

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Martina Jakoubková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv deprivace iontů železa na buněčný cyklus
myších embryonálních kmenových buněk**

Bakalářská práce

Martina Jakoubková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: RNDr. Leona Rašková Kafková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Leony Raškové Kafkové, Ph.D. za použití citovaných zdrojů literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Leoně Raškové Kafkové, Ph.D za odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu biologie Lékařské fakulty UP v Olomouci za jejich ochotu a pomoc při práci.

Souhrn

Embryonální kmenové buňky jsou přirozeně immortalizované pluripotentní buňky odvozené z raného embrya - blastocysty. Jsou charakteristické svou sebeobnovou, diferenciační schopností, odlišnou regulací buněčného cyklu a odpovědí na poškození DNA.

V této bakalářské práci je popsáno řízení buněčného cyklu embryonálních kmenových buněk ve srovnání s regulací buněčného cyklu somatických buněk. Dále je zde popsán metabolismus železa a signální dráhy buněčného cyklu, které jsou deprivací iontů železa ovlivněny.

Experimentální část této práce se zaměřuje na změny buněčného cyklu a aktivaci signálních drah myších embryonálních kmenových buněk v přítomnosti netoxických koncentrací chelatačního činidla desferioxaminu ve srovnání se somatickými buňkami.

Výsledky experimentů poukázaly na to, že u embryonálních kmenových buněk nedochází k zastavení buněčného cyklu v přítomnosti deferioxaminu, tak jak bylo popsáno u fibroblastů.

Summary

Embryonic stem (ES) cells are naturally immortalized pluripotent cells derived from early stage of mammalian blastocyst. ES cells are characterized by unique self-renewal and differentiation abilities, as well as by special features of cell cycle regulation and DNA damage response.

My bachelor thesis are focused on description of cell cycle of embryonic stem cells and its comparison with cell cycle of somatic cell. Further my thesis pay attention to the iron metabolism and cell cycle signaling pathways that are affected by deprivation of iron ions.

The experimental part of my work focuses on changes of cell cycle proliferation and activation of checkpoint signaling pathways in the presence of non-toxic concentrations of chelating agent desferioxamine mesylate in mouse embryonic stem cells, and their comparison with somatic cells.

Here we show that mouse embryonic stem cells do not stop cell cycle progression under deferoxamin mesylate, as was seen in somatic cells.

Obsah

1. Úvod	9
2. Současný stav řešené problematiky	10
2.1. Charakteristika embryonálních kmenových buněk	10
2.1.1. Charakteristika pluripotentních buněk	10
2.1.2. Kultivace myších embryonálních kmenových buněk	10
2.1.3. Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk	11
2.1.3.1. Etika kultivace lidských embryonálních kmenových buněk	11
2.2. Buněčný cyklus	12
2.2.1. Buněčný cyklus somatických buněk	12
2.2.1.1. G1/S fáze – Restrikční, omezující bod	12
2.2.1.2. S fáze	14
2.2.1.3. G2/M	14
2.2.1.4. M fáze	14
2.2.2. buněčný cyklus za stresových podmínek	15
2.2.2.1. Typy poškození DNA	15
2.2.2.2. Odpověď na poškození DNA v G1/S přechodu	16
2.2.2.3. Odpověď na poškození DNA v S fázi	17
2.2.2.4. Odpověď na poškození v G2	18
2.2.3. Buněčný cyklus kmenových buněk	18
2.3. Metabolismus železa	19
2.4. Vliv deprivace iontů železa na aktivaci signálních drah buněčného cyklu	21
2.4.1. Ribonukleotid reduktáza	21
2.4.2. Cykliny a cyklin dependentní kinázy	21
2.4.3. p53	22
2.4.4. p21	22
2.4.5. p27	23
2.4.6. GDDA	23
2.4.7. p38	24
2.4.8. HIF-1 α	24
2.4.9. NdrG-1	24
2.4.10. CDC14A	25

