

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Antiproliferační aktivita nových derivátů
narciklasinu v buňkách lidského
cervikálního karcinomu *in vitro***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Autor: | Tereza Kašparová |
| Studijní program: | B1501 Biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Lucie Rárová, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2019 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Tereza Kašparová |
| Název práce | Antiproliferační aktivita nových derivátů narciklasinu v buňkách lidského cervikálního karcinomu <i>in vitro</i> |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | Mgr. Lucie Rárová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2019 |
| Abstrakt | <p>Bakalářská práce se zabývá antiproliferačními účinky derivátů narciklasinu. Nejbohatším zdrojem alkaloidu narciklasinu jsou rostliny z čeledi <i>Amaryllidaceae</i>. Teoretická část shrnuje poznatky o nádoru děložního hrdla, charakterizuje alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>, naznačuje jejich účinek na buňky a shrnuje proces programové buněčné smrti.</p> <p>V praktické části bakalářské práce byla studována aktivita nových derivátů narciklasinu na buněčnou linii HeLa odvozenou od nádoru děložního hrdla. Určení aktivity probíhalo pomocí metod Western blotting, součástí byla i průtoková cytometrie a test aktivity caspas 3/7. Vše bylo provedeno za účelem studia vlivu nových derivátů na apoptosu a buněčný cyklus.</p> |
| Klíčová slova | Apoptosa, nádor děložního hrdla, narciklasin, průtoková cytometrie, western blot, caspasy |
| Počet stran | 51 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Tereza Kašparová |
| Title of thesis | Antiproliferative activity of new narciclasine derivatives in human cervical carcinoma cells <i>in vitro</i> |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | Mgr. Lucie Rárová, Ph.D. |
| The year of presentation | 2019 |
| Abstract | <p>The bachelor thesis deals with anti-proliferative effects of derivatives of narciclasine. The family <i>Amaryllidaceae</i> is the richest source of the alkaloid narciclasine. The theoretical part summarizes the knowledge about cervical carcinoma, characterises alkaloid of the family <i>Amaryllidaceae</i>, their effect on cells and summarizes the process of program cell death.</p> <p>The practical part of bachelor thesis studied the activity of new derivatives of narciclasine with cell line HeLa (derived from cervical cancer). Activity determination was performed using Western blotting, including flow cytometry and caspase test, all for the purpose of studying the effect leading to apoptosis and the cell cycle.</p> |
| Keywords | Apoptosis, cervical cancer, narciclasine, flow cytometry, western blotting, caspases |
| Number of pages | 51 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Kašparová Tereza

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lucii Rárové Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a především za trpělivost. Dále děkuju kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého vstřícnost a příjemné pracovní prostředí. Poděkování patří také paní laborantce Olze Hustákové za rady při vypracování experimentální části. Velké díky patří také mým rodičům, kteří mi bakalářské studium umožnili a po celou dobu studia mě nesmírně podporovali.

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 8 |
| 1 ÚVOD A CÍLE | 10 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 2.1 Nádor..... | 11 |
| 2.2 Nádor děložního hrdla..... | 11 |
| 2.2.1 Lidský papillomavirus (HPV) | 12 |
| 2.3 Apoptosa | 14 |
| 2.3.1 Caspasy – 3 a 7 | 14 |
| 2.3.2 PARP-1 [Poly (ADP-ribosa) polymerasa-1] | 15 |
| 2.3.3 Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) | 15 |
| 2.3.4 Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukemie 1)..... | 16 |
| 2.3.5 Protein p53 | 16 |
| 2.3.6 Retinoblastomový protein (Rb) | 17 |
| 2.4 Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i> | 17 |
| 2.4.1 Lykorinový strukturní typ | 18 |
| 2.4.2 Lykoreninový strukturní typ | 19 |
| 2.4.3 Tazetinový strukturní typ | 19 |
| 2.4.4 Krininový a haemanthaminový strukturní typ | 20 |
| 2.4.5 Narciklasinový strukturní typ..... | 20 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 22 |
| 3.1 Materiály | 22 |
| 3.1.1 Použité přístroje..... | 22 |
| 3.1.2 Použité chemikálie..... | 23 |
| 3.1.3 Použité roztoky..... | 24 |
| 3.1.4 Použité protilátky..... | 25 |
| 3.1.5 Použitá buněčná linie | 25 |
| 3.1.6 Testované deriváty narciklasinu | 26 |
| 3.2 Metody | 26 |
| 3.2.1 Ovlivnění buněčné linie testovanou látkou a její následné sklízení | 26 |
| 3.2.2 Lyzování buněk | 28 |
| 3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů | 29 |
| 3.2.4 Fluorimetrické stanovení aktivity caspasy 3/7 | 30 |
| 3.2.5 Průtoková cytometrie – analýza buněčného cyklu | 31 |
| 4 VÝSLEDKY | 32 |
| 4.1 Western blotting | 32 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.2 | Biochemický test aktivity caspas..... | 34 |
| 4.3 | Průtoková cytometrie (analýza buněčného cyklu)..... | 35 |
| 5 | DISKUZE | 38 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 42 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 43 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|------------------|---|
| Ac-DEVD-AMC | Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylkumarin |
| Ac-DEVD-CHO | Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd |
| APS | Peroxodosíran amonný |
| Bax | X protein asociovaný s Bcl-2, z angl. Bcl-2 associated X protein |
| Bcl-2 | B-buňky CLL/lymfom 2, z angl. B-cell lymphoma 2 |
| BRCA1 | z angl. Breast and ovarian cancer gene 1 |
| CDK | Cyklin-dependentní kinasy, z angl. Cyclin-dependent kinase |
| CEM | lymfoblastická leukémie |
| DDT | Dithiothreitol |
| DISC | Signální komplex indukující buněčnou smrt, z angl. Signal complex indicating cell death |
| DMEM | z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| E2F | transkripční faktor |
| EDTA | Etylendiamintetraoctová kyselina |
| EGTA | Etylenglykoltetraoctová kyselina |
| FBS | Fetální telecí sérum |
| HCC | hepatocelulární karcinom, z angl. hepatocellular carcinoma |
| HELA | buněčná linie odvozená od karcinomu děložního hrdla |
| HEPES | 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonová kyselina |
| HPV | Lidský papillomavirus, z angl. Human papillomavirus |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimetylamonio]-1 propansulfonát |
| IC ₅₀ | 50 % inhibiční koncentrace, z angl. 50 % inhibitory concentration |
| Mcl-1 | Myeloidní buněčná leukémie 1, z angl. Myeloid-cell leukemia 1 |
| MDM2 | z angl. Mouse double minute 2 homolog |
| PARP-1 | Poly(ADP-ribose)polymerasa-1 |
| PBS | fosfátový pufr, z angl. Phosphate buffered saline |
| PIPES | Piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonová kyselina) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| Rb | Retinoblastomový protein, z angl.. Retinoblastoma protein |
| RIPA | Lyzační pufr, z angl. Radioimmunoprecipitation assay buffer |

| | |
|----------|---|
| SDS | Dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | Polyakrylamidová gelová elektroforéza za použití dodecylsírany sodného, z angl. Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEMED | Tetrametylethylendiamin |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |
| TP53 | Tumor protein p53 |
| TRIS | Tris(hydroxymetyl)aminometan |
| UV | Ultrafialové světlo |
| VIS | Viditelné světlo |
| Zn1, Zn2 | z angl. Zinc fingers |

1 ÚVOD A CÍLE

Rakovina je celosvětově rozšířené onemocnění, které je zodpovědné za miliony úmrtí ročně. Cervikální karcinom je celosvětově jeden z nejběžnějších typů rakoviny u žen. V roce 2018 bylo celosvětově odhadováno kolem 570 000 případů nádoru děložního hrdla a 311 000 úmrtí. (Bray et al., 2018). Karcinom způsobuje onkogenní lidský papillomavirus (HPV), kdy jeden z nejčastějších je HPV 16 (Walboomers et al., 1999). Trvalá infekce určitými typy HPV je stanovena jako hlavní příčina většiny premaligních i maligních epiteliálních lézí¹ děložního čípku či variabilních frakcí lézí vulvy, vagíny, konečníku či penisu (Castellsagué, 2008).

Za účelem najít nová léčiva působící proti rakovině je testováno spousta nových sloučenin. Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin a představují obrovský rezervoár pro vývoj nových léků. Mohou se nacházet v jakékoliv části rostliny, ale nejvíce jich obsahuje kůra, listy a plody rostlin. Většina alkaloidů má farmakologické účinky, které vykazují širokou škálu biologické odpovědi a mají extrémně velký potenciál (již při nM koncentracích). V současné době jsou využívány jako léky, mezi které patří například lék na tlášení bolesti morfin nebo léky na rakovinu vinkristin a vinblastin. Některé ale patří mezi zakázaná narkotika (kokain, heroin), nebo jsou naopak silnými toxiny (Samuelsson et al., 2015).

Alkaloid narciklasin byl izolován z cibulek narcisu (*Narcissus*), z čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité). Podle rodu *Narcissus* byl narciklasin následně pojmenován. Chemická kostra narciklasinu, stejně jako všech alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, je odvozena od O-metylnorbeladinu. Extrakty z cibulek rostlin *Narcissus*, jsou známy již po tisíciletí z lidové medicíny (Riddle, 1985). Účinky narciklasinu byly známy i Hippokratovi (460 - 370 př.nl.). Narciklasin a pankratistatin byly nejdůležitější složky léčiv vhodné pro použití v lidovém lékařství při léčbě rakoviny (Kornienko et al., 2008).

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se zadaného tématu. V experimentální části bylo cílem charakterizovat vliv derivátů narciklasinu na adherentní lidskou buněčnou linii HeLa, odvozenou od cervikálního karcinomu *in vitro*, na buněčný cyklus, detekovat apoptotické markery a provést biochemický test aktivity caspas 3/7.

¹ léze – poškození tkáně nebo orgánu

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část zahrnuje obecnou část popisující nádor, charakterizuje karcinom děložního hrdla a lidský papillomavirus, který je hlavní příčinou rozvoje rakoviny děložního hrdla. V další části teorie je zmíněna apoptosa a charakteristické apoptotické markery a jako poslední je zahrnuta část charakterizující alkaloidy obecně a část zmiňující alkaloidy čeledi amarylkovitých a jejich biologické účinky.

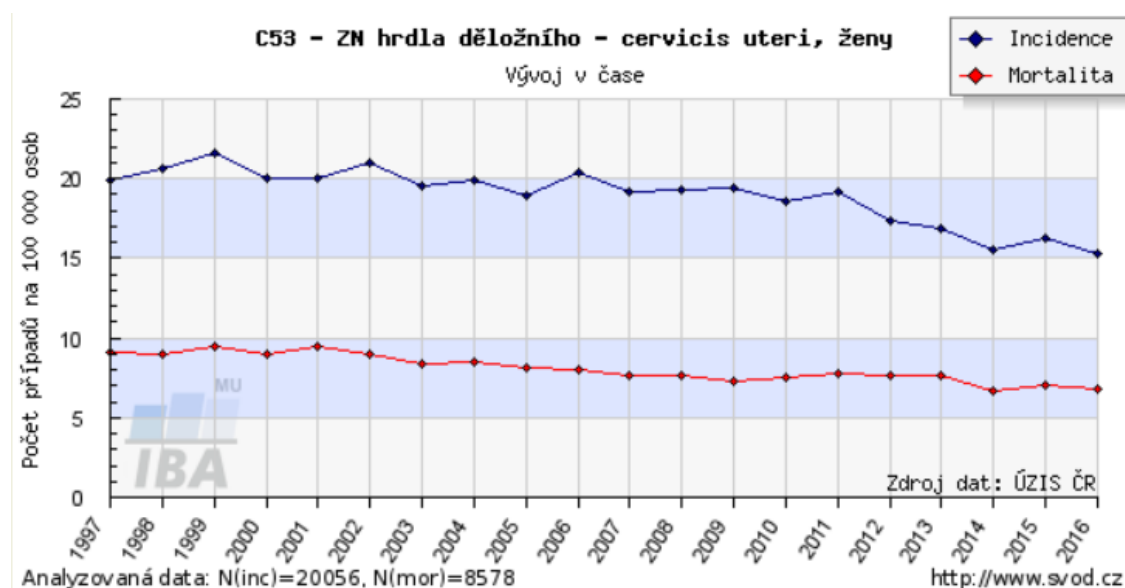
2.1 Nádor

Při inaktivaci proliferace buněk, se buňky nekontrolovatelně množí za vzniku nádoru (Rosypal, 2003). Nádor, nazývaný taky novotvar, tumor či blastom, je nově vzniklý útvar v organismu, který nemá pro organismus žádnou fyziologickou funkci a organismus jej nedokáže regulovat. Nádorem benigním, je označován nádor, který neprorůstá do svého okolí a nezakládá v těle metastázy neboli dceřiné nádory. Naopak nádory schopné v těle metastázovat a prorůstat do okolních buněk, nazýváme nádory maligními (Slabý et al., 2015).

Kancerogeneze je proces, při kterém dochází k transformaci buněk a následně vzniku nádoru. Kancerogeneze je řízena dvěma druhy genů (Slabý et al., 2015). Protoonkogeny jsou geny kódující regulátory proliferace a diferenciace. Pokud u nich dojde k mutaci, narušující funkci příslušných regulací, nazýváme je onkogeny (Rosypal, 2003).

2.2 Nádor děložního hrdla

Je charakterizováno více než 100 druhů nádorového onemocnění. Rakovina děložního hrdla patří mezi čtvrtou nejčastěji diagnostikovanou rakovinu a zároveň je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí žen (Bray et al., 2018). V České republice v roce 2016 činila hrubá incidence 15,3/100 000 žen a incidence přepočtená na světový standard byla 9,98 (obrázek 1). Ve srovnání s vyspělými státy patří Česká republika mezi země s vysokým počtem nových případů. Pro porovnání incidence přepočtena na 100 000 žen pro: Německo – 10,6, Francii – 9,1, Velkou Británii – 8,7, Spojené Státy Americké – 7 a Švýcarsko 5,7 (Dušek et al., 2016).



