotlivé metody porovnány z hlediska zastoupení replikujících buněk u jednotlivých metod (viz tab. 5). Z výsledků je patrné, že oba použité způsoby fixace poskytly podobné frakce replikujících buněk nezávisle na použitém protokolu detekce replikace. Ačkoli existovaly mírné

rozdíly, celkové průměry u obou fixačních protokolů se pohybovaly v průměru kolem 31 % (viz tab. 5).

Tabulka č. 5: Procentuální zastoupení replikujících buněk u vzorků fixovaných formaldehydem nebo etanolem

Nukleotid/ nukleosid	Metoda detekce	Fixace formaldehydem [%]	Fixace etanolem [%]
	DNáza I	28,3 ± 4,2	27,6 ± 9,1
BrdU	Nízká koncentrace HCl	27,8 ± 3,3	30,2 ± 6,9
	Cu (I)	34,4 ± 0,9	37,8 ± 2,9
EdU	Klikací reakce	28,3 ± 0,9	29,4 ± 1,9
Biotin-16-dUTP	Protilátka	36,6 ± 2,2	33,8 ± 4,0
Průměr		31,1 ± 2,3	31,8 ± 4,9

Současně bylo zjevné, že pouze protokol založený na detekci BrdU pomocí DNázy I a exonukleázy III, poskytl výrazně odlišné histogramy signálu DAPI. Pravděpodobně se jednalo o důsledek rozdílného působení DNázy a exonukleázy v případě sledovaných fixačních protokolů. Průběhy histogramů integrálních intenzit DAPI v buněčných jádrech ukázaly, že v případě použití enzymatického odhalení BrdU kombinací DNázy I a exonukleázy III vedla fixace etanolem k posunu grafu směrem k nižším hodnotám signálu DAPI. Současně došlo k nárůstu signálu v oblasti odpovídající buňkám v G1 fázi (viz obr. 13a). V případě málo koncentrované HCl byl průběh histogramů integrálních intenzit DAPI velice podobný nezávisle na použitém způsobu fixace (viz obr. 13b). Použití jednomocných iontů mědi u buněk fixovaných etanolem vedlo jednak k posunu grafu směrem k vyšším hodnotám signálu DAPI a současně ke snížení signálu odpovídajícímu buňkám v G1 fázi (viz obr. 13c).



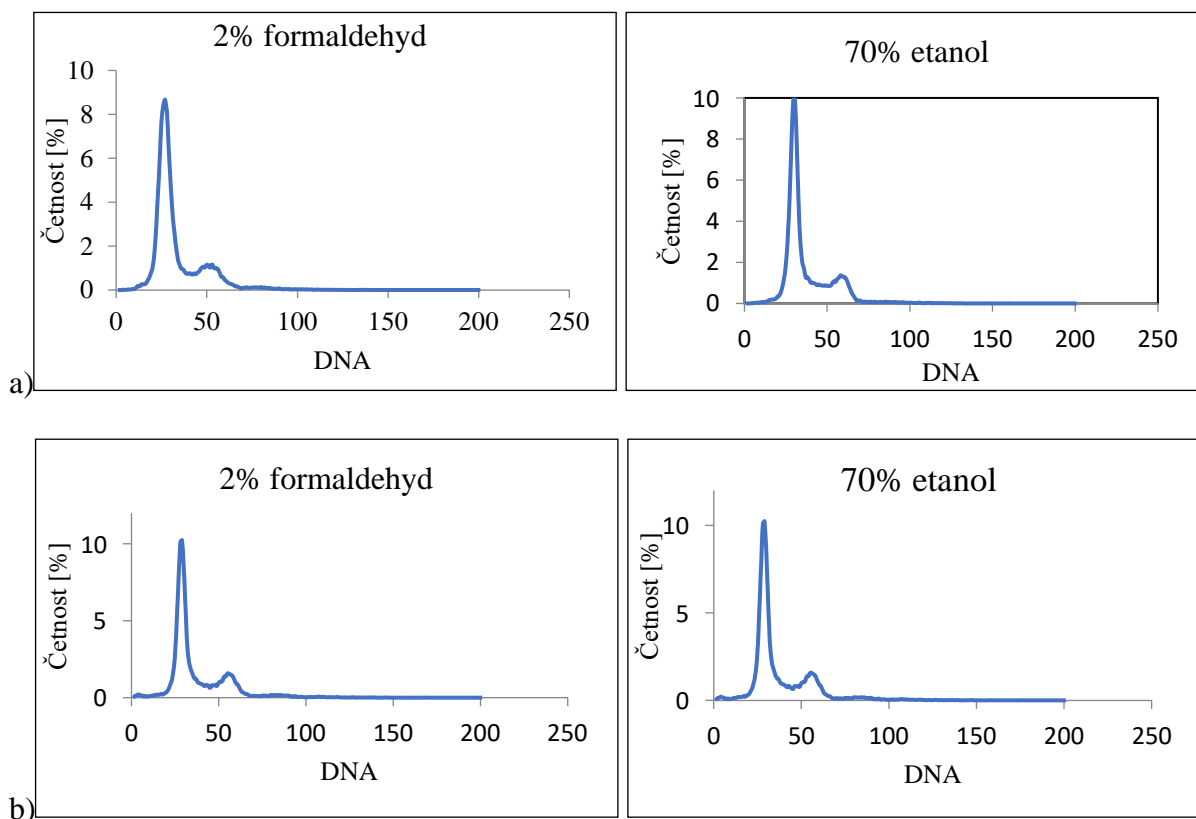
Obrázek 13 Porovnání vlivu fixačních protokolů na histogram signálu DAPI v jádrech NCI-H2009 buněk inkubovaných s 10 μ M BrdU.

a) BrdU bylo detekováno pomocí DNázy I a exonukleázy III.

b) BrdU bylo detekováno pomocí málo koncentrované HCl a exonukleázy III.

c) BrdU bylo detekováno pomocí roztoku jednocenné mědi.

V případě modifikovaného nukleosidu EdU byly průběhy histogramů integrálních intenzit DAPI podobné, jenom v případě etanolem fixovaných buněk došlo k mírnému posunu grafu směrem k vyšším hodnotám signálu DAPI a k mírnému nárůstu signálu odpovídajícímu buňkám v G1 fázi (viz obr. 14a). V případě biotin-16-dUTP byly průběhy histogramů integrálních intenzit téměř totožné (viz obr. 14b).



Obrázek 14 Porovnání vlivu fixačních protokolů na histogram signálu DAPI v jádrech NCI-H2009 buněk

a) Buňky byly inkubovány s 10 μ M EdU.

b) Buňky byly inkubovány s 0,2 mM biotin-16-dUTP.

5.3 Porovnání detekce replikace u různých typů buněčných linií

V následujících experimentech byly porovnány tři protokoly pro detekci replikace DNA u pěti různých lidských buněčných linií. Jednalo se o dvě nádorové linie – HeLa a NCI-H2009 buňky a tři primární diploidní fibroblasty – IMR-90, MRC-5 a BJ buňky. V experimentech byla sledována replikační aktivita buněk pomocí i) BrdU a jeho detekce málo koncentrovanou HCl a exonukleázou III; ii) EdU a jeho detekce klik reakcí a iii) nukleotidu biotin-16-dUTP, který byl vpraven do buněk hypotonií a detekován nepřímou imunofluorescencí protilátkami. V případě detekce replikace pomocí BrdU anebo EdU, byly buňky fixovány 70% etanolem. V případě použití biotin-16-dUTP, byly buňky fixovány 2% formaldehydem. Fixační protokoly byly vybrány tak, aby pro danou metodu detekce replikace poskytovaly maximální signál. Protokol založený na použití málo koncentrované HCl a exonukleáze III byl vybrán pro detekci BrdU z důvodu, že je jednoduchý a nevede k významné destrukci DNA.

U všech použitých metod byla provedena analýza signálů pomocí obrazové cytometrie. Na jejím základě byl vypočten poměr mezi signálem a šumem (viz tab. 6) a procentuální podíl buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (viz tab. 7-9).