2.4.11. Apoptóza	25
3. Cíle práce	26
4. Materiál	27
4.1 Biologický materiál	27
4.2 Chemikálie	27
4.3. Roztoky	28
4.4. Přístroje	28
5. Metody	30
5.1. Kultivace kmenových buněk	30
5.2. Fixace buněk	30
5.3. Průtoková cytometrie	30
5.4. Western blot	31
5.4.1 Měření koncentrace protein metodou Bradfordové	31
5.4.2. Akrylamidová elektroforéza	32
5.4.3. Western blot	34
5.5. Imunofluorescence	35
6. Výsledky	37
6.1. Změny buněčného cyklu u mEK buněk a myších embronálních fibroblastů	37
6.2. Ověření aktivace kontrolních signálních drah u mEK buněk a myších embronálních fibroblastů	38
6.3. Loklaizace protein buněčného cyklu	39
7. Diskuze	40
8. Výsledky	42
9. Literatura	43
10. Seznam použitých zkratk	52

1. Úvod

Pluripotentní buňky vnitřní masy embryonálního stádia blastocysty jsou vzájemně rovnocenné a diferencují do tří zárodečných vrstev: ektodermu, mezodermu a endodermu. Jsou-li tyto buňky vpraveny do mimoděložních míst imunodeficientních myši, způsobují vznik benigních nebo maligních tumorů. Rakovinné buňky vykazují vlastnosti podobné embryonálním kmenovým buňkám. Tyto vlastnosti zahrnují neomezenou proliferační kapacitu, klonální proliferace, nevykazují kontaktní inhibici a nejsou závislé na kontaktu s ostatními buňkami (Anna M. a kol., 2005) Charakteristikou buněčného cyklu kmenových buněk je zkrácená G1 a G2 fáze. Dochází tak k rychlé proliferaci buněk. Příčinou je odlišná exprese molekul řídících buněčný cyklus. Klíčovou jednotkou jsou cyklin-dependentní kinázy. Tyto enzymy jsou aktivované navázáním regulační podjednotky cyklinu. V případě diferenciovaných buněk jsou hladiny cyklinů v průběhu buněčného cyklu exprimovány v překrývajících se vlnách. U kmenových buněk probíhá exprese konstantně a hladina se nesnižuje.

Ionty železa jsou esenciálním prvkem živých soustav. Jejich hladina ovlivňuje průběh buněčného cyklu. Příkladem je enzym ribonukleotid reduktáza, která jako kofaktor obsahuje právě Fe^{2+} . Rakovinné buňky díky rychlé proliferaci produkují větší množství ribonukleotid reduktázy a vyžadují tak mnohem vyšší hladiny železa než zdravé buňky. To je dělá citlivějšími vůči chelatačním činidlům, které pak zastavují růst nádoru. Proto se chelatační činidla jeví jako potenciální terapeutika pro léčbu rakoviny (Yu Yu a kol., 2007).

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Charakteristika embryonálních kmenových buněk

Embryonální kmenové buňky (EK) jsou charakteristické svojí schopností diferencovat do všech typů buněk dospělého organismu. Pouze prvních 8 buněk zygoty vzniklých dělením oplozeného vajíčka je schopných tvořit veškeré tkáně živého organismu včetně extraembryonálních tkání. Tyto buňky se nazývají totipotentní. Totipotentní buňky vznikají symetrickým dělením buněk mateřských. Po vytvoření zárodečné vrstvy probíhá dělení asymetricky (Sherly J.L., 2002).. Výsledkem asymetrického dělení jsou dvě dceřiné buňky, z nichž jedna zůstává svými vlastnostmi identická mateřské, zatímco druhá získává odlišné vlastnosti a začíná podstupovat proces determinace. Asymetrické dělení vede k diferenciaci a determinaci buněk (progenitorové buňky) (Munro E. a kol., 2004).