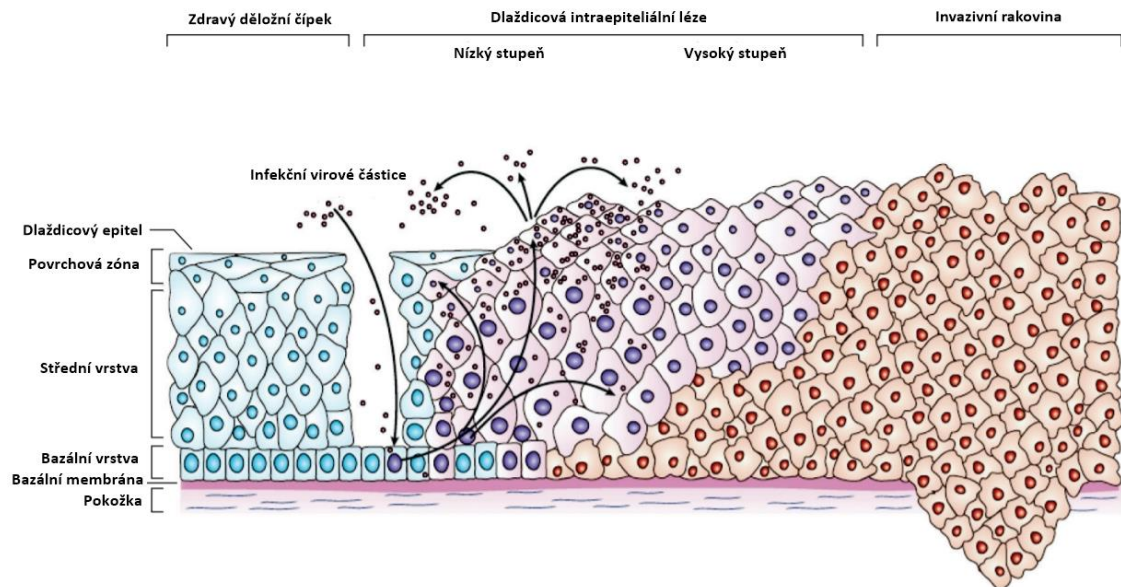
Obrázek 1: Vývoj zhoubného nádoru hrdla děložního v České republice v letech 1997-2016. Převzato z: Dušek et al., 2016. Dostupný z: <http://www.svod.cz>

Zdravý děložní čípek má dvě zřetelné epiteliální zóny. Ektocervix pokrytý dlaždicovým epitelem a endocervix lemovaný jednoduchým žlázovým epitelem. Výsledkem dlaždicové metaplazie během dospívání a v raném dospělém životě je endocervikální epitel, který je nahrazen nezralým dlaždicovým epitelem. Tato metaplastická oblast je nazývána transformační zóna a je to nejčastější místo vývoje nádoru děložního hrdla. Ovšem, co dělá transformační zónu tolik citlivou na HPV, není zatím dobře vysvětleno (Jenkins, 2007). Infekce virem je první krok v rozvoji karcinomu děložního hrdla. Následuje krok zahrnující perzistenci virů, dále šíření infikovaného epitelu děložního hrdla a následné vniknutí přes bazální membránu epitelu (Schiffman et al., 2007). Přibližně 3 týdny trvá doba od samotné infekce až po uvolnění viru, naopak doba od infekce po výskyt lézí se udává v týdnech či měsících (Stanley, 2006).

Epidemiologické studie důsledně potvrzují, že kouření může podpořit progresi z HPV infekce na cervikální malignitu (Roura et al., 2014).

2.2.1 Lidský papillomavirus (HPV)

Lidský papillomavirus je DNA vir (z čeledi *Papillomaviridae*) o malé velikosti (přibližně 8 000 párů bází), žijící s lidstvem desítky tisíciletí bez změn ve svém genetickém složení (Castellsagué, 2008). Infekce papillomavirem je sexuálně přenosná a zodpovědná za zvyšující se výskyt rakoviny děložního čípku, zejména u stále mladších sexuálně aktivních lidí (Kolář, 2003).



Obrázek 2: Životní cyklus lidského papillomaviru. Převzato a upraveno podle: Crosbie et al., 2013

Existuje téměř 100 různých druhů papillomavirů. Jejich číselné označení vyjadřuje genotyp. Rozlišujeme dva typy – kožní a slizniční. Kožní (např. HPV 1, 4, 5, 8, 41, 60, 63 a 65) jsou často izolovány z kožních lézí v případě imunopresivních pacientů po transplantaci nebo v případech epitelálních nálezů. Slizniční (např. HPV 6, 11, 13, 16, 18, 39) bývají identifikovány u benigních i maligních lézí v oblasti okolo konečníku a zevních pohlavních orgánů u obou pohlaví (Castellsagué, 2008). Další rozdělení papillomavirů je na papillomaviry s nízkým rizikem (způsobují bradavice na pohlavních orgánech, např. HPV 6 a 11) a papillomaviry s vysokým rizikem, které jsou spojeny s karcinomem děložního hrdla, např. HPV 16 a 18 (Muñoz et al., 2003). Proteiny E6 a E7, které se vyskytují ve vysoce rizikových typech HPV, jsou důležitým patogenetickým faktorem podporující vývoj karcinomu, jelikož mají schopnost zničit produkty genů p53 a pRb (Kolář, 2003).

Studie v roce 1995 potvrdily, že HPV byl detekován v 93 % případů rakoviny děložního hrdla, bez výrazné rozdílnosti viru HPV mezi studovanými zeměmi. HPV 16 představoval 50 % případů, HPV 18 se vyskytl v 14 % případů. HPV byl převládajícím typem ve všech zemích, až na Indonésii, kde byl HPV 18 častější (Bosch et al., 1995). HPV má schopnost vyhnout se imunitnímu systému a proto metody, které jsou využívány imunitním systémem, jsou proti viru neúčinné (Stanley, 2006). HPV byl vůbec jako první označen „nezbytnou příčinou“ lidské rakoviny, což znamená, že rakovina se bez jeho přítomnosti vyvíjet nebude (Bosch et al., 2002).

V České republice se lze od roku 2006 nechat proti HPV preventivně naočkovat. Očkování je nutné provést před zahájením sexuálního života. Očkování je prováděno

ve třech dávkách 0., 2. a 6. měsíc. Vakcína je založena na podobnosti k viru, obsahuje totiž viru podobné částice tvořené kapsidovým proteinem L1. Výsledky ukazují na ochranu před rakovinou děložního čípku, redukci cervikálních lézí i rozvoji genitálních bradavic (Novotný et al., 2016).

2.3 Apoptosa

Spuštění apoptosy je klíčové pro úspěšný boj s nádorovými buňkami. Apoptosa je definovaná jako programovaná buněčná smrt, při které dochází k aktivaci proteas a endonukleas, jejímž výsledkem je destrukce buňky. Apoptotickými fragmenty nazýváme části buňky, které vznikly štěpením DNA a fragmentací jádra. Díky apoptose je v prenatálním vývoji dáván vznik dutinám, anebo dochází k oddělení částí těla (Rosypal, 2003; Slabý et al., 2015). Lze ji zařadit k průvodnímu znaku většiny nádorových onemocnění a vede ke spoustě patologických stavů (Klener et al., 2010).

Apoptosa zahrnuje dvě apoptotické dráhy. Jedna z nich je označována jako receptorová vnější a druhá je označována jako vnitřní mitochondriální. Obě tyto dráhy jsou spouštěny caspasami. Vnější apoptosa je aktivována shlukováním „receptorů smrti“ např. TNF-tumor nekrotizující faktor a FAS/CD. Shlukováním receptorů dojde ke vzniku komplexu indukující buněčnou smrt (DISC), díky kterým dojde k aktivaci iniciačních caspas, a ty následně štěpí caspasy efektorové. Pokud dojde k roztržení vnější mitochondriální membrány, je spuštěna mitochondriální apoptosa. Vznikne efektorový komplex apoptosom a dále se štěpí efektorové caspasy (Klener et al., 2010).

Proteiny, které jsou zapojeny do procesu apoptosy, jsou více popsány v následujících podkapitolách.

2.3.1 Caspasy – 3 a 7

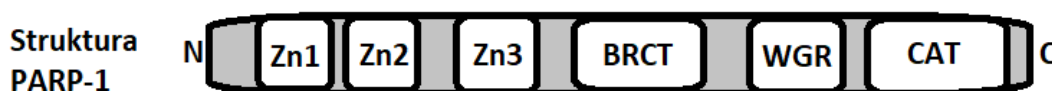
Patří mezi cysteinové proteasy, což jsou enzymy ze třídy hydrolas, štěpicí peptidové vazby v bílkovinách, hrající důležitou roli při apoptose (Lavrik et al., 2005). S ohledem na své funkce se dělí do tří kategorií: iniciační (caspasy -1,-2,-4,-5,-8,-9), efektorové caspasy (-3,-6,-7) a zánětlivé caspasy (Wang et al., 2010; Slabý et al., 2015). Nejdříve jsou aktivovány iniciační caspasy, které dále aktivují efektorové. Apoptotický program mají na starost caspasy efektorové (Slabý et al., 2015). Caspasy jsou v buňce v neaktivní formě, proto jsou nejdříve vytvářeny pouze jednořetězcové molekuly, které musí být následně rozštěpeny, aby se staly proteolyticky aktivní (Riedl et al., 2001). Vzhledem k jejich ústřední roli v programované buněčné smrti je jejich výskyt

pozorován u řady onemocnění, včetně infarktu myokardu či Alzheimerovy choroby. Léky inhibující zánětlivé caspasy, by mohly ovlivňovat autoimunitní onemocnění, jako je např. revmatoidní artritida (Lavrik et al., 2005).

Caspasa-3 je klíčovým zprostředkovatelem apoptosy, který je zodpovědný za proteolytické štěpení příslušných proteinů (např. PARP-1). Aktivní enzym je složen ze dvou podjednotek – 17 kDa a 12 kDa (Cohen, 1997). Procaspasa-7 je tvořena 303 aminokyselinami a při její aktivaci se vytvoří velký zbytkový řetězec a malý řetězec obsahující právě aktivní caspasu 7 (Riedl et al., 2001).

2.3.2 PARP-1 [Poly (ADP-ribose) polymerasa-1]

Poly(ADP-ribose)polymerasa-1 je jaderný enzym, který je složen ze tří domén: na N-terminální doménu se váže DNA, interakci protein-protein (např. BRCA1) umožňuje automodifikační doména a za enzymatickou aktivitu proteinu zodpovídá doména katalytická (Dulaney et al., 2017). PARP-1 je enzym pomáhající při opravě DNA a zároveň je nejrozšířenější enzym, jehož struktura je celkově tvořena 6 doménami (Plummer, 2014; Langelier et al., 2011). Na jeho N-konci (obrázek 3) jsou umístěny dva zinkové prsty Zn1 a Zn2 rozpoznávající strukturu DNA. Zn1 se slabě váže k DNA, ale vazba je potřebná pro aktivaci PARP-1, na rozdíl od Zn2, která se k DNA váže pevně, ale pro aktivaci PARP-1 není potřebná (Langelier et al., 2011). PARP-1 je substrátem pro caspasy (Cohen, 1997).



Obrázek 3: Schématický náčrt struktury poly(ADP-ribose)polymerasy-1. Převzato a upraveno podle Langelier et al., 2011

2.3.3 Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2)

Antiapoptotický protein Bcl-2 je protein o velikosti 26 kDa, který je vázán k mitochondriální i jaderné membráně buňky. Díky jeho sekvenci tvoří, společně s geny bax a bcl-X, genovou rodinu bcl-2, která je složena z inhibitorů i promotorů apoptosy. Tyto geny mají antiapoptotickou a proapoptickou funkci a patří mezi významné regulátory apoptosy. Do antiapoptotických proteinů patří Bcl-2, Bcl-X_L a Mcl-1 a do proapoptotických proteinů patří např. Bax, Bak a Bcl-X_S. Proapoptotické geny mohou působit jako nádorové supresory a buňka díky nim dokáže přežít v nepříznivých

podmínkách. Díky této vlastnosti dochází k vývoji nádorů a rezistenci na mnoho protinádorových léčiv (Kolář, 2003).

Typické pro členy této genové rodiny jsou homologní domény BH1-BH4, kdy většina členů obsahuje BH1 a BH2. Za jejich lokalizaci na vnější straně mitochondriální membrány je zodpovědný úsek hydrofobních aminokyselin nacházející se na C - terminálním konci (Kolář, 2003).

2.3.4 Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukemie 1)

Mcl-1 je antiapoptotický protein, který řadíme do genové rodiny Bcl-2, z důvodu podobnosti ve struktuře (Zhang et al., 2002). Protein Mcl-1 (40 kDa) je ovšem větší než ostatní proteiny v genové rodině Bcl-2, zejména díky přítomnosti aminokyselinových částí, nacházejících se na jeho N-konci (Akgul et al., 2000).

Opferman a kolektiv (2005) zkoumali protein Mcl-1 a zjistili, že je nezbytný k udržení homeostázy hematopoetických kmenových buněk. (Opferman et al., 2005). Bylo také prokázáno, že protein Mcl-1 je potřebný pro vývoj i udržování B a T-lymfocytů (Opferman et al., 2003). Další důležitou roli má protein Mcl-1 při rozvoji nervového systému a při akutním poranění neuronů (Arbour et al., 2008). Protein Mcl-1 byl také studován v souvislosti s revmatoidní artritidou. Byla zkoumána jeho exprese a porovnána s kontrolními buňkami. Výsledkem pozorování bylo, že Mcl-1 je potenciálním terapeutickým cílem (Liu et al., 2005)

2.3.5 Protein p53

Protein p53 je hlavní nádorový supresor, jehož funkce je důležitá při obraně buněk proti rakovině. Protein p53 se dá rozdělit na tři části, mezi které patří, aminová doména obsahující aktivační doménu, centrální část obsahující specifickou sekvenční doménu a multifunkční karboxylová doména (Ko et al., 1996). Patří mezi důležité transkripční faktory, regulující geny jdoucí k 3' konci při zástavě buněčného cyklu, při opravě DNA a programované buněčné smrti, a proto je tato mutace často pozorována při maligních nádorech (Ghobrial et al., 2005).