Tabulka č. 6: Porovnání poměru mezi signálem a šumem u různých buněčných linií

Způsob detekce replikace			
DNA	BrdU	EdU	Biotin-16-dUTP
Buněčná linie			
NCI-H2009	5,7 ± 1,8	6,9 ± 0,1	5,1 ± 0,4
HeLa	5,9 ± 2,9	5,3 ± 1,7	6,1 ± 1,7
IMR-90	8,8 ± 0,6	6,8 ± 1,1	2,7 ± 0,1
BJ	5,5 ± 1,8	5,3 ± 0,5	2,2 ± 0,6
MRC5	4,3 ± 2,6	4,8 ± 1,0	3,7 ± 0,8
Průměr	6,0 ± 1,9	6,9 ± 0,1	4,0 ± 0,7

Tabulka č. 7: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleosidem BrdU

Buněčná linie	S fáze [%]	G1 fáze [%]	G2/M fáze [%]
NCI-H2009	27,8 ± 6,9	57,2 ± 5,3	15,0 ± 1,7
HeLa	31,7 ± 7,7	50,5 ± 5,4	17,7 ± 3,2
IMR-90	38,3 ± 6,1	51,6 ± 5,6	10,1 ± 0,6
BJ	20,5 ± 11,8	75,3 ± 11,5	4,2 ± 0,7
MRC-5	12,2 ± 1,3	79,4 ± 1,0	8,4 ± 1,3
Průměr	25,3 ± 5,5	63,3 ± 4,9	11,3 ± 1,3

Tabulka č. 8: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleosidem EdU

Buněčná linie	S fáze [%]	G1 [%]	G2/M [%]
NCI-H2009	35,0 ± 4,0	48,3 ± 3,0	16,7 ± 1,0
HeLa	34,2 ± 3,3	58,3 ± 2,3	17,5 ± 0,9
IMR-90	45,0 ± 11,0	46,4 ± 9,9	8,5 ± 1,6
BJ	18,1 ± 1,5	79,0 ± 2,3	2,8 ± 1,2
MRC-5	19,9 ± 13,9	75,9 ± 11,6	4,1 ± 4,3
Průměr	27,2 ± 6,4	60,5 ± 5,5	10,2 ± 2,1

Tabulka č. 9: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u různých buněčných linií s použitým nukleotidem biotin-16-dUTP

	S [%]	G1 [%]	G2/M [%]
Buněčná linie			
NCI-H2009	23,0 ± 2,9	60,4 ± 4,2	16,6 ± 1,5
HeLa	33,1 ± 8,6	53,1 ± 4,5	13,8 ± 10,8
IMR-90	36,8 ± 4,8	43,1 ± 6,7	19,9 ± 3,7
BJ	21,7 ± 13,8	71,6 ± 11,2	6,4 ± 4,4
MRC-5	18,4 ± 2,9	73,4 ± 3,8	8,6 ± 0,8
Průměr	26,6 ± 6,6	60,3 ± 6,1	13,1 ± 4,2

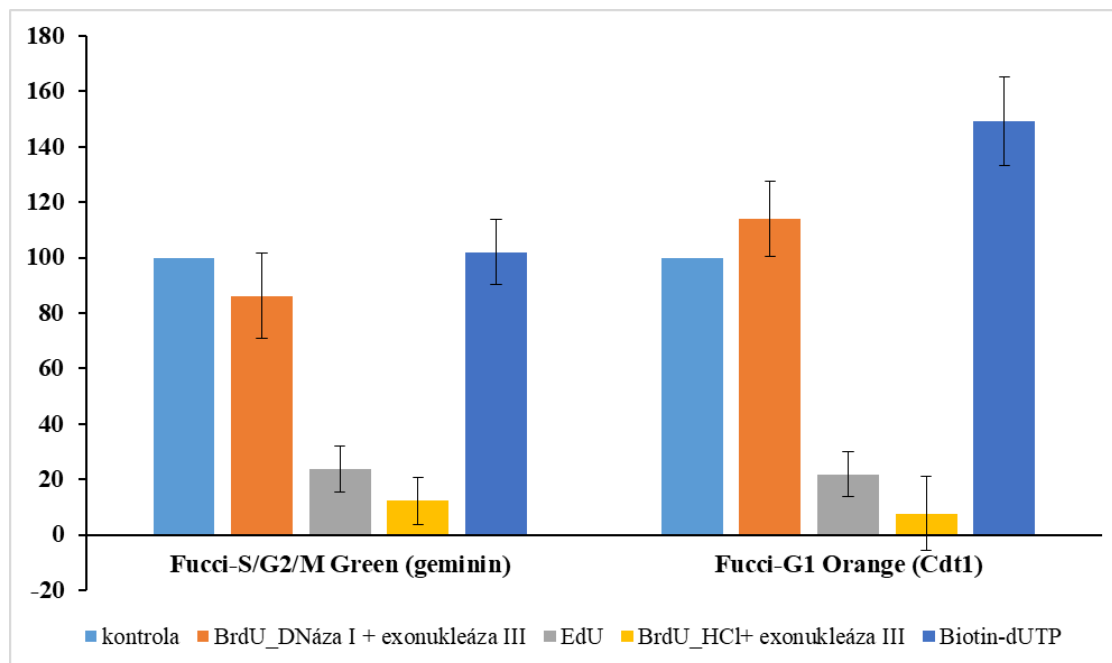
Analýzou poměru mezi signálem a šumem bylo zjištěno, že u sledovaných nádorových liniích všechny použité způsoby poskytly vysoký poměr mezi signálem a šumem a umožňovaly tak vynikající rozlišení replikujících buněk od nereplikujících. Tento poměr se pohyboval nad hodnotou 5. V případě primárních linií se ukázalo, že je daleko vhodnější použít pro analýzu replikace DNA jeden ze dvou testovaných modifikovaných nukleosidů než biotinylovaný dUTP. Oba nukleosidy poskytly mnohem vyšší poměr mezi signálem a šumem (viz tab. 6), a tedy i jasnější rozlišení replikujících buněk.

5.4 Vliv různých způsobů detekce replikace na fluorescenci fluorescenčních proteinů

V poslední části práce byl testován vliv vybraných protokolů používaných k detekci replikace na intenzitu fluorescence fluorescenčních proteinů v HeLa buňkách s vektorem Fucci. Tyto buňky produkují fluorescenčně značené proteiny Cdt1 a geminin. Cdt1 je značen červeným fluorescenčním proteinem, geminin zeleným fluorescenčním proteinem. Největší množství proteinu Cdt1 je v buňkách v G1 fázi a pak jeho množství postupně klesá (Nishitani *et al.*, 2004). Naopak největší množství gemininu je v S a G2 fázi a během mitózy dochází k jeho postupné degradaci (McGarry a Kirschner, 1998).

Pro analýzu buněčného cyklu byl použit nukleosid BrdU, který byl odhalen pomocí DNázy I a exonukleázy III nebo nízké koncentrace HCl a exonukleázy III, nukleosid EdU nebo nukleotid biotin-16-dUTP. Buňky s inkorporovaným EdU nebo BrdU byly fixovány 70% etanolem po dobu 60 minut na -20 °C. Buňky s inkorporovaným biotin-16-dUTP byly fixovány pomocí 2% formaldehydu po dobu 10 minut při pokojové teplotě a následně byly buňky permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100.

V případě BrdU a jeho odhalení pomocí DNázy I a exonukleázy III, došlo ke vzrůstu signálu odpovídajícímu proteinu Cdt1 a to přibližně o 14,2 % oproti kontrole (viz obr. 15 levá část). Naopak v případě signálu odpovídajícímu gemininu došlo k jeho poklesu o 13,7 % oproti kontrole (viz obr. 15 pravá část).



Obrázek 15 Porovnání vlivu různých způsobů detekce replikace na fluorescenci fluorescenčních proteinů u HeLa Fucci buněk.

Naproti tomu použití nízké koncentrace HCl a exonukleázy III pro detekci BrdU vedlo ve srovnání s kontrolou k výraznému snížení signálů odpovídajících oběma proteinům (viz obr. 15). V případě proteinu Cdt1 byl signál jen 7,7 % a u gemininu 12,4 % ve srovnání se signály u kontrolních buněk (viz obr. 15). Podobný pokles signálu obou fluorescenčních proteinů byl i v případě detekce replikace pomocí EdU. V tomto případě byl signál u proteinu Cdt1 21,9 %, u proteinu gemininu na 23,7 % (viz obr. 15). Naopak, detekce replikace pomocí biotin-16-dUTP nevedla ke snížení signálu fluorescenčních proteinů. Signál odpovídající proteinu Cdt1 byl přibližně stejný jako u kontrolních buněk (102 %). Naproti tomu v případě signálu odpovídajícímu proteinu gemininu došlo k výraznému nárůstu signálu v porovnání s kontrolními buňkami (nárůst byl o 49,3 %).

Z výsledků je zřejmé, že v případě analýzy replikace u buněk s transfekovanými fluorescenčními proteiny jako je např. Fucci vektor, nebo GFP je vhodná metoda využívající biotin-16-dUTP nebo BrdU a jeho odhalení pomocí DNázy I a exonukleázy III. Tyto metody buď nevedly k žádnému poklesu signálu fluorescenčních proteinů, nebo byl pokles velice malý. Naproti tomu, použití BrdU a nízké koncentrace HCl nebo použití EdU a klikací reakce se

ukázaly jako zcela nevhodné pro analýzu syntézy DNA u buněk exprimujících současně fluorescenčně značené proteiny. Použití těchto způsobů vedlo k výraznému snížení fluorescence obou sledovaných fluorescenčních proteinů.

6 Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo porovnání vybraných metod detekce replikace DNA z hlediska síly signálu a z hlediska jejich vlivu na analýzu buněčného cyklu. V práci byly porovnávány metody založené na použití dvou modifikovaných nukleosidů a jednoho modifikovaného nukleotidu. Jednalo se o BrdU, EdU a biotin-16-dUTP. Provedené analýzy zahrnovaly testování 4 různých přístupů odhalení BrdU ve struktuře DNA. Tyto přístupy byly založené na působení a) DNázy I a exonukleázy III; b) nízké koncentrace HCl a exonukleázy III; c) koncentrované HCl (4 N a 2 N) a d) jednomocných iontů mědi. EdU byl detekován pomocí klikací reakce a biotin-16-dUTP nepřímou imunofluorescencí pomocí protilátek. Vybrané metody detekce replikace byly současně použity ve srovnávací studii zaměřené na vhodnost jejich použití u různých buněčných linií. Vedle toho byl porovnáván vliv vybraných způsobů detekce replikace DNA na fluorescenci fluorescenčních proteinů. V těchto experimentech byly použity HeLa buňky transformované vektorem FUCCI. Shrnutí hodnot nejdůležitějších sledovaných parametrů u jednotlivých testovaných přístupů a jejich porovnání je uvedeno v Tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Porovnání sledovaných parametrů u testovaných metod

Použitý nukleosid nebo nukleotid	Použitá metoda	Poměr mezi signálem a šumem	Materiálová náročnost (cena za 1 sklo v Kč)	Časová náročnost	Vliv na FUCCI	Vliv na graf DNA	Hodnocení
BrdU	DNáza I a exonukleáza III	5,0 ± 0,5	11,8	~2,5 hod.	Ne	Mírný	2
	HCl a exonukleáza III	3,9 ± 0,8	11,3	~2,8 hod.	Ano	Mírný	3
	4 N HCl	N/A	9	~2,7 hod.	N/A	N/A	3
	2 N HCl	5,5 ± 1,8	9	~2,7 hod.	N/A	Mírný	2
	Cu(I)	5,9 ± 0,8	11,3	~2,8 hod.	N/A	Výrazný	2
EdU	Klikací reakce	7,7 ± 0,1	0,35	~2,3 hod.	Ano	Žádný	1
Biotin-16-dUTP	Značená protilátka	5,7 ± 0,4	52	~2,5 hod.	Ne	Mírný	2

První testovanou metodou pro detekci BrdU byla metoda využívající DNázu I a exonukleázu III. Výhodou uvedené metody je fakt, že v porovnání s kontrolními buňkami vykazuje jen mírný vliv na průběh histogramu DNA. Toto zjištění je v souladu s výsledky studie publikované Takagim a kolektivem, kde autoři popisují možnost enzymatické detekce

inkorporovaného BrdU pomocí DNázy I bez poškození DNA. Současně ukázali, že v případě potřeby je možné zvýšit signál inkubací s exonukleázou III (Takagi *et al.*, 1993).

V bakalářské práci byly použity dva způsoby fixace vzorků. U obou dvou způsobů došlo ke zploštění části křivky odpovídající buňkám v G2/M fázi. Toto zploštění bylo výraznější u formaldehydické fixáže. Je pravděpodobné, že tento rozdíl mohl být způsoben vyšší použitou koncentrací DNázy I v případě buněk fixovaných formaldehydem, která mohla vést k vyššímu štěpení DNA. I když například v práci Ligasová *et al.*, 2017 autoři nepozorovali pokles signálu odpovídajícímu DAPI, v této studii nebyl analyzován vliv na průběh buněčného cyklu. Změny v průběhu histogramu DNA mohou být způsobeny odlišnou přístupností chromatinu pro nukleázy (Schwartz *et al.*, 2019). Odlišnosti oproti výše uvedené práci mohou být rovněž důsledkem použití odlišné buněčné linie. Dalším důležitým krokem je také postfixace buněk 0,2% formaldehydem po inkubaci s primární protilátkou (Ligasová *et al.*, 2017a; Ligasová *et al.*, 2017b). Komplex protilátky a BrdU může v závislosti na použitém protokolu a klonu protilátky namířené vůči BrdU rychle disociovat, a to má za následek snížení signálu. Naopak postfixace vede ke stabilizaci tohoto komplexu a tím ke zvýšení signálu (Ligasová *et al.*, 2017a; Ligasová *et al.*, 2017b). Nespornou výhodou této metody je její minimální vliv na intenzitu signálu fluorescenčních proteinů u buněk s FUCCI vektorem. V případě Fucci-G1-orange (Cdt1) dokonce došlo k mírnému nárůstu signálu (o cca 14,2 %) v porovnání s kontrolními buňkami. Vzhledem k směrodatné odchylce ($\pm 13,6$) se však mohlo jednat o důsledek nepřesnosti měření. Naopak v případě Fucci-S/G2/M-green (geminin) došlo k poklesu signálu o cca 14 %. I v tomto případě se pohybovala směrodatná odchylka kolem 15,6 %. Podobné výsledky byly publikovány například v práci Ligasové a kolektivu (Ligasová *et al.*, 2017b). V této práci autoři nepozorovali v případě použití DNázy I a exonukleázy III snížení fluorescenčního signálu ani u jednoho z fluorescenčních proteinů. Mírný rozdíl v případě signálu Fucci-S/G2/M-green (geminin) mohl být dán použitou koncentrací DNázy I. Je pravděpodobné, že snížením koncentrace na polovinu by nedošlo ani u tohoto proteinu k mírnému poklesu fluorescence. V souhrnu lze říci, že nespornou výhodou metody využívající enzymatické odhalení BrdU je její minimální dopad na buněčné proteinové struktury, RNA a na fluorescenci fluorescenčních proteinů. Naopak, nevýhodou této metody může být její závislost na použití vhodných protilátek vůči BrdU (Ligasová *et al.*, 2017b).