Mnoho lidských nádorů nese významné mutace v kódujícím genu TP53, které zároveň dodávají zmutovanému proteinu nové aktivity, které mohou přispívat ke zvýšené odolnosti k protinádorovým léčbám. Tato mutace se nazývá mutace zesílení funkce a poskytuje novou nebo zvýšenou aktivitu na proteinu. V případě postižené nádorové buňky je protein p53 akumulován v nadměrném množství (Oren et al., 2010).

MDM2 je protein, který se váže na protein p53 a účinně jej aktivuje. Aktivuje i několik dalších zajímavých kritických regulátorů buněčného cyklu, jimiž jsou pRb, E2F1/DP1 a p19ARF, čehož vyplývá, že je zapojen do komplexní sítě regulačních interakcí. Právě díky těmto interakcím je jasné, že působí na buněčný cyklus, apoptosu a neoplastickou transformaci (Juven-Gershon et al., 1999).

2.3.6 Retinoblastomový protein (Rb)

Retinoblastomový protein, je tumor supresorový gen, který je známý svou funkcí, spočívající v regulaci buněčného cyklu (Lipinski et al., 1999). Jeho molekulová hmotnost je 110 kDa (Goodrich et al., 1991). Poprvé byl nalezen u pacientů trpících nádorem sítnice, neboli retiny (Kolář, 2003). Skupina Rb proteinů, zahrnuje tři členy: p105, p107 a p130, které jsou souhrnně označovány jako „kapesní proteiny“ (Giacinti et al., 2006). Protein Rb může regulovat genovou expresi prostřednictvím transkripčního faktoru E2F, buď to přímou inhibicí pozitivní transkripční aktivity již navázaných E2F nebo přemístění transkripčních komplexů na promotory obsahující E2F. Regulace aktivity E2F také pravděpodobně hraje roli v ochraně diferencovaných tkání před apoptosou (Lipinski et al., 1999).

Retinoblastomový protein vykazuje své účinky v G_0/G_1 fázi buněčného cyklu, kde dochází ke kontrole buněčné proliferace a kde převažuje ve své nefosforylované formě (Weinberg, 1995; Goodrich et al., 1991). Pokud by nastaly příznivé podmínky pro vstup buňky do G_1 fáze, bude protein podléhat fosforylaci (Weinberg, 1995). Fosforylace proteinu Rb je zodpovědná za postup do S-fáze za pomoci transkripčních faktorů E2F, které jsou regulovány (Slabý et al., 2015).

Retinoblastomový protein je inaktivován cyklin-dependentními kinázami (CDK) a společně s růstovými signály vedou k pokračování buněčného cyklu. E2F faktor se po fosforylaci komplexem cyklin-CDK4/6 uvolňuje a translokuje se do jádra, kde je spuštěna řada genů sloužící po vstup do S-fáze. V případě potřeby může být fosforylační aktivita utlumena inhibitory cyklin-dependentních kináz (Slabý et al., 2015).

2.4 Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Díky svým zajímavým biologickým účinkům přitahují alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* zájem vědy, neboť jsou atraktivní pro vývoj nových léčiv proti různým onemocněním.

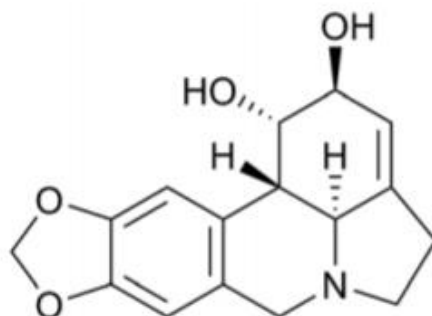
Čeľad' *Amaryllidaceae* zahrnuje 75 rodů a 1100 druhů, které se ve světě nachází v tropických a teplých mírných oblastech (He et al., 2015). Zástupce rostlinných druhů lze nalézt i v České republice, a jsou to narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženky (*Galanthus*; Samuelsson et al., 2015). Alkaloidy čeledi amarylkovitých se rozdělují, společně se svými deriváty, do pěti strukturních typů. Jsou to skupiny typu lykorinového, lykoreninového, tazettinového, krininového a narciklasinového. Lykorin, který vykazuje protinádorovou aktivitu, byl vyizolován jako první alkaloid čeledi amarylkovitých. Od první izolace lykorinu bylo izolováno přes 500 dalších druhů alkaloidů, které jsou rozděleny podle již zmíněných struktur (Evidente et al., 2009).

Rozsáhlejší studie ukázaly, že alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* vykazují širokou škálu bioaktivit, jako jsou protinádorové, protizánětlivé, antivirotické, antibakteriální, antifungální, antimalarické a analgetické (Fürst, 2016; He et al., 2015). Antiproliferační účinky jsou zřejmě způsobeny narušením biosyntézy eukaryotických proteinů. Protinádorová aktivita silně koreluje se schopností těchto alkaloidů indukovat apoptosu v rakoviných buňkách (Evidente et al., 2009). Tým Jimeneze dokázal, že lykorin, narciklasin, pretazettin a pseudolykorin způsobují zastavení růstu buněk při koncentracích 100 μM i nižších (Jimenez et al., 1976).

2.4.1 Lykorinový strukturní typ

První alkaloid čeledi amarylkovitých, lykorin, má silné inhibiční účinky růstu ve vyšších rostlinách již při velmi nízké koncentraci (Arrigoni et al., 1975). Dalšími látkami, které patří pod tento typ alkaloidů, jsou pseudolykorin, norpluvin, amarbellisin, lykoren, galantamin a ungeremin. Všechny zmíněné sloučeniny jsou na bázi pyrrolofenanthridinové chemické kostry (Evidente et al., 2009). Reminyl je název pro galantamin hydromobromid, který je prvním alkaloidem amarylkovitých, používaným jako lék (McNulty et al., 2007).

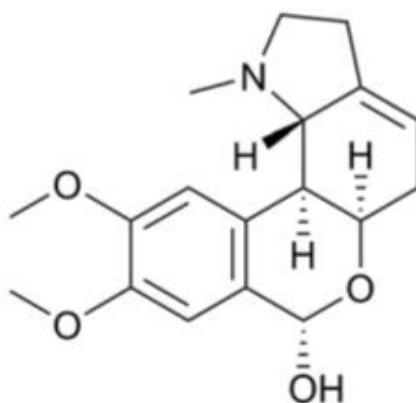
Protinádorová aktivita lykorinu byla studována u více druhů nádorů. Yu a kolegové (2017) zkoumali účinky lykorinu na hepatocelulární karcinom (HCC). Na základě výzkumu byly zjištěny autofagické a apoptotické účinky lykorinu na hepatocelulární karcinom. Lykorin představuje slibné terapeutické účinky v léčbě HCC, ale mechanismus působení lykorinu na nádorové buňky stále není objasněn (Yu et al., 2017). Účinek lykorinu byl také zkoumán v karcinomu močového měchýře. Lykorin totiž aktivoval vnitřní apoptotickou kaskádu, což ve zkoumaných buňkách vedlo k jejich apoptose (Wang et al., 2017). Na rakovinu prostaty měl lykorin taktéž vliv. Snížil proliferaci, migraci i invazi buněčných linií rakoviny prostaty (Hu et al., 2015).



Obrázek 4: Struktura lykorinu. Převzato z: Jin et al., 2019

2.4.2 Lykoreninový strukturní typ

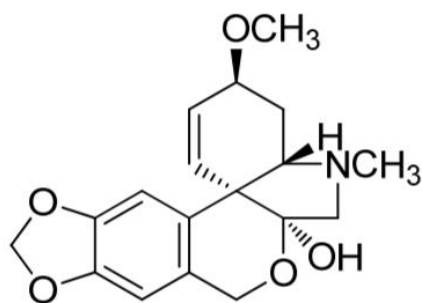
Na benzopyrano (3-, 4-) indolové chemické kostře je založen lykoreninový typ alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*. Patří sem lykorenin, klavonin, heppeastrin, klivimin a nobilisin A/B (Evidente et al., 2009). Vyskytuje se například v rodu *Lycoris* (Miyasaka et al., 1980). U lykoreninového strukturní typu byla zjištěna cytotoxická, antimalární a antifungální biologická aktivita (Cedrón et al., 2013). Lykorenin také snižuje krevní tlak a tepovou frekvenci (Miyasaka et al., 1980).



Obrázek 5: Struktura lykoreninu. Převzato z: Jin et al., 2019

2.4.3 Tazettinový strukturní typ

Skupina alkaloidů, jejichž chemickou kostrou je 2 - benzopyrano-(3,4)indol (Dalecká et al., 2013). Tazettinový typ alkaloidů reprezentují rody *Crinum*, *Narcissus*, *Galanthus*. Řadíme sem tazettin a pretazettin. Tazettin vykazuje antiproliferační aktivitu proti myšímu lymfomu. Pretazettin je účinný proti Ehrlichově tumoru, karcinomu plic a Rauscherově leukémii, jelikož dokáže inhibovat růst Rauscherova viru (Hohmann et al., 2001; Furusawa et al., 1976)

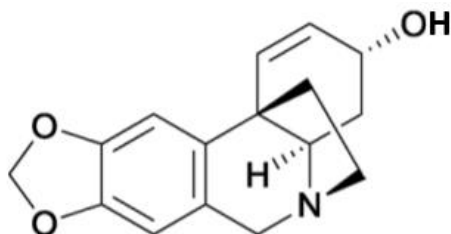


Obrázek 6: Struktura tazzetinu. Převzato a upraveno podle: Dalecká et al., 2013

2.4.4 Krininový a haemanthaminový strukturní typ

Jak už napovídá název, mezi alkaloidy krininového a haemanthaminového typu patří krinin a haemanthamin, dále distichamin, augustamine, ambellin a bufanidrin (Nair et al., 2012). Vycházejí ze stejné chemické kostry 5,10*b*-etnofenantridinu, ovšem konfigurace 5,10*b*-etano můstku je opačná. Z toho vyplývá, že tyto alkaloidy jsou enantiomery (Bastida et al., 2011; Andrade de et al., 2014). Skupiny těchto alkaloidů můžeme najít v rodech *Crinum*, *Narcissus*, *Lycoris* či *Nerine* (Kornienko et al., 2008).

Bylo prokázáno, že heamanthamin cílí na ribozom za účelem zastavení elongační fáze translace. Pokud je tato regulace narušena, dochází k odumření buněk (Pellegrino et al., 2018).



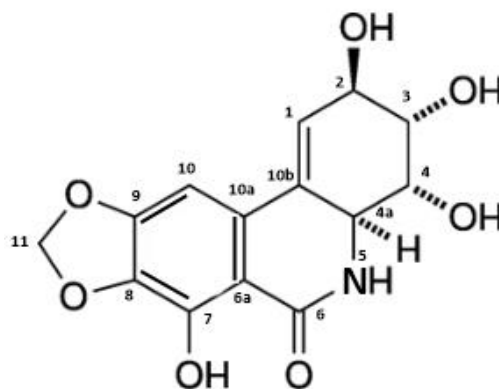
Obrázek 7: Struktura krininu. Převzato a upraveno podle: Jin et al., 2019

2.4.5 Narciklasinový strukturní typ

Narciklasin (1, 3, 4, 5- tetrahydro- 2, 3, 4, 7- tetrahydroxy [1, 3] dioxolo [4, 5] fenanthridin-6 (2H)- on) byl vyizolovaný z cibulek rodu *Narcissus* (z čeledi *Amaryllidaceae*) v roce 1967. V roce 1967 byl zároveň popsán jeho protinádorový účinek (Ceriotti, 1967). Fenanthridonovou chemickou kostru mají také alkaloidy pankratistatin, a *cis*- a *trans*-dihydronarciklasin (Evidente et al., 2009). Alkaloidy narciklasinového typu lze nalézt v rodech *Galanthus*, *Haemanthus*, *Leucojum*, *Sprekelia* a *Vallota* (Hu et al., 2015).

Narciklasin, vzhledem k jeho vysoce účinnému cytotoxickému účinku na rakovinné buňky, byl intenzivně zkoumán jako protinádorová sloučenina jak *in vitro*, tak *in vivo* (Fürst, 2016). Důvodem protinádorové aktivity může být silný inhibiční účinek narciklasinu na syntézu proteinů v ribozomech. Tento účinek je způsoben interakcí s transferázou, nacházející se na velké podjednotce ribozomu (Jimenez et al., 1976).

Za zmínku určitě stojí protizánětlivá aktivita narciklasinu. Jako první zkoumal protizánětlivou aktivitu Mikami s kolektivem v roce 1999, kdy bylo zjištěno, že narciklasin interaguje s kalprotektinem. Kalprotektin je hojný v cytosolu neutrofilů, což znamená, že při zánětu je jeho koncentrace zvýšená (Mikami et al., 1999). Extrakt z rostliny *Haemanthus coccineus* blokoval aktivaci leukocytů ve dvou myších modelech. V této studii byl narciklasin vyhodnocen jako účinná látka (Fuchs et al., 2015; Fürst, 2016).