Další testovanou metodou pro odhalení BrdU byla metoda využívající kombinaci nízké koncentrace HCl a exonukleázy III. Sledovaná metoda poskytla poměr signálu a šumu $3,9 \pm 0,8$, který byl podobný jako poměr vypočítaný v publikované práci od Ligasové

a kolektivu (Ligasová *et al.*, 2017a). Použití nízké koncentrace HCl pro odhalení BrdU mělo vliv na histogram DNA. V tomto ohledu došlo ve srovnání s kontrolními buňkami k posunu histogramu DNA směrem k vyšším hodnotám. V práci Ligasové a kolektivu (Ligasová *et al.*, 2017a) nebyl pozorován žádný vliv na signál DNA v porovnání s kontrolními buňkami. Analýza buněčného cyklu pomocí obrazové cytometrie nebyla v dané práci provedena. Z tohoto pohledu se rovněž jedná o metodu vhodnou pro analýzu buněčného cyklu. Nevýhodou je ale její negativní vliv na fluorescenci fluorescenčních proteinů. V případě Fucci-G1-orange došlo k poklesu signálu o 87,6 % a v případě Fucci-S/G2/M-green o 92,3 % v porovnání s kontrolními buňkami. V práci Ligasové a kolektivu (Ligasová *et al.*, 2017a) byl rovněž pozorován pokles signálu, ovšem výrazně menší. V případě Fucci-G1-orange došlo k poklesu o 55 % a v případě Fucci-G1-orange došlo k poklesu o 40 %. Důvodem tak nízkého signálu může být nedostatečné nasvícení při snímání sklíček.

Třetím způsobem detekce BrdU bylo použití vysoce koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4 N). I když vysoce koncentrovaná HCl poskytla vysoký signál odpovídající BrdU, poměr mezi signálem a šumem nebylo možné stanovit pomocí obrazové analýzy. Důvodem byl fakt, že důsledkem působení vysoce koncentrované HCl došlo k denaturaci DNA, to znemožnilo navázání DAPI na DNA a nebylo možné identifikovat buněčná jádra. Toto bylo podpořeno i obrazem z fluorescenčního mikroskopu, kde byl pozorován silný signál odpovídající BrdU, ale nebyl pozorován signál odpovídající DAPI. Obdržené výsledky jsou v souladu s daty publikovanými například Dimitrovou a Bereznyem (Dimitrova *et al.*, 2002) nebo Humbertem a kolektivem (Humbert *et al.*, 1992). V tomto ohledu je použití vysoce koncentrované HCl vhodné pouze pro rychlou detekci DNA replikace bez následné analýzy buněčného cyklu, protože se jedná o poměrně levnou metodu. Výrazně lepší výsledky poskytla poloviční koncentrace kyseliny chlorovodíkové (2 N). V tomto případě nevedla inkubace vzorků k denaturaci DNA a bylo možné provést analýzu buněčného cyklu pomocí obrazové cytometrie. Obdržená data jsou v souladu s již dříve publikovaným závěry van Dierendoncka a kolektivu, kteří zjistili, že použití 2 N HCl pro sledování organizace syntézy DNA nevedlo k destrukci DNA vlivem denaturace (van Dierendock *et al.*, 1989) Současně tento způsob poskytl poměrně vysoký poměr mezi signálem a šumem ($5,5 \pm 1,8$) a měl jen minimální vliv na histogram DNA. Kromě toho je výhodou této metody nízká cena a jednoduchá proveditelnost.

Poslední metodou testovanou pro odhalení BrdU je metoda využívající jednomocné kationty mědi. Tento způsob poskytl v rámci metod sloužících k odhalení BrdU nejvyšší poměr

mezi signálem a šumem ($5,9 \pm 0,8$). Toto zjištění je v souladu s výsledky publikovanými Ligasovou a kolektivem, kteří při použití stejného způsobu pro detekci replikace zjistili poměr mezi signálem a šumem cca 4,2 (Ligasová *et al.*, 2015). Kromě toho je výhodou použití měďných iontů minimální vliv na proteiny umožňující současnou detekci replikace a dalších buněčných složek. V uvedené studii autoři nepozorovali negativní vliv této metody na DNA. Autoři ale nesledovali její vliv na histogram DNA. (Ligasová *et al.*, 2012). Ačkoliv metoda poskytovala vysoký poměr mezi signálem a šumem, a tudíž jasné rozlišení replikujících a nereplikujících buněk, analýza histogramu DNA ukázala, že oproti kontrolním buňkám došlo k rozšíření histogramu DNA. To vedlo ke snížení vrcholu odpovídajícímu G1 buňkám a téměř vymizení vrcholu odpovídajícímu G2/M buňkám.

Kromě nukleotidu BrdU byl použit pro detekci replikace DNA nukleotid EdU. Ten byl detekován klikací reakcí. Výhodou uvedené metody je vysoký poměr mezi signálem a šumem ($7,7 \pm 0,1$). Současně se tento způsob ukázal vhodný pro analýzu buněčného cyklu. Průběh histogramu DNA byl velmi podobný histogramu kontrolních buněk. Podle autorů několika studií (např. Hua *et Kearsley*, 2011, Ligasová *et al.*, 2015) je použití EdU vhodné pro detekci syntézy DNA v experimentech využívající krátké značení. Kromě toho je tento přístup velice jednoduchý na provedení (Salic *et Mitchison*, 2008). Na druhou stranu, nevýhodou můžou být náklady na provedení v případě použití komerčně prodávaných kitů vedoucím až k čtyřistanásobně vyšším nákladům oproti použití samostatných chemikálií. Další mnohem významnější nevýhodou EdU je jeho vysoká toxicita (např. Kohlmeier *et al.*, 2013, Zhao *et al.*, 2013, Ligasová *et al.*, 2015). V některých studiích bylo například popsáno, že inkorporace EdU vede ke zlomům DNA a následně k buněčné smrti (Kohlmeier *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Dále bylo zjištěno, že hodnota IC50 u HeLa buněk (hodnota koncentrace, která vede k 50% přežívání buněk oproti kontrole) je více než padesátkrát nižší u EdU než u BrdU (Ligasová *et al.*, 2015). Proto je EdU vhodné pro sledování syntézy DNA zejména při kratších inkubačních časech (Diermeier-Daucher, *et al.*, 2009, Ligasová *et al.*, 2015). Kromě toho EdU neumožňuje současnou analýzu fluorescenčních proteinů. Jak ukázala obdržená data, u HeLa Fucci buněk vedla jejich inkubace s EdU a jeho následná detekce pomocí klik reakce k vysokému poklesu signálu u obou fluorescenčních proteinů. U Fucci-G1-orange poklesl signál o 76,3 % a u proteinu Fucci-G2/S/M-green o 78,1 %. Toto pozorování se mírně lišilo od dat publikovaných Ligasovou a kolektivem (Ligasová *et al.*, 2017), kde při použití EdU a klikací reakce nepozorovali žádný fluorescenční signál. Důvodem odlišných pozorování může být použití rozdílného fixačního protokolu případně odlišnosti ve složení klikací směsi.

Poslední testovaná metoda byla založena na modifikovaném nukleotidu biotin-16-dUTP. Ten na rozdíl od nukleosidů není volně transportován přes buněčné membrány, ale musí být do buněk vpraven např. pomocí hypotonického roztoku. Biotin-16-dUTP byl detekován pomocí nepřímé imunofluorescence (Koberna *et al.*, 1999). Metoda poskytovala vysoký poměr signálu a šumu ($5,7 \pm 0,4$) a tudíž dobré rozlišení replikujících a nereplikujících buněk. Histogram DNA se od kontrolních buněk lišil především v jeho šíři, tento rozdíl byl minimální. Nevýhoda této metody spočívá především v poměrně vysokých nákladech a na faktu, že neumožňuje použít přesně definované delší pulsy značení. V případě detekce replikace u HeLa Fucci buněk, nevedla detekce biotin-16-dUTP k poklesu signálu fluorescenčních proteinů. V případě Fucci-S/G2/M-Green byl signál přibližně stejný jako u kontrolních buněk. V případě Fucci-G1-orange signálu došlo naopak k výraznému nárůstu signálu oproti kontrolním buňkám. Důvod tohoto zvýšení není jasný.

Jednotlivé testované metody lze hodnotit z několika hledisek. Z hlediska poměru signálu a šumu byla jako nejlepší vyhodnocena metoda využívající k detekci replikace DNA nukleotid EdU a klikací reakci. Naopak jako nejhorší se ukázala metoda založená na použití vysoce koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Při hodnocení vlivu jednotlivých metod detekce replikace na intenzitu signálu fluorescenčních proteinů byly nejlepší dvě metody. Jednak to byla metoda využívající BrdU a jeho odhalení pomocí DNázy I a exonukleázy III a jednak metoda detekující biotin-16-dUTP pomocí protilátek.