Obrázek 8: Struktura narciklasinu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Použité přístroje

Experimentální část bakalářské práce byla uskutečněna za použití následujících přístrojů:

| | |
|--|----------------------|
| Aparatura pro vertikální elektroforézu | Bio-Rad |
| Aparatura pro western blotting | Bio-Rad |
| Centrifuga | Thermo Fisher |
| CO ₂ inkubátor MCO-17AIC | Sanyo |
| Fluorescenční detektor Fluoroskan Ascent | Labsystem |
| Chemiluminiscenční kamera LAS4000 | Fujifilm |
| Kývačka | Biosan |
| Laminární box VBH Compact | Steril |
| Magnetická míchačka | VELP Scientifica |
| Optický mikroskop CK2 | Olympus |
| Průtokový cytometr Facs Verse | Becton Dickinson |
| Termoblok | Thermo Fisher |
| Ultrazvuková vana | VWR |
| Ultrazvukový homogenizátor | Bandelin |
| UV-VIS spektrofotometr UV-1800 | Shimadzu |
| Vakuová pumpa Vacusafe | Integra Biosciences |
| Vodní lázeň | GFL |
| Vortex | Heidolph Instruments |
| Zdroj napětí PowerPac Basic | Bio-Rad |

Výrobce/stát

Bio-Rad (USA), Thermo Fisher Scientific (USA), Sanyo (Japonsko), Labsystem (Finsko), Fujifilm (Japonsko), Biosan (Lotyšsko), Steril (Itálie), VELP Scientifica (Itálie), Olympus (Japonsko), VWR (USA), Bandelin (Německo), Shimadzu (Japonsko), Integra Biosciences (Švýcarsko), Gesellschaft für Labortechnik – GFL (Německo), Heidolph Instruments (Německo), Becton Dickinson (USA)

3.1.2 Použité chemikálie

Experimentální část bakalářské práce byla uskutečněna za použití následujících chemikálií:

| | |
|--|-------------------|
| Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metylkumarin (Ac-DEVD-AMC) | Sigma-Aldrich |
| Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd (Ac-DEVD-CHO) | Sigma-Aldrich |
| Akrylamid | Calbiochem |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich |
| Bis akrylamid | Sigma-Aldrich |
| Butanol | Lach-Ner |
| Dimetylsulfoxid (DMSO) | Panreac Applichem |
| Dithiothreitol (DTT) | Roche |
| Dodecylsírán sodný (SDS) | Lach-Ner |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Sigma-Aldrich |
| Etanol 70 % | Lach-ner |
| Etanol 96 % | Lach-ner |
| Etylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) | Sigma-Aldrich |
| Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich |
| Fetální telecí sérum (FBS) | Biowest |
| Fluorid sodný (NaF) | Lach-ner |
| Glycin | Sigma-Aldrich |
| Chemiluminiscenční činidlo luminol-peroxid (1:1) | Thermo Fisher |
| Laemmliho pufr (4x) | Bio-Rad |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich |
| Penicilin | Sigma-Aldrich |
| Peroxodosírán amonný (APS) | Bio-Rad |
| Ponceau S | Serva |
| Propidium jodid | Sigma-Aldrich |
| Proteinový marker (Precision Plus, Protein Dual color Standards) | Bio-Rad |
| Streptomycin | Sigma-Aldrich |
| Tetrametyletylendiamin (TEMED) | Bio-Rad |
| Tris (hydroxymetyl) aminometan (TRIS) | Serva |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |

Trypsin
Tween 20

Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich

Výrobce/ Stát

Sigma-Aldrich (USA), Thermo Fisher Scientific (USA), Serva (Německo), Bio-Rad (USA), PanreacApplichem (Německo), Biowest (Francie), Lach-Ner (Česká republika), Roche (Německo)

3.1.3 Použité roztoky

Experimentální část bakalářské práce byla uskutečněna za použití následujících roztoků:

1 M TRIS/ HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/ 200 ml pH 6,8

1 M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/ 400 ml pH 8,8

10 % APS: 0,1 g / 1 ml H₂O

10 % DMEM: 10 % fetální sérum, L-glutamin (2 mM), streptomycin (0,1 mg/ml) a penicilin (100 U/ml)

10 % SDS: 5 g SDS / 50 ml H₂O

5 % sušené mléko: 2,5 g sušeného mléka, 50 ml TBS s Tweenem

AA+Bis: 30 % Akrylamid (AA) + 0,8 % Bisakrylamidu (Bis AA): 58,4 g AA + 1,6 N'N Bis AA/200ml

Caspasový lyzační pufr: 10 mM KCl, 5 mM Hepes pH 7,4; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA a 0,2 % CHAPS; před použitím přidat 1 mM DTT; 0,5 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin; 1 mM PMSF

Caspasový reakční pufr: 25 mM PIPES/KOH, pH 7,3; 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂; před použitím přidat 1 mM DTT, substrát Ac-DEVD-AMC: 10 mM roztok v DMSO

Činidlo Bradford: 0,01 % Coomassie brilliant blue; 95 % etanol; 85 % kyselina o-fosforečná

Elektroforetický pufr: 37,8 g TRIS, 180 g Glycin, 12,5 g SDS do 2,5 l H₂O

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4

Ponceau S: 0,1 g rozpustit v 0,5 ml 98 % CH₃COOH a doplnit do 50 ml H₂O

Pufr na western blotting 10x: 30,3 g TRIS, 144 g Glycin do 1 litru H₂O

RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2 % Nonidet P-40 (pH = 7,4) doplnit do 50 ml, před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2 mM NaF

TBS s 0,1 % Tweenem 20: 500 ml TBS + 500 ml 0,1 % Tween 20

TBS: pH 7,6; 24,2g TRIS, 80 g NaCl

Trypsin/EGTA (1:1) : 0,1 % trypsin, 0,25% EGTA

3.1.4 Použité protilátky

Experimentální část bakalářské práce byla uskutečněna za použití následujících protilátek:

Primární protilátky

Tabulka 1: Přehled primárních protilátek

| | zdroj | klon | ředění | výrobce |
|-----------------------|--------|-------|--------|------------------------------|
| anti-PARP | králík | 46D11 | 1:250 | Cell Signaling |
| anti-p53 | myš | DO-1 | 1:10 | dr. Vojtěšek z MOÚ v Brně |
| anti-β-actin | myš | C4 | 1:2500 | Santa Cruz |
| anti-caspasa-7 | králík | - | 1:250 | Cell Signaling |
| anti-pRb | králík | - | 1:1000 | Cell Signaling |
| anti-totalRb | myš | 4H1 | 1:500 | Cell Signaling |
| anti-Mcl-1 | králík | D35A5 | 1:500 | Cell Signaling |
| anti-Bcl-2 | myš | - | 1:250 | Sigma-Aldrich |

Sekundární protilátky

RAM/Px (králíčí proti myši označená křenovou peroxidasou , ředění 1:1000), Sigma-Aldrich

SWAR/Px (vepřová proti králíčí označená křenovou peroxidasou, ředění 1:500), Cell Signaling

Výrobce/Stát

Sigma-Aldrich (USA), Cell Signaling (USA), Santa Cruz (USA).

3.1.5 Použitá buněčná linie

V experimentální části byla použita adherentní lidská nádorová buněčná linie HeLa odvozená od nádoru děložního hrdla (ECACC, Velká Británie).

Tato buněčná linie byla kultivována ve sterilních plastových Petriho miskách (TPP, Švýcarsko), v kultivačním médiu DMEM, obohacené 10 % telecím fetálním

sérem, penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml) a L-glutaminem (2 mM). Kultivace probíhala v inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při 37 °C v atmosféře obsahující 5,5 % oxidu uhličitého a 100 % vlhkosti. Buňky byly pasážovány 3x týdně, aby nebyl stresován jejich růst nedostatkem místa na misce a v novém médium jim byly dodány živiny pro růst.

3.1.6 Testované deriváty narciklasinu

Výchozí struktura narciklasinu byla různě modifikována v poloze 2, 3, 4 a 7 pro zvýšení biologické aktivity na nádorových buňkách a snížení toxicity na normálních lidských buňkách (obrázek 8). Modifikaci narciklasinu provedl za účelem studie Jerald J. Nair (University of Kwazulu - Natal, Pietermaritzburg, Jihoafrická republika).

V experimentální části bakalářské práce byly testovány deriváty narciklasinu **JJ34** (derivát narciklasinu), **JJ35** (derivát narciklasinu), **JJ37** (narciklasin – obrázek 8). Proti buňkám HeLa odvozených od lidského nádoru děložního hrdla vykazovaly po 72 hodinách od aplikace následující hodnoty cytotoxicity: **JJ34** - IC_{50} $0,61 \pm 0,01$ µM, **JJ35** - IC_{50} $0,63 \pm 0,08$ µM a látka **JJ37** - IC_{50} $0,18 \pm 0,02$ µM. Cytotoxicita byla měřena v Laboratoři růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Na základě výsledných hodnot cytotoxicity IC_{50} byla stanovena koncentrace, která byla použita v experimentální části po dobu 24 hodin. Zvolená koncentrace látek, naředěná do kultivačního média, byla 0,1 µM a 1 µM.

3.2 Metody

Experimentální část bakalářské práce byla provedena pomocí níže uvedených metod.

3.2.1 Ovlivnění buněčné linie testovanou látkou a její následné sklizení

Kultivace buněčné HeLa linie byla provedena na Petriho misce o průměru 100 mm při teplotě 37 °C v atmosféře 5,5 % oxidu uhličitého. Na Petriho misku byla linie vysázena do média o objemu 10 ml. Pro získání dostatečného počtu buněk pro pokus bylo nutno vysázet alespoň čtyři misky, které byly následně spláchnuty do jedné zkumavky. Pro určení počtu buněk byla použita Bürkerova komůrka a optický mikroskop, kdy po jejich spočítání, byly vysety na misku o objemu 10 ml s požadovanou koncentrací 7×10^5 buněk. Misky s touto koncentrací buněk byly 24 hodin inkubovány v inkubátoru a po uplynutí této doby bylo médium odsátou skleněnou pipetou a nanášeno předem

připravené médium (5 ml), které obsahovalo testovanou látku (JJ34, JJ35, JJ37) o zvolené koncentraci (0,1 μ M; 1 μ M). Na dvě misky, které sloužily jako kontrolní, bylo na první přidáno pouze kultivační médium (10 % DMEM) a na druhou kontrolní misku, kultivační médium s obsahem DMSO (stejný objem jako objem přidávaných látek). DMSO bylo do misek přidáno za účelem ověření, že buňky neovlivňuje. Testované misky byly inkubovány dalších 24 hodin a sklizeny pro příslušnou metodu – western blotting, test aktivity caspas a průtokovou cytometrii.

Buňky sklizené níže popsaným způsobem byly použity pro metodu Western blotting a test aktivity caspas. Před samotným sklízením buněk byl zapsán jejich vzhled, tvar a množství mrtvých či živých buněk v misce. Při sklízení bylo nejdůležitější všechny kroky provést na ledu, aby se co nejvíce eliminovala denaturace proteinů, taktéž musela být vychlazená používaná centrifuga na teplotu 4 °C. Misky byly seškrábány škrabkou a obsah byl pomocí automatické pipety přenesen do předem připravené popsané zkumavky a zbylé přichycené buňky na misce byly opláchnuty 1 ml PBS a přeneseny do zkumavky. Buněčná suspenze byla centrifugována 10 min při 1000 \times RPM a 4 °C. Získaný supernatant byl opatrně odsát a pelet byl promyt 1 ml PBS, protřepán a promíchán na vortexu. Po další centrifugaci, kdy byly dodrženy stejné podmínky, byl odsán supernatant, pelet resuspendován v 1 ml a přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky. Mikrozkušavky byly zcentrifugovány, supernatant odsán do sucha a pelet byl uložen do mrazáku do -80 °C.

Při sklízení vzorků pro průtokovou cytometrii se postupuje při sklízení stejně jako na Western blotting či caspasový test, ovšem nepoužívá se metoda využívající škrabku, ale metoda trypsinizace. Automatickou pipetou bylo odsáno všechno kultivační médium do připravené zkumavky. Miska byla opláchnuta 2 ml roztokem EGTA a obsah z misky byl přenesen do zkumavky. Dále byl nanesen roztok trypsin/EGTA na přibližně 5 min, aby se uvolnily přilepené buňky na dně misky. Uvolněné buňky byly opláchnuty 5 ml kultivačního média, byly přeneseny do zkumavky a miska opláchnuta 1 ml filtrovaným PBS. Zkušavka byla centrifugována 10 min při 4 °C a 1000 \times G (rychlost zvolená pro stočení všech apoptotických tělísek). Získaný supernatant byl odsán a pelet resuspendován v 1 ml filtrovaného PBS. Po další centrifugaci, kdy byly dodrženy stejné podmínky, byl odsán supernatant a pelet opět rozpuštěn v 1 ml filtrovaného PBS. Po centrifugaci a odsání supernatantu, byl pelet důkladně rozmíchán v 100 μ l filtrovaného PBS za účelem získání jednotlivých buněk. Zkušavky se vzorky byly postupně dobře míchaný

na vortexu a po kapkách bylo přidáváno 1 ml 70 % vychlazeného etanolu. Díky etanolu dochází k permeabilizaci membrány, aby byl umožněn snadný průchod DNA sondy do buňky. Zafixované vzorky byly uskladněny v mrazáku při -20 °C.