V případě analýzy buněčného cyklu je možné použít hned trojici metod. Jednalo se o i) metodu založenou na DNáze I a exonukleáze III; ii) metodu založenou na nízké koncentraci kyseliny a exonukleáze III a iii) metodu založenou na EdU.

Při porovnání ceny a rychlosti se jako nejlepší ukázala metoda využívající EdU a k jeho odhalení pomocí klikací reakce. Cena za jeden vzorek je v tomto případě asi 0,35 Kč. Naopak, nejvyšší náklady byly v případě použití biotin-16-dUTP, kde je cena za jeden vzorek asi 52 Kč.

Při srovnání jednotlivých metod pro jejich použití u různých buněčných linií se ukázala metoda využívající modifikovaný nukleotid biotin-16-dUTP jako nejméně vhodná pro detekci replikační aktivity u primárních linií. Poměr mezi signálem a šumem byl u primárních buněčných linií na rozdíl od nukleosidu BrdU ($6,2 \pm 3,2$) a EdU ($5,6 \pm 0,8$) velice nízký (průměrně $2,8 \pm 0,7$) a současně histogramy DNA byly méně přehledné a jednotlivé fáze buněčného cyklu byly špatně rozeznatelné. Toto může být způsobeno například odlišnou propustností buněčné membrány pro modifikované deoxynukleotidy a nukleosidy. Zatímco

modifikované nukleosidy jsou do buněk volně transportovány (Koberna *et al.*, 1999), nukleotidy musí být do buněk vnášeny pomocí různých systémů (např. Graessman *et al.*, 1974; Poste *et al.*, 1976; Pagano *et Weinstein*, 1978; Zawada *et al.*, 2018).

7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce obsahuje dvě základní části: teoretickou a praktickou část.

V rámci teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma replikace jaderné DNA a mtDNA. Dále byly v této části popsány různé metody vizualizace syntézy DNA, jako například detekce replikace DNA pomocí radioisotopů, halogenových analogů nukleosidů, analogů nukleotidů nebo monitorování fází buněčného cyklu pomocí fluorescenčních sond. Na závěr byly shrnuty dva způsoby analýzy molekul používaných pro detekci replikace, a to pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie.

V experimentální části bakalářské práce byly porovnávány metody detekce replikace DNA založené na inkorporaci halogenových analogů nukleosidů (BrdU, EdU) nebo pomocí analogů nukleotidů (biotin-16-dUTP). V případě odhalení nukleosidu BrdU byly porovnávány metody jeho odhalení ve struktuře DNA pomocí DNázy I a exonukleázy III, nízké koncentrace HCl a exonukleázy III, jednomocného kationu mědi, 4 N HCl a 2 N HCl. Metody byly porovnávány na základě analýzy histogramů integrálních intenzit dané metody s histogramem kontrolních buněk. Dále pak byly jednotlivé metody porovnány na základě histogramů průměrných intenzit replikačních signálů a na základě poměru mezi signálem a šumem. Jako nejlepší metoda pro hodnocení replikační aktivity buněk a analýzy buněčného cyklu byla vyhodnocena metoda využívající inkorporovaný nukleosid EdU a jeho odhalení pomocí klikací reakce. Jako naopak nejhorší metoda byla vyhodnocena metoda odhalující nukleosid BrdU pomocí 4 N HCl. Ta vedla k denaturaci DNA, která znemožnila hodnocení replikační aktivity a analýzu buněčného cyklu. Z hlediska vlivu na fluorescenci fluorescenčních proteinů se jako vhodné ukázaly metody založené na detekci inkorporovaného nukleosidu BrdU pomocí DNázy I a exonukleázy III a na detekci nukleotidu biotin-16-dUTP pomocí nepřímé imunofluorescence. Naopak, jako nevhodné se pro tento druh analýz ukázaly metody detekce BrdU pomocí nízké koncentrace HCl a exonukleázy III a detekce EdU pomocí klikací reakce.

8 Literatura

- Abcam, (2021). Tissue and cell preparation for ELISAs and activity assays [online]. [cit. 06.04.2021].
Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/tissue-and-cell-preparation-for-elisas-and-cellular-assays>
- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 15(17), 2177–2196. doi:10.1101/gad.914401
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- Ageno, M., Dore, E., Frontali, C. (1969). The Alkaline Denaturation of DNA. *Biophysical Journal*, 9(11), 1281–1311. doi:10.1016/s0006-3495(69)86452-0
- Albani, J.R. (2004). *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. Elsevier. p. 58. ISBN 0-444-51449-X
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. DNA Replication Mechanisms. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26850/>
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21):10114–10118
- Alvarez, R., Jr, Wang, B.J., Quijada, P.J., Avitabile, D., Ho, T., Shaitrit, M., Chavarria, M., Firouzi, F., Ebeid, D., Monsanto, M.M., Navarrete, N., Moshref, M., Siddiqi, S., Broughton, K.M., Bailey, B.A., Gude, N.A., et Sussman, M.A. (2019). Cardiomyocyte cell cycle dynamics and proliferation revealed through cardiac-specific transgenesis of fluorescent ubiquitinated cell cycle indicator (FUCCI). *Journal of molecular and cellular cardiology*, 127, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.12.007>
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. doi:10.1038/290457a0

- Aparicio, T., Guillou, E., Coloma, J., Montoya, G., Méndez, J. (2009). The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 37(7), 2087–2095. doi:10.1093/nar/gkp065
- Araki, H. (2010). Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 766–771. doi:10.1016/j.ceb.2010.07.015
- Bártová, E. (2009). Molekulární fyziologie genomu. Učební text. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- Bell, S.P., Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 333–374. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.1354
- Beltz, R.E., Visser, D.W. (1955). Growth Inhibition of *Escherichia coli* by New Thymidine Analogs. *Journal of the American Chemical Society*, 77(3), 736–738. doi:10.1021/ja01608a053
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). DNA, RNA, and the Flow of Genetic Information. *Biochemistry*. 5th edition. New York: H W Freeman. Chapter 5. Dostupné z: <http://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21171/>
- Berk, A.J., Clayton, D.A. (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *Journal of molecular biology*, 86(4), 801–824. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90355-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90355-6)
- Bielawski, J.P., Gold, J.R. (2002). Mutation patterns of mitochondrial H- and L-strand DNA in closely related Cyprinid fishes. *Genetics*, 161(4), 1589–1597.
- Bower, S.M., Chantler, P.D. (1991). The Importance of Choice of Visualization Technique in the Use of Indirect Immunodetection Methods: Specific Reference to the Detection of Light Chain Movement on a Regulatory Myosin. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(1), 37–43. doi:10.3109/10520299109110548
- Broderick, R., Nasheuer, H.-P. (2009). Regulation of Cdc45 in the cell cycle and after DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 926–930. doi:10.1042/bst0370926
- Cao, Y., Bryan, T.M., Reddel, R.R. (2008). Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Science*, 99(6), 1092–1099. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00815.x
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., Golland, P., Sabatini, D.M. (2006). Cell Profiler:

- image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*, 7(10), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Clayton, D.A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology*, 7, 453–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.002321>
- Coling, D., Kachar, B. (2001). Principles and Application of Fluorescence Microscopy. *Current Protocols in Molecular Biology*. doi:10.1002/0471142727.mb1410s44
- Coling, D., Kachar, B. (2001). Principles and Application of Fluorescence Microscopy. *Current Protocols in Molecular Biology*. doi:10.1002/0471142727.mb1410s44
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; *The Eukaryotic Cell Cycle*. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
- Dahm, R. (2007). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, 122(6), 565–581. doi:10.1007/s00439-007-0433-0
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 19(18), 2100–2110. doi:10.1101/gad.1346005
- de Oliveira, M.G., Lauxen, I., Chaves, A.C., Rados, P.V., Sant'Ana Filho, M. (2008). Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 13(5), E275–E280
- Diermeier-Daucher, S., Clarke, S.T., Hill, D., Vollmann-Zwerenz, A., Bradford, J.A., Brockhoff, G. (2009). Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry Part A*, 75A(6), 535–546. doi:10.1002/cyto.a.20712
- Dimitrova, D.S., Berezney, R. (2002). The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 115(21), 4037–4051. doi:10.1242/jcs.00087
- Diotti, R., Loayza, D. (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2(2), 119–135. doi:10.4161/nucl.2.2.15135
- Downing, M., Schweigert, B.S. (1956). Rôle of vitamin B12 in nucleic acid metabolism. IV. Metabolism of C14-labeled thymidine by *Lactobacillus leichmannii*. *The Journal of biological chemistry*, 220(2), 521–526.