3.2.2 Lyzování buněk

Lýze buněk byla prováděna za účelem narušení vnější membrány, aby se proteiny z buňky uvolnily do roztoku. Lyzace buněk pro SDS-PAGE elektroforézu a western blotting se provádí za použití lyzačního pufru RIPA (na přípravu 1 ml RIPA pufru bylo těsně před použitím přidáno 1 μ l leupeptinu, 1 μ l aprotininu, 10 μ l PMSF, 10 μ l DTT a 2 μ l NaF). Lyzaci bylo nutno opět provést na ledu z důvodu eliminace denaturace proteinů. Mikrozkušavky se vzorky byly vytáhnuty z mrazáku a nechány roztát na ledu. Podle velikosti peletu byly buňky resuspendovány v lyzačním pufru RIPA (cca 30-40 μ l). K lyzaci vnější membrány byla použita ponorná ultrazvuková sonda (10 s, 3 cykly, 30 % max). Mikrozkušavky byly centrifugovány 20 minut při 14 000 \times RPM a 4 °C. Získaný lyzát byl přenesen do nové mikrozkušavky, kdy byl pomocí pipety odměřen přesný objem přeneseného lyzátu. Pro další kroky bylo nutno zjistit koncentraci proteinů ve vzorku Bradfordovou metodou. Do skleněných mikrozkušavek bylo aplikováno činidlo Bradford a 1 μ l vzorku. Každý vzorek byl v duplikátu a po jeho přidání do činidla byla provedena 10 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo stanoveno celkové množství proteinů ve vzorku při 595 nm na spektrofotometru. Podle nejmenší naměřené hodnoty proteinů bylo vypočítáno množství lyzačního pufru a 5x SDS, který působí jako detergent a dochází tak denuraci proteinů a zároveň zrušení disulfidické vazby. SDS jim dává stejný záporný náboj, migrace proteinů při elektroforéze tedy závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti. Zředěné vzorky byly zamíchány a zahřáty na 98 °C po dobu 2 minut. Následně uloženy do -80 °C.

U caspasového testu se při lyzaci postupovalo stejně, jen byl použit jiný lyzační pufr, a to caspasový lyzační pufr (na přípravu 1 ml caspasového lyzačního pufru bylo těsně před použitím přidáno 1 μ l leupeptinu, 1 μ l aprotininu, 10 μ l PMSF, 10 μ l DTT a 2 μ l NaF). Koncentrace proteinů byla ředěna na 3 μ g/ μ l, nepřidával se 5x SDS a vzorky nebyly zahřívány na 98 °C. Po lyzaci vzorky uloženy do mrazáku do -80 °C.

3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů

Nejdůležitější krok pro bezchybný průběh elektroforézy bylo správné sestavení elektroforetické komůrky a dostatečné ztuhnutí polyakrylamidového gelu. Pro dělení proteinů byl zvolen 10 % dělicí gel a 5 % zaostřovací gel (tabulka 2). Pro zarovnání dělicího gelu byl použit butanol, následovalo tuhnutí po dobu 45 minut, propláchnutí po butanolu, nanesení zaostřovacího gelu a okamžité vložení hřebínku pro vytvoření jamek. Před nanesením vzorků do jamek bylo důležité prověřit těsnost komůrky. Do první jamky bylo nanášeno 3 μ l molekulového markeru (Precision Plus, Bio-Rad) a byl nanášen vzorek s obsahem 40 μ g proteinů (vzorky nanášeny zleva doprava a před použitím rozehráty 2 minuty na 98 °C). Pro dobu běhu vzorků v zaostřovacím gelu bylo aplikováno napětí 80 V. Po vstupu vzorků a hlavně molekulového markeru do dělicího gelu, bylo nastaveno napětí 120 V na přibližně 1,5 hodiny. Zaostřovací gel se používá pro sjednocení vzorků při jeho pohybu. Po doběhu vzorků na konec dělicího gelu byla elektroforéza ukončena, aby nedošlo ke ztrátě potřebných proteinů.

Zaostřovací část gelu byla odřezána a dělicí gel byl přenesen na nitrocelulosoovou membránu, která musela být uzavřena v blotovací kazetě společně s porézní podložkou a filtračními papíry. Důležitým krokem bylo odstranění bublin z kazety. Kazeta byla uložena do nádoby s vychlazeným blotovacím pufrem, ledem a umístěna na elektromagnetickou míchačku. Western blotting probíhal po dobu 2 hodin při napětí 230 mA. Po ukončení western blottingu byla membrána vyjmuta z kazety a nabarvena v roztoku Ponceau S po dobu 5 minut z důvodu vizualizace proteinů, opláchnuta v destilované vodě a důkladně vysušena na filtračním papíru.

Obarvená membrána po přenosu proteinů byla nejdříve nařezána dle potřeby a proužky opláchnuty v TBS do úplného odbarvení. Proužky byly přeneseny do 5 % mléka s Tweenem a blokovány 1 hodinu na kývačce při laboratorní teplotě. Použitím 5 % mléka došlo k zablokování nespecifických vazeb na membráně v místech, kde nebyly navázány proteiny. Detekce proteinů byla provedena naředěním příslušné primární protilátky (tabulka 1) v 5 % mléku s Tweenem celou noc v lednici. Po ukončení inkubace druhý den byly proužky promývány na kývačce v tomto pořadí: 5 minut v TBS, 5 minut v TBS s Tweenem, 5 minut v TBS a 10 minut v TBS, aby se omyly nenavázané zbytky primární protilátky. Na propláchnutou a osušenou membránu byla nanášena naředěná sekundární protilátka (tabulka 1) obsahující křenovou peroxidázu, která působila 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po ukončení

inkubace byly proužky opět promývány v následujícím pořadí: 10 minut v TBS, 5 minut v TBS s Tweenem, 5 minut v TBS a 10 minut v TBS. Nyní byla provedena detekce chemiluminiscencí za pomoci chemiluminiscenčního činidla luminol-peroxid v poměru 1:1, kdy dochází k reakci substrátu a enzymu, který katalyzuje oxidaci luminolu za vzniku světelného signálu. Světelný signál byl detekován pomocí chemiluminiscenční kamery (Fujifilm, Japonsko) a snímky byly následně analyzovány v programu Image Reader.

Tabulka 2: Chemikálie a jejich množství pro přípravu 10 % dělicího gelu a 5 % zaostřovacího gelu

| Chemikálie | 10 % dělicí gel | Chemikálie | 5 % zaostřovací gel |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | 2 gely | | 2 gely |
| AA+Bis | 3,125 ml | AA+Bis | 840 µl |
| H₂O | 2,67 ml | H₂O | 3,51 ml |
| TRIS pH 8,8 | 3,5 ml | TRIS pH 6,8 | 630 µl |
| SDS 10 % | 94 µl | SDS 10 % | 50 µl |
| TEMED | 6,25 µl | TEMED | 5 µl |
| APS | 37,5 µl | APS | 30µl |

3.2.4 Fluorimetrické stanovení aktivity caspasy 3/7

Podstatou této metody je hydrolyza substrátu 7- amido- 4- metylkumarinu (Ac-DEVD-AMC), jehož produktem je 7- amino- 4- metylkumarin (AMC), který umožňuje kvantifikovat průběh reakci po excitaci zářením (346 nm) a následné emisi fluorescenčního spektra (422 nm).

Vzorky o objemu 5 µl a předem připravené koncentraci 3 µg/µl, byly napipetovány do titrační destičky v triplikátech pod sebou. Do každé jamky v první a druhé řadě bylo přidáno 100 µl reakčního pufru s fluorescenčně značeným peptidovým substrátem (25 mM PIPES/KOH, pH 7,3; 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ a před použitím přidáno 5 mM DTT a 100 µM substrát Ac-DEVD-AMC v DMSO). Do třetí řady byl navíc přidán inhibitor caspas (1 mM Ac-DEVD-CHO v DMSO). Jako blank byl v triplikátu použit caspasový lyzační pufr. Titrační destička byla ponechána na tmavém místě při laboratorní teplotě a první měření bylo provedeno po 1 hodině od aplikace a poté každou další následující hodinu na fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko) při 346/442 nm (ex/em). Data byla analyzována pomocí programu Ascent a Microsoft Excel. Vyhodnocena do grafu byla šestihodinová inkubace.

3.2.5 Průtoková cytometrie – analýza buněčného cyklu

Průtoková cytometrie je metoda analyzující množství buněčné DNA označené vhodnou DNA sondou (např. propidium jodid). Při průchodu buněk označených DNA sondou dochází k excitaci fluorochromu navázané DNA sondy (488 nm) a emisi záření (610 nm) odpovídající množství DNA v buňce. Emise je zachycována detektorem průtokového cytometru.

Vzorky buněk určené k analýze průtokovou cytometrií, uložené v mrazáku při -20 °C, byly centrifugovány při 4 °C a 1000 × G po dobu 8 minut. Supernatant byl odsán vakuovou pumpou a získaný pelet rozpuštěn v 1 ml PBS, které bylo filtrované. Po další centrifugaci, kdy byly dodrženy stejné podmínky, bylo k peletu přidáno 500 µl PBS (obsahuje 0,1 % Tritonu X-100 a 1 % propidium jodidu). Inkubace probíhala 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Vzorky byly aplikovány do vialek a analyzovány průtokovým cytometrem.

4 VÝSLEDKY

Antiproliferační účinky nových derivátů narciklasinu na lidské nádorové buněčné linii HeLa byly zkoumány pomocí tří laboratorních metod. Imunodetekcí byly sledovány hladiny pro- a antiapoptotických proteinů souvisejících s apoptosou. Pro detailní analýzu buněčného cyklu buněčné linie HeLa, po ovlivnění deriváty narciklasinu, byla použita průtoková cytometrie a aktivita caspas byla testována pomocí biochemického testu.

4.1 Western blotting

Metoda Western blotting byla využita na detekci pro- a antiapoptotických proteinů, které hrají důležitou roli při apoptose a souvisí s poškozením DNA. Buněčná linie HeLa odvozená od nádoru děložního hrdla byla po dobu 24 hodin ovlivněna deriváty narciklasinu s označením JJ34, JJ35 a JJ37. Každá z látek byla aplikována ve dvou koncentracích (0,1 μM a 1 μM). Byly porovnány změny hladin exprese proteinů s kontrolními neovlivněnými buňkami, označených jako K a s kontrolními neovlivněnými buňkami s přídatkem DMSO, označených jako K+DMSO (obrázek 9).

Caspasy se nacházejí v buňce jako neaktivní procaspasy, které jsou štěpeny při apoptose na své aktivní fragmenty. Štěpení caspasy 7 (velikost 35 kDa) na aktivní fragment caspasy 7 (velikost 20 kDa) byl pozorován po ovlivnění látkami JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentraci 1 μM . V koncentraci 0,1 μM nebyly pozorovány výrazné změny.

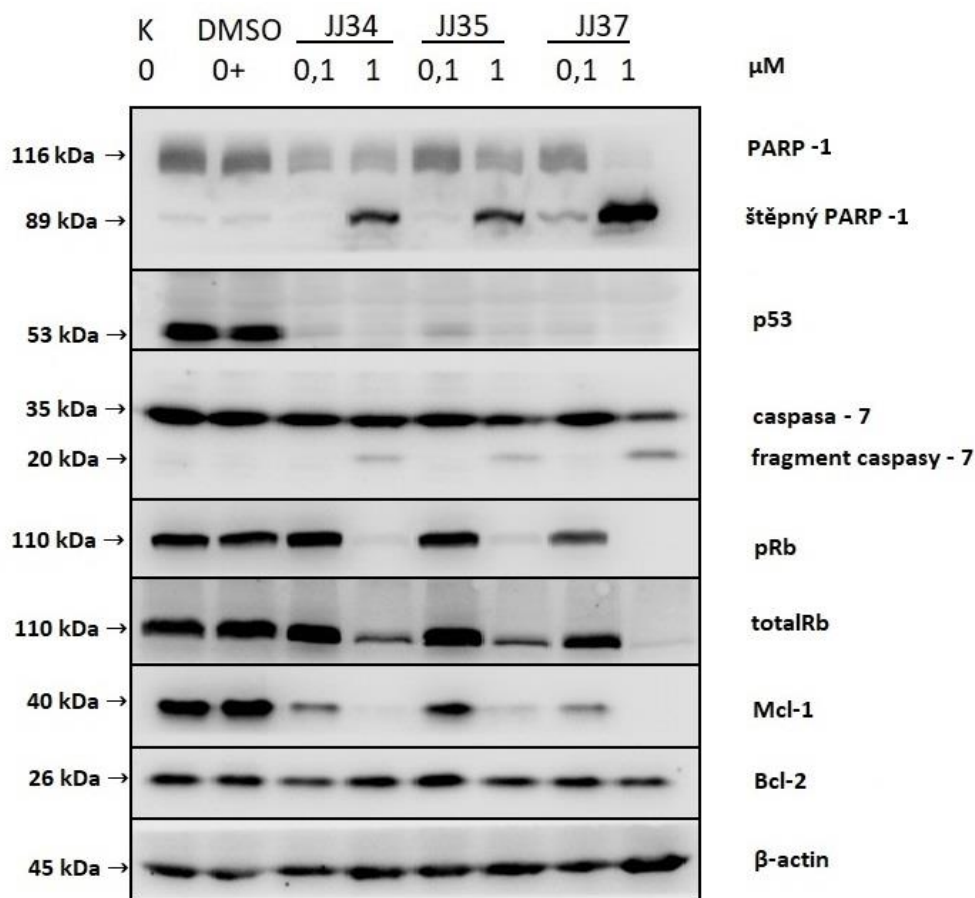
Protein PARP-1 je substrátem pro caspasy. Tím, že byla aktivována caspasa, došlo ke štěpení substrátu PARP-1. Byl detekován fragment proteinu PARP-1 o velikosti 89 kDa, který je důležitým markerem indukce apoptosy. Fragment byl indukován po 24 hodinovém ovlivnění studovanými deriváty JJ34, JJ35 a JJ37 při koncentraci 0,1 μM , ale při koncentraci 1 μM byla hladina exprese exprimována daleko silněji. Nejsilnější hladina exprese proteinu byla pozorována v buňkách ovlivněných látkou JJ37 o koncentraci 1 μM , neboť substrát PARP-1 byl caspasou zcela rozštěpen.