- Du, W., Stauffer, M.E., Eichman, B.F. (2012). Structural biology of replication initiation factor Mcm10. *Sub-cellular biochemistry*, 62, 197–216. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_11
- Dutta, A., Bell, S.P. (1997). INITIATION OF DNA REPLICATION IN EUKARYOTIC CELLS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 293–332. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.293
- Falkenberg, M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays In Biochemistry*, 62(3), 287–296. doi:10.1042/ebc20170100
- Fazlieva, R., Spittle, C.S., Morrissey, D., Hayashi, H., Yan, H., Matsumoto, Y. (2009). Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase delta and its effects on lesion-bypass DNA synthesis. *Nucleic acids research*, 37(9), 2854–2866. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp155>
- Fisher P.A., Wang T.S., Korn D. (1979). Enzymological characterization of DNA polymerase alpha. Basic catalytic properties processivity, and gap utilization of the homogeneous enzyme from human KB cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 254(13): 6128–37. doi:10.1016/S0021-9258(18)50528-7. PMID 447699
- Foley, J.F., Dietrich, D.R., Swenberg, J.A., Maronpot, R.R. (1991). Detection and Evaluation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Rat Tissue by an Improved Immunohistochemical Procedure. *Journal of Histotechnology*, 14(4), 237–241. doi:10.1179/his.1991.14.4.237
- Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 109–131. doi:10.1128/mubr.68.1.109-131.2004
- Friedkin, M., Tilson, D., Roberts, D. (1956). Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine-C14. *The Journal of biological chemistry*, 220(2), 627–637.
- Geacintov, N.E., Waldmeyer, J., Kuzmin, V.A., Kolubayev, T. (1981). Dynamics of the binding of acridine dyes to DNA investigated by triplet excited state probe techniques. *The Journal of Physical Chemistry*, 85(24), 3608–3613. doi:10.1021/j150624a018

- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
- Goding, J.W. (1996). *Immunofluorescence: Monoclonal antibodies: Principles and practice*, pp: 352–399. Academic press. London. doi:10.1016/b978-012287023-1/50060-2
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.E., Laskey, R.A., Coleman, N. (2005). Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nature reviews. Cancer*, 5(2), 135–141. <https://doi.org/10.1038/nrc1548>
- Graessmann, A., Graessmann, M., Hoffmann, H., Niebel, J., Brander, G., Nueller, N. (1974). Inhibition by interferon of SV40 tumor antigen formation in cells injected with SV40 cRNA transcribed in vitro. *FEBS Letters*, 39(3), 249–251. doi:10.1016/0014-5793(74)80122-5
- Graessmann, M., Graessmann, A. (1983). Microinjection of tissue culture cells. *Methods in enzymology*, 101, 482–492. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)01033-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)01033-2)
- Gratzner, H.G., Leif, R.C., Ingram, D.J., Castro, A. (1975). The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Experimental Cell Research*, 95(1), 88–94. doi:10.1016/0014-4827(75)90612-6
- Gratzner, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4571), 474–475. <https://doi.org/10.1126/science.7123245>
- Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., Schlick, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13317–13322. doi:10.1073/pnas.0903280106
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460. doi:10.1038/345458a0
- Hershey, A.D., Chase, M. (1952). Independent functions of viral proteins and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology*, 36:39–56. <https://doi.org/10.1085/jgp.36.1.39>

- Herzenberg, L., Sweet, R., Herzenberg, L. (1976). Fluorescence-activated Cell Sorting. *Scientific American*, 234(3), 108-118. Retrieved April 27, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/24950310>
- Hierck, B.P., Iperen, L.V., Gittenberger-De Groot, A.C., Poelmann, R.E. (1994). Modified indirect immunodetection allows study of murine tissue with mouse monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(11), 1499–1502. doi:10.1177/42.11.7930532
- Holt, I.J., Reyes, A. (2012). Human Mitochondrial DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a012971–a012971. doi:10.1101/cshperspect.a012971
- Hua, H. Kearsley, S.E. (2011). Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. *Nucleic acids research*, 39(9), e60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr063>
- Huberman, J.A., Riggs, A.D. (1966). Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(3), 599–606. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.3.599>
- Hübscher, U., Maga, G., Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA Polymerases. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 133–163. doi:10.1146/annurev.biochem.71.090501.15004
- Humbert, C., Santisteban, M. S., Usson, Y., Robert-Nicoud, M. (1992). Intranuclear co-location of newly replicated DNA and PCNA by simultaneous immunofluorescent labelling and confocal microscopy in MCF-7 cells. *Journal of cell science*, 103 (Pt 1), 97–103.
- Chagin, V.O., Stear, J.H., Cardoso, M.C. (2010). Organization of DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a000737–a000737. doi:10.1101/cshperspect.a000737
- Chargaff, E. Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F. (1949). The composition of the desoxypentose nucleic acid of thymus and spleen. *The Journal of biological chemistry*, 177:405–416
- Chargaff, E. (1951) Structure and function of nucleic acid as cell constituent. *Federation Proceedings*, 10:654–659
- Chatre, L., Ricchetti, M. (2013). Prevalent coordination of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication with the cell cycle. *Nucleic Acids Research*, 41(5), 3068–3078. doi:10.1093/nar/gkt015
- Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5556–pdb.prot5556. doi:10.1101/pdb.prot5556

- Chong, J.P.J., Thömmes, P., Blow, J. J. (1996). The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3), 102–106. doi:10.1016/s0968-0004(96)10013-x
- Chotiner, J.Y., Wolgemuth, D.J., Wang, P.J. (2019). Functions of cyclins and CDKs in mammalian gametogenesis. *Biology of Reproduction*. doi:10.1093/biolre/ioz070
- Ihmann, T., Liu, J., Schwabe, W., Häusler, P., Behnke, D., Bruch, H.-P., Broll, R., Windhövel, U., Duchrow, M. (2004). High-level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favorable prognosis in colorectal carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130(12), 749–756. doi:10.1007/s00432-004-0612-5
- Jackson, D.A., Pombo, A. (1998). Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *The Journal of cell biology*, 140(6), 1285–1295. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1285>
- Jamur, M.C., Oliver, C. (2009). Permeabilization of Cell Membranes. *Methods in Molecular Biology*, 63–66. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_9
- Jaramillo-Lambert, A., Hao, J., Xiao, H., Li, Y., Han, Z., Zhu, W. (2013). Acidic Nucleoplasmic DNA-binding Protein (And-1) Controls Chromosome Congression by Regulating the Assembly of Centromere Protein A (CENP-A) at Centromeres. *Journal of Biological Chemistry*, 288(3), 1480–1488. doi:10.1074/jbc.m112.429266
- Jiang, H., Ju, Z., Rudolph, K.L. (2007). Telomere shortening and ageing. *Zeitschrift Für Gerontologie Und Geriatrie*, 40(5), 314–324. doi:10.1007/s00391-007-0480-0
- Kaida, A., Miura, M. (2012). Differential dependence on oxygen tension during the maturation process between monomeric Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green expressed in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(4), 855–859. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.102
- Kamentsky, L., Jones, T.R., Fraser, A., Bray, M.A., Logan, D.J., Madden, K.L., Ljosa, V., Rueden, C., Eliceiri, K.W., Carpenter, A.E. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(8), 1179–1180. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr095>