Dále byly detekovány snížené hladiny exprese antiapoptotických proteinů genové rodiny Bcl-2. Genová rodina Bcl-2 má antiapoptotickou funkci a je významným regulátorem vnitřní mitochondriální dráhy apoptosy. Pokud dojde k roztržení mitochondriální membrány, je spuštěna apoptosa. Hladina exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 byla beze změn u všech látek JJ34, JJ35 a JJ37 v obou studovaných koncentracích. Naopak hladina exprese proteinu Mcl-1 klesala se zvyšující se koncentrací studovaných látek JJ34, JJ35 a JJ37. Ke snížené hladině exprese by mohla

příspěť i právě aktivovaná caspasa, poněvadž může štěpit protein Mcl-1 (Snowden et al., 2003).

Protein p53 je nádorový supresor, pro který je typické sjednocovat buněčné odpovědi na stres, hypoxii, poškození DNA a telomer (Slabý et al., 2015). Zvýšená hladina proteinu p53 se nacházela hlavně u kontrolních neovlivněných buněk, což poukazuje na stres buněk při jejich pasážování či následném sklizení.

Funkcí retinoblastomového proteinu je regulace buněčného cyklu. Retinoblastomový protein převažuje v G₀/G₁ fázi ve své nefosforylované formě a pokud dojde k fosforylaci, může buňka vstoupit do S-fáze (Weinberg, 1995; Slabý et al., 2015). Defosforylovaný Rb protein byl pozorován po aplikaci látek JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentraci 1 μM, což poukazuje na fakt, že v případě defosforylace dojde k zablokování buňky, v případě studovaných látek ve fázi S, a aktivují se kontrolní mechanismy ve snaze opravit DNA. Účinek látky byl natolik silný, že byla spuštěna apoptosa. Zároveň byla pozorována i snížená hladina exprese Rb, což je důkaz silné cytotoxicity látek, způsobující rozpad buněk. Po aplikaci látek JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentraci 0,1 μM změna hladiny exprese pRb i Rb proteinu pozorována nebyla.



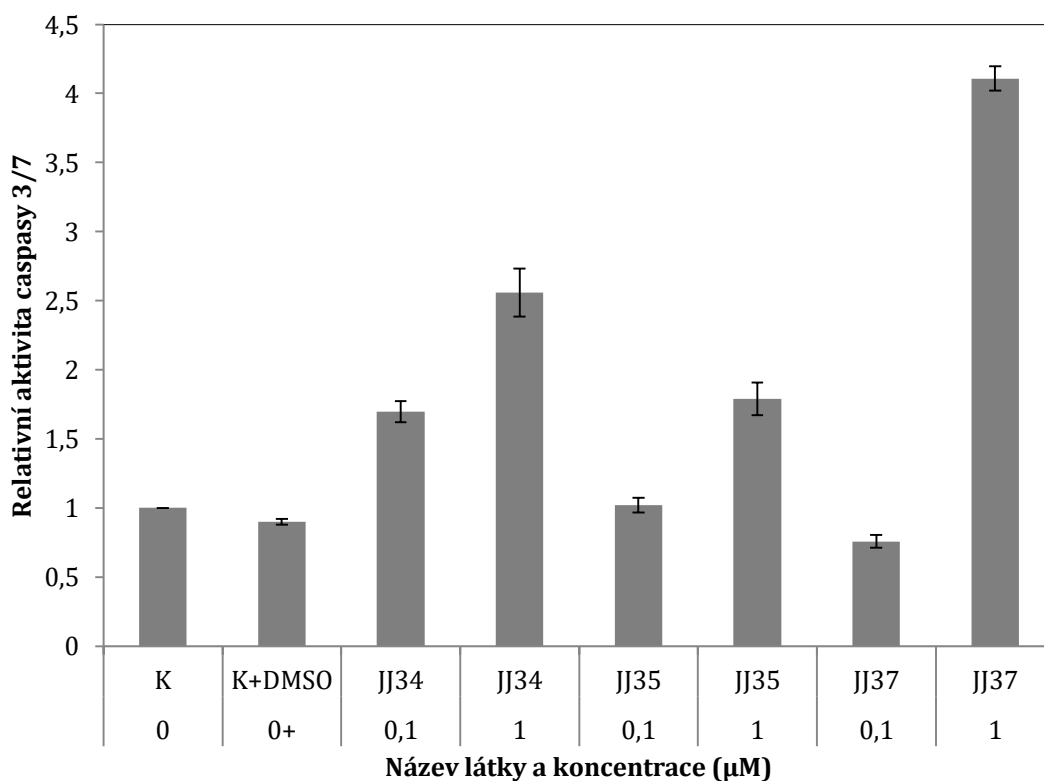
Obrázek 9: Imunodetekce pro- a antiapoptotických proteinů na membráně. Buňky HeLa byly ovlivněny 24 hodin deriváty narciklasinu JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentracích 0,1 μM a 1 μM.

4.2 Biochemický test aktivity caspas

Jedním z charakteristických znaků apoptosy je aktivace caspas, a to štěpením neaktivní procaspasy na aktivní caspasu. Za účelem potvrzení apoptosy u buněk byl proveden biochemický test aktivity caspas. Stanovení aktivity caspas bylo provedeno na vzorku ovlivněných buněk HeLa studovanými látkami JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentraci 0,1 μM a 1 μM po dobu 24 hodin. Byl použit substrát caspas Ac-DEVD-AMC a inhibitor Ac-DEVD-CHO. Ke stanovení aktivity, byl měřen fluorescenční signál vzniklý při štěpení substrátu caspasou 3/7, v intervalu jedné hodiny po dobu 6 hodin. Poslední měření proběhlo po 24 hodinách od prvního měření. Do grafu byla vyhodnocena 6 - ti hodinová inkubace (graf 1). Hodnoty fluorescence byly dány do poměru s hodnotou kontrolního vzorku a převedeny na relativní hodnoty aktivity caspasy.

Z relativních hodnot aktivity caspas byl sestaven graf (graf 1). Z grafu lze pozorovat, že aktivita caspasy 3/7 byla nejvyšší po aplikaci látky JJ37 s koncentrací 1 μM . V porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami, byla aktivita celkově 4,1 krát vyšší. V buňkách HeLa odvozených od nádoru děložního hrdla se po aplikaci látek JJ34 a JJ35 zvyšovala aktivita caspas v obou studovaných koncentracích. Látka JJ34 měla při koncentraci 0,1 μM aktivitu 1,7 krát vyšší a při koncentraci 1 μM byla aktivita vyšší 2,5 krát. Látka JJ35 způsobila při koncentraci 0,1 μM aktivitu 1,1 krát vyšší a ve své vyšší koncentraci (1 μM) byla aktivita vyšší 1,8 krát.

Zvýšená aktivita caspas po aplikaci látek JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentraci 1 μM , koreluje s výsledky z Western blottingu, kdy docházelo ke štěpení proteinu PARP-1 (kap. 4.1; Obrázek 9). Z výsledků vyplývá, že v buňkách byla aktivována caspasa a probíhala apoptosa.



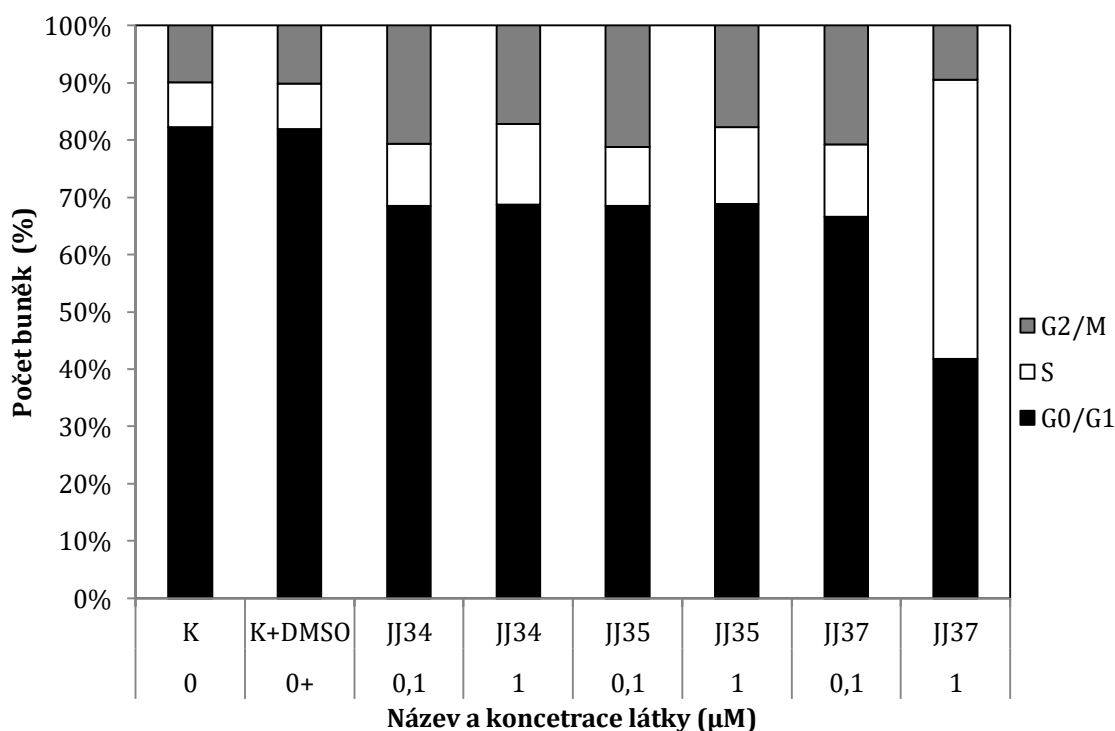
Graf 1: Výsledná relativní aktivita caspasy 3/7, určená pomocí biochemického testu, v buňkách HeLa ovlivněných deriváty narciklasinu po dobu 24 hodin v koncentraci 0,1 μM a 1 μM.

4.3 Průtoková cytometrie (analýza buněčného cyklu)

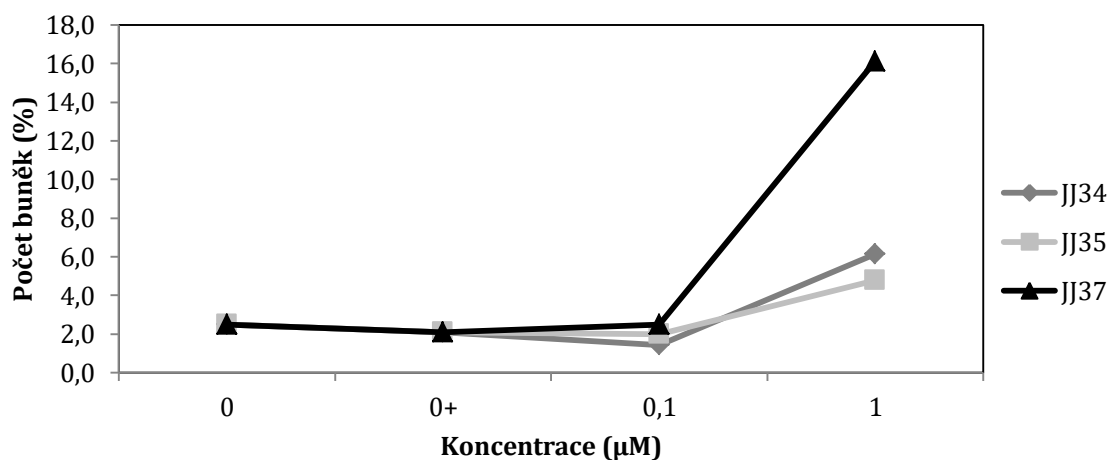
Posledním experimentem, který byl proveden, byla analýza buněčného cyklu. Deriváty narciklasinu JJ34, JJ35 a JJ37 byly aplikovány ve dvou koncentracích (0,1 μM a 1 μM) a ovlivnění buněčné linie HeLa studovanými látkami probíhalo po dobu 24 hodin. Poté byly buňky sklizeny pomocí trypsinizace, byl aplikován propidium jodid za účelem označení DNA a následně byla provedena analýza pomocí průtokového cytometru.

Obsah DNA, získaný měřením pomocí průtokové cytometrie, byl přepočítán na procentuální obsah buněk ve fázích buněčného cyklu. Procentuální obsah byl následně vyhodnocen do grafu, z něhož vyplývá, že vliv studovaných derivátů narciklasinu se lišil obsahem buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (graf 2). Studované deriváty narciklasinu ovlivňují buněčný cyklus snížením počtu buněk ve fázi G₀/G₁ a zvýšením počtu buněk ve fázi S a G₂/M, a zároveň nárůst buněčné populace v subG₁ fázi (graf 2 a 3, obrázek 10). Jestliže je počet buněk v G₀/G₁ fázi snížen, a zvýšen v S fázi, buňky nemůžou vstoupit do další fáze buněčného cyklu a jsou iniciovány kontrolní mechanismy nebo apoptosa. Po aplikaci látky JJ37 v 1 μM koncentraci docházelo k výraznému bloku buněk v S fázi, což je v souladu s výsledky

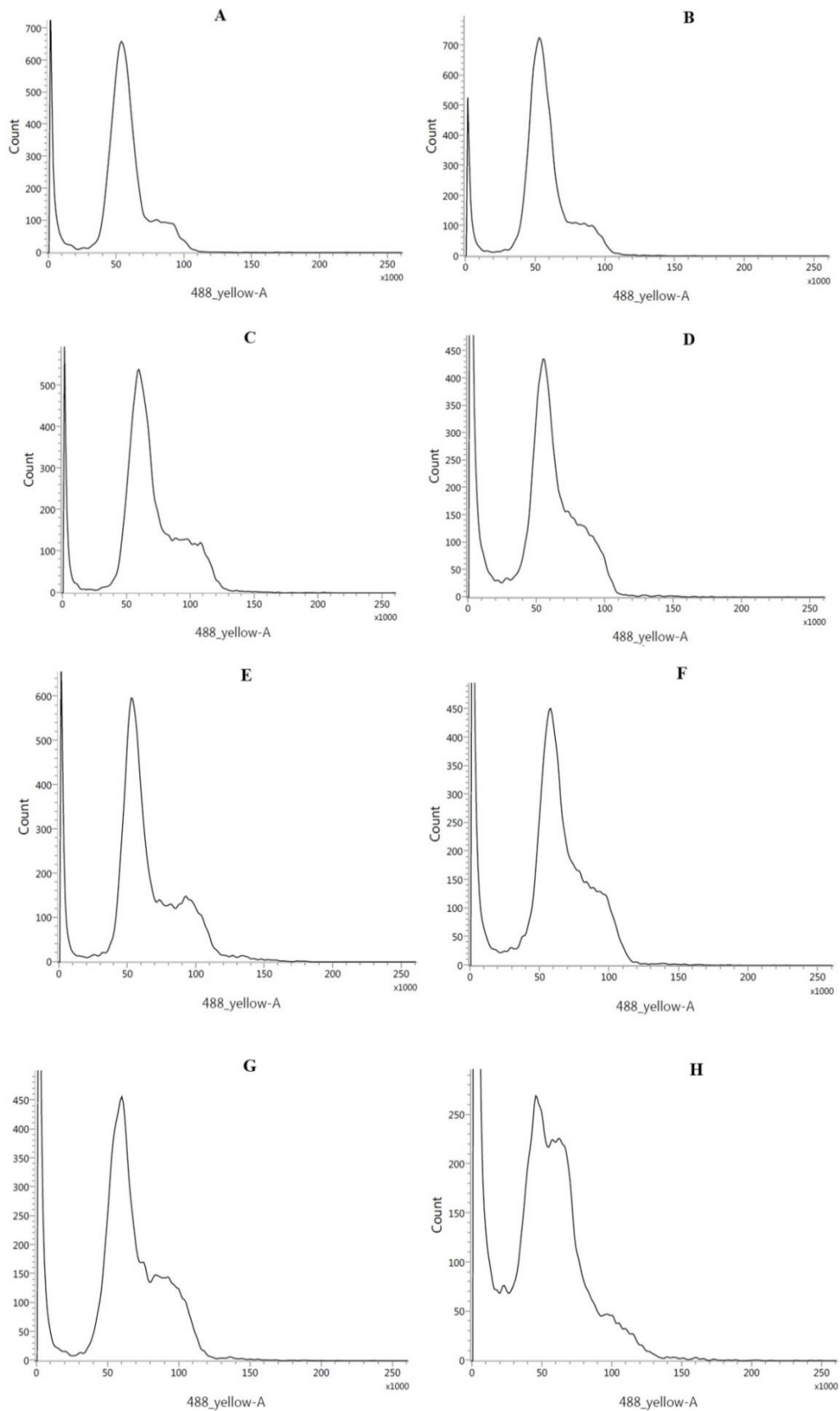
z imunodetekce, jelikož byl defosforylován Rb protein. Z toho vyplývá, že DNA byla v buňce zmnožená, ale buňka nemohla vstoupit do fáze G₂/M a rozdělit se. Počet buněk ve stádiu apoptosy, společně s jejich fragmenty je zaznamenán ve fázi subG₁, kdy nejvyšší procento apoptotických buněk odpovídá látce JJ37 v koncentraci 1 μM (graf 3), z čehož vyplývá, že látka JJ37 v koncentraci 1 μM byla pro buňky příliš toxická. Látkami JJ34 a JJ35, při koncentraci 1 μM, bylo způsobeno zvýšení zastoupení buněk ve fázi S a také při této koncentraci narůstala hodnota fáze subG₁, ovšem ne tolik výrazně jako pro již zmiňovanou látku JJ37 (graf 3).



Graf 2: Procentuální zastoupení buněk cervikálního karcinomu HeLa ve fázích buněčného cyklu (G₀/G₁; S; G₂/M) změřená průtokovým cytometrem. Buněčná linie byla ovlivněna studovanými látkami po dobu 24 hodin (koncentrace 0,1 μM a 1 μM).



Graf 3: Procentuální zastoupení apoptotických buněk a jejich fragmentů v subG₁ fázi buněčného cyklu, změřené průtokovým cytometrem. Ovlivnění buněčné linie HeLa deriváty narciklasinu trvalo 24 hodin.



Obrázek 10: Histogramy z průtokové cytometrie, zobrazující účinek studovaných látek na buněčný cyklus v nádorové buněčné linii HeLa odvozené od lidského cervikálního karcinomu (A - kontrolní buňky; B - kontrolní buňky s DMSO; C – 0,1 μ M JJ34; D – 1 μ M JJ34; E – 0,1 μ M JJ35; F – 1 μ M JJ35; G – 0,1 μ M JJ37; H – 1 μ M JJ37)

5 DISKUZE

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo stanovit antiproliferační účinky nových derivátů narciklasinu na lidskou nádorovou buněčnou linii HeLa odvozenou od nádoru děložního hrdla *in vitro*, metodou western blotting, biochemickým testem aktivity caspas a průtokovou cytometrií. Studovaná koncentrace 0,1 μM a 1 μM byla vybrána na základě cytotoxicity k buněčné linii HeLa. Alkaloidy čeledi amarylkovitých mají široké spektrum farmakologických účinků, jako jsou protinádorové, protizánětlivé, antivirotické, antibakteriální, antifungální, antimalarické a analgetické (Fürst, 2016; He et al., 2015) a proto jsem se v této bakalářské práci zabývala studiem antiproliferační aktivity nových derivátů narciklasinu.

Nejdříve byla provedena imunodetekce, pomocí které byly sledovány hladiny exprese proteinů souvisejících s apoptosou. Apoptosa má dvě signální kaskády: vnější (receptorovou) a vnitřní (mitochondriální; Klener et al., 2010). Iniciační caspasy (8, 9) jsou na začátku aktivační kaskády apoptosy a na konci signální kaskády jsou caspasy efektorové (3, 7; Slabý et al., 2015), které se v buňce vyskytují jako neaktivní zymogeny. Neaktivní zymogeny caspas jsou po jejich aktivaci štěpeny na aktivní fragmenty caspas (Hengartner, 2000). Hladiny exprese caspas byly studovány v buňkách HeLa po ovlivnění studovanými látkami JJ34, JJ35 a JJ37 v koncentracích 0,1 μM a 1 μM po dobu 24 hodin. V experimentu se procaspasa 7 štěpila na aktivní fragment caspasy 7, po aplikaci všech studovaných látek v 1 μM koncentraci. Nejvýraznější štěpení procaspasy 7 bylo po aplikaci látky JJ37 (1 μM), což bylo potvrzeno i biochemickým testem aktivity caspas, který vykazoval aktivitu caspas 3/7, v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami, 4,1 krát vyšší. V práci Dumonta a jeho kolektivu v roce 2007, byl detekován aktivní fragment efektorové caspasy 3, po aplikaci narciklasinu v koncentraci 1 μM . Ovlivnění buněk probíhalo po dobu 16-24 hodin, v buňkách PC-3 odvozených od rakoviny prostaty (Dumont et al., 2007). V mé práci byl pozorován stejný efekt v buňkách HeLa po 24 hodinovém působení látky JJ37 (narciklasin) v 1 μM koncentraci.

Substrátem pro caspasy je poly(ADP-ribose)polymerasa-1. Jelikož byla aktivována caspasa 7, bylo pozorováno štěpení PARP-1. Štěpení PARP-1 probíhalo u všech studovaných látek v jejich vyšší koncentraci v buňkách HeLa. Nejúčinněji působila látka JJ37 o koncentraci 1 μM . Podobný výsledek byl pozorován i ve výzkumu Van Goietsenovenové a jejího kolektivu (2010). Fragment proteinu PARP-1 byl

pozorován v buňkách VM-48 po aplikaci narciklasinu o koncentraci 1 μM a dále v buňkách VM-21 o koncentraci 500 nM. Buňky VM jsou odvozené od kožního melanomu (Van Goietsenoven et al., 2010). Štěpení fragmentu PARP-1 bylo pozorováno i v buňkách HeLa, které byly 24 hodin ovlivněny alkaloidem distichaminem o koncentraci 10 a 20 μM (Nair et al., 2014).

Mezi významné regulátory apoptosy patří antiapoptotické a proapoptotické proteiny z genové rodiny Bcl-2, které slouží jako inhibitory a promotory apoptosy. V mé práci byl detekován vliv studovaných látek na proteiny Bcl-2 a Mcl-1. Hladina exprese proteinu Bcl-2 nebyla změněna, ale hladina exprese proteinu Mcl-1 klesala se zvyšující se koncentrací všech studovaných látek. Snížení Mcl-1 může kooperovat s aktivovanou caspasou, neboť ta jej může štěpit (Snowden et al., 2003). V práci Lia a jeho týmu (2009) bylo pozorováno snížení proteinu Mcl-1 po aplikaci lykorinu v koncentraci 5 a 10 μM po 24 hodinách ovlivnění buněk myeloidní leukémie (K562) lykorinem. V této práci byly taktéž pozorovány aktivní efektorové caspasy 3 a 7, a zároveň i štěpení PARP (Liu et al., 2009). Můžeme tedy předpokládat, že narciklasin a lykorin mají stejný mechanismus účinku. Studované látky byly ovšem účinnější než lykorin, jelikož výše popsané výsledky byly pozorovány po aplikaci nižších koncentrací.

Nefosforylovaný retinoblastomový protein reguluje G_0/G_1 fázi a v případě fosforylace proteinu Rb buňka vstoupí do fáze S (Weinberg, 1995; Goodrich et al., 1991; Slabý et al., 2015). Pomocí imunodetekce byl pozorován defosforylovaný Rb protein po působení všech studovaných látek (JJ34, JJ35 a JJ37) v jejich vyšší koncentraci (1 μM). Studované látky byly natolik účinné, že způsobily defosforylaci Rb proteinu, což znamená, že buněčný cyklus nebyl poté správně regulován. Nebylo tedy zastaveno dělení buněk ve fázi G_0/G_1 , naopak došlo ke snížení počtu buněk v této fázi, ale zvýšení buněk ve fázi S, na což poukazují i výsledky z průtokové cytometrie (kap. 4.3).

Pomocí biochemického testu aktivity caspas, byla stanovena aktivita caspas 3/7. Stanovení aktivity caspas bylo provedeno za účelem potvrzení apoptosy, neboť aktivace caspas je specifickým krokem apoptosy. Test aktivity caspas vyšel v souladu s imunodetekcí (kap. 4.1; obrázek 9). Nejúčinnější látkou, způsobující aktivitu caspas, byla látka JJ37 v koncentraci 1 μM . Aktivita caspasy byla porovnána s kontrolními neovlivněnými buňkami, z čehož vyplynulo, že po ovlivnění je aktivita vyšší 4,1 krát. Nair se svým kolektivem (2014) popisuje ve své práci experiment s distichaminem,

který způsobil aktivitu caspas v buňkách HeLa v 10 i 20 μM koncentraci (24 hodin). V případě 10 μM koncentrace byla aktivita 1,5 krát vyšší a v případě 20 μM koncentrace byla aktivita vyšší 3 krát (Nair et al., 2014). Látky studované v této práci jsou vytvořené právě Nairem a v porovnání s výsledky aktivity caspas po ovlivnění distichaminem, byly studované látky účinnější než distichamin.

Jako poslední, byl studován buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie. Po 24 hodinovém působení látek JJ34, JJ35 a JJ37 bylo pozorováno různé procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. S rostoucí koncentrací studovaných látek bylo zvýšeno procentuální zastoupení buněk ve fázích S a G_2/M , naopak ve fázi G_0/G_1 došlo ke snížení počtu buněk. Nejvyšší účinek měla látka JJ37 v koncentraci 1 μM (graf 2). Pro srovnání, stejný efekt byl pozorován v buňkách GL19 odvozených od nádoru mozku, po aplikaci narciklasinu o koncentraci 100 nM, nejvýrazněji po 72 hodinové aplikaci (Lefranc et al., 2009). Narciklasin (JJ37) byl v mé práci testován ve stejné koncentraci po kratší dobu (24h), ale výsledek koreluje s Lefrancem (2009), jelikož v obou případech došlo ke zvýšení počtu buněk ve fázi S. Pankratistatinové deriváty, které mají stejnou fenanthridonovou kostru jako narciklasin, vykazují taktéž vliv na buněčný cyklus. Progrese buněčného cyklu do ovlivnění pankratistatinových derivátů byla studována v buňkách fibroblastů embryí krys (3Y1) a v buňkách promyelocytární leukémie (HL-60RG). Na základě zmíněného výzkumu je naznačeno, že alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* blokují buněčný cyklus na úrovni fází G_0/G_1 a S (Mutsuga et al., 2002). Vliv na buněčný cyklus byl zkoumán u distichaminu, po jeho aplikaci na buňky lymfoblastické leukémie (CEM) v koncentraci 20 μM na dobu 24 hodin, došlo ke zvýšení počtu buněk ve fázi G_2/M a $subG_1$ a snížení počtu buněk ve fázi G_0/G_1 a S. Snížení buněk ve fázi S je v souladu s výsledkem Mutsugy (2002). Bylo stanoveno, že distichamin narušuje buněčný cyklus a indukuje apoptosu v buňkách CEM (Nair et al., 2012), z čehož vyplývá, že u narciklasinu nefunguje podobný mechanismus účinku na buněčný cyklus.

Nové deriváty narciklasinu (JJ34 a JJ35) substituované v poloze 2, 3, 4 a 7, byly na základě tří experimentů vyhodnoceny v porovnání s látkou JJ37, představující narciklasin, jako podobně biologicky aktivní. Nevýhodou je stejná cytotoxicita jako u narciklasinu vůči normálním kožním buňkám. Bylo by vhodné hledat nové deriváty narciklasinu, které budou mít podobnou účinnost v nádorových buňkách, ale zároveň nebudou toxické vůči buňkám normálním.