- Karasawa, S., Araki, T., Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A. (2003). A Green-emitting Fluorescent Protein from Galaxeidae Coral and Its Monomeric Version for Use in Fluorescent Labeling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34167–34171. doi:10.1074/jbc.m304063200
- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A. (2004). Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal*, 381(1), 307–312. doi:10.1042/bj20040321
- Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Classon, M., Dyson, N., Harlow, E. (2000). Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes & development*, 14(22), 2855–2868. <https://doi.org/10.1101/gad.842600>
- Kill, I.R., Bridger, J.M., Campbell, K.H., Maldonado-Codina, G., Hutchison, C.J. (1991). The timing of the formation and usage of replicase clusters in S-phase nuclei of human diploid fibroblasts. *Journal of cell science*, 100 (Pt 4), 869–876
- Koberna, K., Staněk, D., Malínský, J., Eltsov, M., Pliss, A., Čtrnáctá, V., Cermanová, Š., Raška, I. (1999). Nuclear organization studied with the help of a hypotonic shift: its use permits hydrophilic molecules to enter into living cells. *Chromosoma*, 108(5), 325–335. doi:10.1007/s004120050384
- Kohlmeier, F., Maya-Mendoza, A., Jackson, D.A. (2013). EdU induces DNA damage response and cell death in mESC in culture. *Chromosome Research*, 21(1), 87–100. doi:10.1007/s10577-013-9340-5
- Kossel, A., (1911) The chemical composition of the cell. *Harvey Lectures* 7, 33–50
- Latt, S.A., Stetten, G., Juergens, L.A., Willard, H.F., Scher, C.D. (1975). Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 23(7), 493–505. <https://doi.org/10.1177/23.7.1095650>
- Lee, G.-B., Hung, C.-I., Ke, B.-J., Huang, G.-R., Hwei, B.-H., Lai, H.-F. (2001). Hydrodynamic Focusing for a Micromachined Flow Cytometer. *Journal of Fluids Engineering*, 123(3), 672. doi:10.1115/1.1385514
- Lehtinen, J., Nuutila, J., Lilius, E.-M. (2004). Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability. *Cytometry*, 60A(2), 165–172. doi:10.1002/cyto.a.20026

- Leman, A., Noguchi, E. (2013). The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. *Genes*, 4(1), 1–32. doi:10.3390/genes4010001
- Lentz, S.I., Edwards, J.L., Backus, C., McLean, L.L., Haines, K.M., Feldman, E.L. (2010). Mitochondrial DNA (mtDNA) biogenesis: visualization and dual incorporation of BrdU and EdU into newly synthesized mtDNA in vitro. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 58(2), 207–218. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954701>
- Li, L.T., Jiang, G., Chen, Q., Zheng, J.N. (2014). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1566–1572. doi:10.3892/mmr.2014.2914
- Li, X., Darzynkiewicz, Z. (1995). Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Proliferation*, 28(11), 571–579. doi:10.1111/j.1365-2184.1995.tb00045.x
- Ligasová, A., Strunin, D., Liboska, R., Rosenberg, I., Koberna, K. (2012). Atomic Scissors: A New Method of Tracking the 5-Bromo-2'-Deoxyuridine-Labeled DNA In Situ. *PLoS ONE*, 7(12), e52584. doi:10.1371/journal.pone.0052584
- Ligasová, A., Liboska, R., Rosenberg, I., Koberna, K. (2015). The Fingerprint of Anti-Bromodeoxyuridine Antibodies and Its Use for the Assessment of Their Affinity to 5-Bromo-2'-Deoxyuridine in Cellular DNA under Various Conditions. *PLOS ONE*, 10(7), e0132393. doi:10.1371/journal.pone.0132393
- Ligasová, A., Konečný, P., Frydrych, I., Koberna, K. (2017a). Cell cycle profiling by image and flow cytometry: The optimised protocol for the detection of replicational activity using 5-Bromo-2'-deoxyuridine, low concentration of hydrochloric acid and exonuclease III. *PLOS ONE*, 12(4), e0175880. doi:10.1371/journal.pone.0175880
- Ligasová, A., Konečný, P., Frydrych, I., Koberna, K. (2017b). Looking for ugly ducklings: The role of the stability of BrdU-antibody complex and the improved method of the detection of DNA replication. *PLOS ONE*, 12(3), e0174893. doi:10.1371/journal.pone.0174893
- Ligasová, A., Koberna, K. (2018). DNA Replication: From Radioisotopes to Click Chemistry. *Molecules*, 23(11), 3007. doi:10.3390/molecules23113007
- Lichtman, J. W., & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 910

- Lingner, J., Cooper, J.P., Cech, T.R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* (New York, N.Y.), 269(5230), 1533–1534. <https://doi.org/10.1126/science.7545310>
- Litman, G.W., Rast, J.P., Shablott, M.J., Haire, R.N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R.T., Hinds-Frey, K.R., Zilch, A., Amemiya, C.T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular biology and evolution*, 10(1), 60–72. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040000>
- MacNeill, S.A. (2010). Structure and function of the GINS complex, a key component of the eukaryotic replisome. *Biochemical Journal*, 425(3), 489–500. doi:10.1042/bj20091531
- Manz, A., Pamme, N., Iossifidis, D. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. Imperial Collage press.
- McGarry, T.J., Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*, 93(6), 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81209-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81209-x)
- McKinney, E.A., Oliveira, M.T. (2013). Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 308–315. doi:10.1590/s1415-47572013000300002
- McNeil, P.L. (1988). Chapter 10 Incorporation of Macromolecules into Living Cells. *Methods in Cell Biology*, 153–173. doi:10.1016/s0091-679x(08)60193-4
- Merrick, C.J., Jackson, D., Diffley, J.F.X. (2004). Visualization of Altered Replication Dynamics after DNA Damage in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20067–20075. doi:10.1074/jbc.m400022200
- Milner, G.R. (1969). Nuclear morphology and the ultrastructural localization of deoxyribonucleic acid synthesis during interphase. *Journal of cell science*, 4(3), 569–582
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129(4), 665–679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003
- Montanari, M., Macaluso, M., Cittadini, A., Giordano, A. (2006). Role of geminin: from normal control of DNA replication to cancer formation and progression? *Cell Death and Differentiation*, 13(7), 1052–1056. doi:10.1038/sj.cdd.4401932

- Mozdziak, P.E., Pulvermacher, P.M., Schultz, E., Schell, K. (2000). Hoechst fluorescence intensity can be used to separate viable bromodeoxyuridine-labeled cells from viable non-bromodeoxyuridine-labeled cells. *Cytometry*, 41(2), 89–95. doi:10.1002/1097-0320(20001001)41:2<89::aid-cyto2>3.0.co;2-i
- Mullins, J. M. (2009). Fluorochromes: Properties and Characteristics. *Methods in Molecular Biology*, 123–134. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_15
- Namiki, Y., Zou, L. (2006). ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 580–585. doi:10.1073/pnas.0510223103
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. (2004). Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *The Journal of biological chemistry*, 279(29), 30807–30816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312644200>
- Novák, B., Sible, J. C., Tyson, J. J. (2003). Checkpoints in the Cell Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1038/npg.els.0001355
- Oi, V.T., Glazer, A.N., Stryer, L. (1982) Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J Cell Biol* 93:981–986
- Okada, D.Y., Rechsteiner, M. (1982). Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles. *Cell*, 29(1), 33–41. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90087-3](http://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90087-3)
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(2), 598–605. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.2.598>
- Pagano, R.E., Weinstein, J.N. (1978). Interactions of Liposomes with Mammalian Cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 7(1), 435–468. doi:10.1146/annurev.bb.07.060178.002251
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop, Stewart J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F., Leung, W.Y., Haugland, R.P. (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem*

- Pardee A.B. (1974). A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1286–1290. doi:10.1073/pnas.71.4.1286
- Patil, M., Pabla, N., Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(21), 4009–4021. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1307-3>
- Popova, V. V., Brechalov, A. V., Georgieva, S. G., Kopytova, D. V. (2018). Nonreplicative Functions of the Origin Recognition Complex. *Nucleus*. doi:10.1080/19491034.2018.1516484
- Poste, G., Papahadjopoulos, D., Vail, W.J. (1976). Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. *Methods in Cell Biology*, 74, 33-71. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60468-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60468-9)
- Rechsteiner, M. (1987). Osmotic lysis of pinosomes. *Drug and Enzyme Targeting Part B*, 42–48. doi:10.1016/0076-6879(87)49042-3
- Reichard, P., Estborn, B. (1951). Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *The Journal of Biological Chemistry*, 839-846.
- Repka, A. M., Adler, R. (1992). Accurate determination of the time of cell birth using a sequential labeling technique with [3H]-thymidine and bromodeoxyuridine (“window labeling”). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40(7), 947–953. doi:10.1177/40.7.1607643
- Robberson, D. L., Kasamatsu, H., Vinograd, J. (1972) Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 737–741. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.3.737>
- Rost, F. (1999). Fluorescence Microscopy, Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 565–570. doi:10.1006/rwsp.2000.0090
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Atsushi Miyawaki, Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., Miyawaki, A. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of

- Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*, 132(3), 487–498. doi:10.1016/j.cell.2007.12.033
- Sale, A.J.H., Hamilton, W.A. (1968). Effects of high electric fields on micro-organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 163(1), 37–43. doi:10.1016/0005-2736(68)90030-8
- Salic, A., Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2415–2420. doi:10.1073/pnas.0712168105
- Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., Yan, J. (2010). Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 192(5), 284–291. doi:10.1016/j.aanat.2010.07.005
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.0737
- Sano, T., Smith, C., Cantor, C. (1992). Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 258(5079), 120–122. doi:10.1126/science.1439758
- Sasaki, K., Adachi, S., Yamamoto, T., Murakami, T., Tanaka, K., Takahashi, M. (1988). Effects of denaturation with HCL on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry*, 9(1), 93–96. doi:10.1002/cyto.990090115
- Seonghyun, L., Yeeun, O., Jungyoon, L., Sojeong, C., Sangyong, L., Hyun, S.L., Kyubong, J., Schwartz, D.C. (2015). DNA binding fluorescent proteins for the direct visualization of large DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, 44(1), e6–e6. doi:10.1093/nar/gkv834
- Schroeder, H.W., Jr, Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schwartz, U., Németh, A., Diermeier, S., Exler, J.H., Hansch, S., Maldonado, R., Heizinger, L., Merkl, R., Längst, G. (2019). Characterizing the nuclease accessibility of DNA in human cells to map higher order structures of chromatin. *Nucleic acids research*, 47(3), 1239–1254. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1203>
- Singer, J.D., Manning, B.M., Formosa, T. (1996). Coordinating DNA replication to produce

- one copy of the genome requires genes that act in ubiquitin metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), 1356–1366. doi:10.1128/mcb.16.4.1356
- Singh, H., Brooke, R.G., Pausch, M H., Williams, G.T., Trainor, C., Dumas, L.B. (1986). Yeast DNA primase and DNA polymerase activities. An analysis of RNA priming and its coupling to DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 261(18), 8564–8569.
- Skarstad, K., Bernander, R., Boye, E. (1995). Analysis of DNA replication in Vivo by flow cytometry. *DNA Replication*, 604–613. doi:10.1016/0076-6879(95)62047-8
- Snustad, D.P., Simmons, M.J., Relichová, R., Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., Knoll, A., Kuglík, P., Šmarda, J., Šmardová J., Veleská, R., Vyskot, B. *Genetika*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 894 s. Učebnice. ISBN 978-80-210-4852-2.
- Steinman, R.M. Silver, J.M., Cohn, Z.A. (1974). Pinocytosis in fibroblasts: quantitative studies in vitro. *The Journal of Cell Biology*. 63, 949-969. <https://doi.org/10.1083/jcb.63.3.949>
- Steinman, R. M., Brodie, S. E., Cohn, Z. A. (1976). Membrane flow during pinocytosis: a stereological analysis. *The Journal of Cell Biology*. 68, 665-687. <https://doi.org/10.1083/jcb.68.3.665>
- Stillman B. (2008). DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Molecular cell*, 30(3), 259–260. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.011>
- Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1410(2), 103–123. doi:10.1016/s0005-2728(98)00161-3
- Takagi, S., McFadden, M.L., Humphreys, R E., Woda, B.A., Sairenji, T. (1993). Detection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation with monoclonal anti-brdurd antibody after deoxyribonuclease treatment. *Cytometry*, 14(6), 640–648. doi:10.1002/cyto.990140608
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), 328–332. <https://doi.org/10.1038/nature05465>
- Tanaka, S., Komeda, Y., Umemori, T., Kubota, Y., Takisawa, H., Araki, H. (2013). Efficient initiation of DNA replication in eukaryotes requires Dpb11/TopBP1-GINS interaction.

Molecular and cellular biology, 33(13),2614–2622.

<https://doi.org/10.1128/MCB.00431-13>

- Tannous, E., Kanaya, E., Kanaya, S. (2015). Role of RNase H1 in DNA repair: removal of single ribonucleotide misincorporated into DNA in collaboration with RNase H2. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep09969
- Taylor, J.H., Woods, P.S., Hughes, W.L. (1957). The Organization and Duplication of Chromosomes as 457 Revealed by Autoradiographic Studies Using Tritium-Labeled Thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(1), 122–128. <https://doi.org/10.1073/pnas.43.1.122>
- Teale, F.W.J., Weber, G. (1957). Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal*, 65(3), 476–482. doi:10.1042/bj0650476
- Titus, J.A., Haugland, R., Sharrow, S.O., Segal, D.M. (1982) Texas Red, a hydrophilic, redemitting fluorophore for use with fluorescein in dual parameter flow microfluorometric and fluorescence microscopic studies. *Journal of Immunological Methods* 50:193– 204
- Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(9), 3057–3064. doi:10.1021/jo011148j
- Troiano, N.W., Ciovacco, W.A., Kacena, M.A. (2009). The Effects of Fixation and Dehydration on the Histological Quality of Undecalcified Murine Bone Specimens Embedded in Methylmethacrylate. *Journal of Histotechnology*, 32(1), 27–31. doi:10.1179/his.2009.32.1.27
- Tuttle, A.H., Rankin, M.M., Teta, M., Sartori, D.J., Stein, G.M., Kim, G.J., Virgilio, C., Granger, A., Zhou, D., Long, S.H., Schiffman, A.B, Kushner, J.A. (2010). Immunofluorescent Detection of Two Thymidine Analogues (CldU and IdU) in Primary Tissue. *Journal of Visualized Experiments*, (46). doi:10.3791/2166
- Van Dierendonck, J.H., Keyzer, R., van De Velde, C.J.H., Cornelisse, C.J. (1989). Subdivision of S-phase by analysis of nuclear 5-bromodeoxyuridine staining patterns. *Cytometry*, 10(2), 143–150. doi:10.1002/cyto.990100205

- Vijayraghavan, S., Schwacha, A. (2012). The Eukaryotic Mcm2-7 Replicative Helicase. *Subcellular biochemistry*, 62, 113–134. doi:10.1007/978-94-007-4572-8_7
- Watson, J. D., Crick, F.H.C. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738
- Yoshida, K., Inoue, I. (2004). Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene*, 23(21), 3802–3812. doi:10.1038/sj.onc.1207488
- Yu, C., Gan, H., Han, J., Zhou, Z.X., Jia, S., Chabes, A., Farrugia, G., Ordog, T., Zhang, Z. (2014). Strand-specific analysis shows protein binding at replication forks and PCNA unloading from lagging strands when forks stall. *Molecular cell*, 56(4), 551–563. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.017>
- Zawada, Z., Tatar, A., Mocilac, P., Buděšínský, M., Kraus, T. (2018). Transport of Nucleoside Triphosphates into Cells by Artificial Molecular Transporters. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(31), 9891–9895. doi:10.1002/anie.201801306
- Zegerman, P., Diffley, J.F.X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), 281–285. doi:10.1038/nature05432
- Zhao, H., Halicka, H.D., Li, J., Biela, E., Bemniak, K., Dobrucki, J., Darzynkiewicz, Z. (2013). DNA damage signaling, impairment of cell cycle progression, and apoptosis triggered by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry Part A*, 83(11), 979–988. doi:10.1002/cyto.a.22396
- Zheng, L., Shen, B. (2011). Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage. *Journal of molecular cell biology*, 3(1), 23–30. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq048>
- Zielke, N., Edgar, B.A. (2015). FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(5), 469–487. doi:10.1002/wdev.189