V současné době je narciklasin zkoumán spíše pro jeho protizánětlivé účinky. V nejnovější publikované práci Rárové a kolektivu (2019) byl zkoumán extrakt z cibulek rostliny *Cyrtanthus contractus*, a bylo zjištěno, že aktivní složkou extraktu je právě narciklasin. Extrakt z *C. contractus* působil protizánětlivě po 24 hodinách v nanomolárních koncentracích (Rárová et al., 2019).

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly studovány antiproliferační účinky nových derivátů narciklasinu na nádorové buněčné linii HeLa odvozené od lidského cervikálního karcinomu *in vitro*. Studovaná série látek z označením JJ34, JJ35 byla založena na struktuře narciklasinu, ale deriváty se od sebe lišily modifikací poloh 2, 3, 4 a 7. Látka s označením JJ37 je narciklasin. Na základě cytotoxicity látek, byla zvolena studovaná koncentrace 0,1 μM a 1 μM , která byla aplikována po dobu 24 hodin.

Experimentální část byla provedena pomocí tří laboratorních metod, za účelem zjištění antiproliferačních účinků derivátů narciklasinu na nádorovou buněčnou linii HeLa. Z výsledků je patrné, že antiproliferační aktivita u nových modifikovaných derivátů narciklasinu, je podobná jako pro samotný narciklasin. Po působení látky JJ37 o koncentraci 1 μM , byla pomocí imunodetekce pozorována aktivní caspasa 7, což bylo následně i potvrzeno další experimentální metodou, a to biochemických testem aktivity caspas. Aktivita caspasy byla, v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami, 4,1 krát vyšší. Posledním provedeným experimentem byla průtoková cytometrie. Studované látky zapříčinily vyšší zastoupení buněk ve fázi subG₁, S a G₂/M, a naopak snížené množství buněk fázi G₀/G₁. Nejsilněji působila látka JJ37 nárůstem počtu buněk v subG₁ fázi a výrazným blokem buněk ve fázi S.

Výsledky mohou posloužit pro studium nových modifikací narciklasinu, tedy vytvoření jeho dalších derivátů, za účelem zvýšení antiproliferační aktivity, ale zároveň snížení jejich toxicity pro normální lidské buňky. Protizánětlivá aktivita narciklasinu je zajímavá, a do budoucna představuje pro vědecký výzkum slibnou perspektivu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Akgul C., Moulding D. A., White M. R. H., Edwards S. W. In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Letters*. 2000, **478**(1-2), 72-76.

Andrade de J. P., Guo Y., Font-Bardia M., Calvet T., Dutilh J., Viladomat F., Codina C., Nair J. J., Zuanazzi J. A. S., Bastida J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*. 2014, **103**, 188-195.

Arbour N., Vanderluit J. L., Le Grand J. N., Jahani-Asl A., Ruzhynsky V. A. Cheung E. C. C., Kelly M. A., MacKenzie A. E., Park D. S., Opferman J. T., Slack R. S. Mcl-1 Is a Key Regulator of Apoptosis during CNS Development and after DNA Damage. *Journal of Neuroscience*. 2008, **28**(24), 6068-6078.

Arrigoni O., Liso R. A., Calabrese G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature*. 1975, **256**(5517), 513-514.

Bastida J., Berkov S., Torras L., Belén P. N., Andrade de JP, Martínez V., Codina C., Viladomat F. Chemical and biological aspects of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011, 65-100. ISBN: 978-81-7895-528-5.

Bosch F. X., Lorincz A., Muñoz N., Meijer C. J. L., Shah K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer *Journal of Clinical Pathology*. 2002, **55**, 244-265.

Bosch F. X., Manos M. M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M. H., Moreno V., Kurman R., Shah K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995, **87**(11), 796-802.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018, **68**(6), 394-424.

Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008, **110**(3), S4-S7.

Cedron J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A. Preparation and antimalarial activity of semisynthetic lycorenine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, **63**, 722-730.

Cerioti G. Narciclasine: an Antimitotic Substance from *Narcissus* Bulbs. *Nature*. 1967, **213**(5076), 595-596.

Cohen G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997, **326** (1), 1-16.

Crosbie E. J, Einstein M. H., Franceschi S., Kintchener H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2013, **382**(9895), 889-899.

Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy*. 2013, **107**, 701-708.

Dulaney C., Marcrom S., Stanley J., Yang E. S. Poly(ADP-ribose) polymerase activity and inhibition in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2017, **63**, 144-153.

Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Darro F., Lefranc F., Kiss R. The *Amaryllidaceae* Isocarbostryl Narciclasine Induces Apoptosis By Activation of the Death Receptor and/or Mitochondrial Pathways in Cancer Cells But Not in Normal Fibroblasts. *Neoplasia*. 2007, **9**(9), 766-776.

Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R.. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. [cit. 2019-3-26] Dostupné z WWW: <http://www.svod.cz>.

Evidente A., Kireev A., Jenkins A., Romero A., Steelant W., Slambrouck Van S., Kornienko A.. Biological Evaluation of Structurally Diverse *Amaryllidaceae* Alkaloids and their Synthetic Derivatives: Discovery of Novel Leads for Anticancer Drug Design. *Planta Medica*. 2009, **75**(05), 501-507.

Fuchs S., Hsieh L. T., Saarberg W., Eedelmeier C. A. J., Thomas A. Wichelhaus, Schaefer L., Koch E., Fürst R. *Haemanthus coccineus* extract and its main bioactive component narciclasine display profound anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015, **19**(5), 1021-1032.

Fürst R. Narciclasine – an *Amaryllidaceae* Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica*. 2016, **82**(16), 1389-1394.

Furusawa E., Furusawa S., Lee J. Y. B., Patanavanich S. Therapeutic Activity of Pretazettine, a *Narcissus* Alkaloid on Rauscher Leukemia: Comparison with Tazettine and Streptonigrin. *Experimental Biology and Medicine*. 1976, **152**(2), 186-191.

Ghobrial I. M., Witzig T. E., Adjel A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2005, **55**(3), 178-194.

Giacinti C., Giordani A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006, **25**(38), 5220-5227.

Goodrich W. D., Wang P. N., Qian Y., Lee E., Lee W. The Retinoblastoma Gene Product Regulates Progression through the G₁ phase of the Cell Cycle. *Cell Press*. 1991, (67), 293-302.

He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X. Biological and pharmacological activities of *Amaryllidaceae* alkaloids. *RSC Advances*. 2015, **5**(21), 16562-16574.

- Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000, **407**,770-776.
- Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D. Antiproliferative *Amaryllidaceae* Alkaloids Isolated from the Bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis × festalis*. *Planta Medica*. 2001, **68**(5), 454-457.
- Hu M., Peng S., He Y., Qin M., Cong X., Xing Y., Liu M., Yi Z. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget*. 2015, **6**(17), 15348-15361.
- Hu Y., Na X., Li J., et al. Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in *Arabidopsis* roots. *Planta*. 2015, **242**(6), 1349-1360.
- Jenkins D. Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer. *Disease Markers*. 2007, **23**(4), 199-212.
- Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells comparative effects of some *Amaryllidaceae* alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1976, (425), 342-348.
- Jin Z., Yao G. *Amaryllidaceae* and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*. 2019, **33**, 1318–1343.
- Juven-Gershon T., Oren M. Mdm2: The Ups and Downs. *Molecular Medicine*. 1999, (5), 71-83.
- Klener P., Klener P. jr. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
- Ko L. J., Prives C. P53: puzzle and paradigm. *Genes & Development*. 1996, **10**(9), 1054-1072.

Kolář Z. Molekulární patologie nádorů. Olomouc: Epava, 2003, 168 s. ISBN 80-862-9715-2.

Kornienko A., Evidente A. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. *Chemical Reviews*. 2008, **108**(6), 1982-2014.

Langelier M-F., Planck J. L., Roy S., Pascal J. M. Crystal Structures of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(12), 10690-10701.

Lavrik I. N., Golks A., Krammer P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(10), 2665-2672.

Lefranc F., Sauvage S., Van Goietsenoven G., Megalizzi V., Lamoral-Theys D., Debeir O., Spiegl-Kreinecker S., Berger W., Mathieu V., Decaestecker C., Kiss R. Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009, **8**(7), 1739-1750

Lipinski M. M., Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*. 1999, (18), 7873-7882.

Liu H., Eksarko P., Temkin V., Haines G. K., Perlman H., Koch A. E., Thimmapaya B., Pope R. M. Mcl-1 Is Essential for the Survival of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*. 2005, **175**(12), 8337-8345.

Liu X., Jiang J., Jiao X., Wu Y., Lin J., Cai Y. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters*. 2009, **274**(1), 16-24.

Mikami M., Kitahara M., Kitano M., Ariki Y., Mimaki Y., Sashida Y., Masatoshi Yamazaki M., Yui S. Suppressive Activity of Lycoricidinol (Narciclasine) against Cytotoxicity of Neutrophil-Derived Calprotectin, and Its Suppressive Effect on Rat Adjuvant Arthritis Model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1999, **22**(7), 674-678.

Miyasaka K., Hiramatsu Y. Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: II. Effects of blood pressure in rats and dogs and the mechanism of tachyphylaxis to the vasodepressor action of lycorenine in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1980, (30), 655-664.

McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type *Amaryllidaceae* alkaloids. *Phytochemistry*. 2007, **68**(7), 1068-1074.

Muñoz N., Bosch F. X., Sanjosé de S., Herrero R., Castellsagué X, Shah K. V., Snijders J. F. P., Meijer J. L. M. Ch. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003, **348**(6), 518-527.

Mutsuga M., Kojima K., Yamashita M., Ohno T., Ogihara Y., Inoue M. Inhibition of cell cycle progression through specific phase by pancratistatin derivatives. *Biol-Pharm-Bull*. 2002, **25**(2), 223-228.

Nair J. J., Rárová L., Strnad M., Bastida J., Cheesman L., Staden van J. Crinine Alkaloids of the *Amaryllidaceae* with Cytotoxic Effects in Human Cervical Adenocarcinoma (HeLa) Cells. *Natural Product Communications*. 2014, **9**(4), 461-466.

Nair J. J., Rárová L., Strnad M., Bastida J., Staden van J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family *Amaryllidaceae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012, **22**(19), 6195-6199.

Novotný J., Vitek P., Kleibl Z. et al. Onkologie v klinické praxi: standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů. 2. vydání. Praha: Mladá fronta, 2016. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3944-4.

Opferman J. T., Iwasaki H., Ong Ch. C., Suh H., Mizuno S., Akashi K. Obligate Role of Anti-Apoptotic MCL-1 in the Survival of Hematopoietic Stem Cells. *Science*. 2005, **307**(5712), 1101-1104.

Opferman J. T., Letai A., Beard C., Sorcinelli M. D., Ong Ch. C. a Korsmeyer S. J. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL 1. *Nature*. 2003, **426**(6967), 671-676.

Oren M., Rotter V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, **2**(2), 1-15.

Pellegrino S., Meyer M., Zorbas Ch., Bouchta S. A., Saraf K., Pelly S. C., Yusupova G., Evidente A., Mathieu V., Kornienko A., Lafontaine D. L. J., Yusupov M. The *Amaryllidaceae* Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure*. 2018, **26**(3), 416-425.

Plummer R. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) Inhibitors: From Bench to Bedside. *Clinical Oncology*. 2014, **26**(5), 250-256.

Rárová L., Ncube B., Van Staden J., Fürst R., Strnad M., Gruz J. Identification of Narciclasine as an in Vitro Anti-Inflammatory Component of *Cyrtanthus contractus* by Correlation-Based Metabolomics. *Journal of Natural Products*. 2019, doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00973. [Epub ahead of print]

Riddle J. M. Ancient and Medieval Chemotherapy for Cancer. *Isis*. 1985, **76**(3), 319-330.

Riedl S. J., Fuentes-Prior P., Renatus M., Kairies N., Krapp S., Huber R., Salvesen G. S., Bode W. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(26), 14790-14795.

Rosypal S. Nový přehled biologie. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-718-3268-5.

Roura E., Castellsagué X, Pawlita M., et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer*. 2014, **135**(2), 453-466.

Samuelsson G., Bohlin L. Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy. 7th revised edition. Stockholm: Apotekarsocieteten, 2015. ISBN 978-91-980942-5-1.

Schiffman M., Castle P. E., Jeronimo J., Rodriguez A. C., Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007, (370), 890-907.

Slabý O. et al. Molekulární medicína. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.

Snowden R. T., Sun X. M., Dyer M. J. S., Cohen G. M. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia*. 2003, **17**(10), 1981-1989.

Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006, **24**, S16-S22.

Van Goietsenoven G., Hutton J, Becker J-P., Lallemand B., Robert F., Pirker Ch., Vandebussche G., Van Antwerpen P., Evidente A, Berger W., Prévost M., Pelletier J., Kiss R., Goss Kinzy T., Kornienko A., Mathieu V. Targeting of eEF1A with *Amaryllidaceae* isocarboxtyrils as a strategy to combat melanomas. *The FASEB Journal*. 2010, **24**(11), 4575-4584.

Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosc, F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., Meijer C. J., Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*. 1999, **189**, 12-19.

Wang Ch., Wang Q., Li X., et al. Lycorine induces apoptosis of bladder cancer T24 cells by inhibiting phospho-Akt and activating the intrinsic apoptotic cascade. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, **483**(1), 197-202.

Wang Z., Watt W., Brooks N. A., et al. Kinetic and structural characterization of caspase-3 and caspase-8 inhibition by a novel class of irreversible inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010, **1804**(9), 1817-1831.

Weinberg R. A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell Press*. 1995, (81), 323-330.

Yu H., Qiu Y., Pang X., et al. Lycorine Promotes Autophagy and Apoptosis via TCRP1/Akt/mTOR Axis Inactivation in Human Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017, **16**(12), 2711-2723.

Zhang D., Li F., Weidner D., Mnjoyan Z. H., Fujise K. Physical and Functional Interaction between Myeloid Cell Leukemia 1 Protein (MCL1) and Fortilin. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(40), 37430-37438.