2.1.1. Charakteristika pluripotentních buněk

Pluripotentní buňky mají neomezený počet buněčných cyklů. S nástupem diferenciací se tato vlastnost ztrácí a u somatických buněk je počet buněčných cyklů dán délkou telomer. U pluripotentních buněk jsou telomery prodlužovány vysokou aktivitou telomeráz (Marión R.M. a kol. 2010)

2.1.2. Kultivace myších embryonálních kmenových buněk

Izolované myší embryonální kmenové (mEK) buňky kultivované in vitro ztrácí svojí schopnost pluripotence a začínají spontánně diferencovat do struktur podobných embryonálnímu tělísku. Za určitých podmínek lze této diferenciaci zabránit a udržet je v jejich nediferencovaném stavu. Tyto podmínky se liší pro různé druhy organismů, ze kterých byly tyto linie kmenových buněk odvozeny.

U mEK buněk je nezbytný leukemický inhibiční faktor (LIF). Izolované myší embryonální kmenové buňky je možné kultivovat buď v přítomnosti inaktivovaných

myších embryonálních fibroblastů (feeder cells) sekretujících látky včetně LIF udržující kmenové buňky nebo za přidání LIF do kultivačního média (Vaghefi S. H. E. a kol., 2009). Myší embryonální fibroblasty se získávají ze 16-ti dnů starého embrya. Aby nedocházelo k množení fibroblastů při kultivaci s kmenovými buňkami, musí být inaktivovány působením mitomycinu C (Suemori H. a kol., 1987). Druhou možností je kultivace buněk za přítomnosti LIF přidaného do média v kultivačních miskách potažených kolagenem. LIF patří mezi cytokininy a řadí se do skupiny interleukinů-6 (IL-6). Receptor pro tento cytokinin se skládá z jedné podjednotky gp130 společně pro všechny IL-6 a druhé LIFR β (gp190), jenž je specifická pouze pro LIF. Navázáním LIF na receptor dojde k fosforylaci transkripčního faktoru STAT3 a jeho translokaci do jádra. Spuštěním této signální dráhy je udržována pluripotence myších embryonálních kmenových buněk a inhibována diferenciací (L. Dahéron a kol., 2004).

2.1.3. Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk

Lidské EK buňky se od myších liší v mnoha biologických aspektech. Jedním z nich je způsob udržení těchto buněk v jejich nediferenciovaném stavu. LIF důležitý k udržení pluripotence u myši nemá vliv na udržení pluripotence u lidských kmenových buněk. Proto také lidské kmenové buňky vyžadují odlišné podmínky pro kultivaci, aby byla udržena jejich charakteristická vlastnost (Humphrey R. K. a kol., 2004). Lidské kmenové buňky vyžadují pro udržení pluripotence přítomnost myších embryonálních fibroblastů, přesněji řečeno látek, které fibroblasty sekretují (Lagarkova M. A. a kol., 2010).

2.1.3.1. Etika kultivace lidských embryonálních kmenových buněk

Co se týče použití lidských kmenových buněk ve výzkumu, toto téma je morálně i politicky sporné. Příprava lidských embryonálních kmenových linií zahrnuje zničení embrya. Pro lidi věřící, že lidský život by neměl být zahuben, je toto eticky nepřijatelné. Druhou stránkou je však fakt, že výzkum kmenových buněk může pomoci v léčbě prozatím nevléčitelných nemocí. Každá země výzkum kmenových buněk reguluje jinak. Liší se vnímání morálního statutu embrya. Existuje názor, že embryo má plný morální status a pohlíží se tudíž na něj jako na potenciálního člověka, ačkoli vlastnosti člověka

zatím nemá. Protiargument se pak opírá o tezi, že embryo nemá žádné psychické, emoční ani fyzické schopnosti. Bere se pouze jako organická hmota, část člověka, dokud se nevyvine tak, aby byla schopná samostatně přežít. Jiné názory na tuto problematiku berou v úvahu vývojové stádium embrya. Důležitým aspektem ovlivňujícím pohled na věc je i odlišnost náboženských kultur. V České republice je výzkum na lidských embryonálních kmenových buňkách povolen (www.eurostemcell.org).

2.2. Buněčný cyklus

2.2.1. Buněčný cyklus somatických buněk

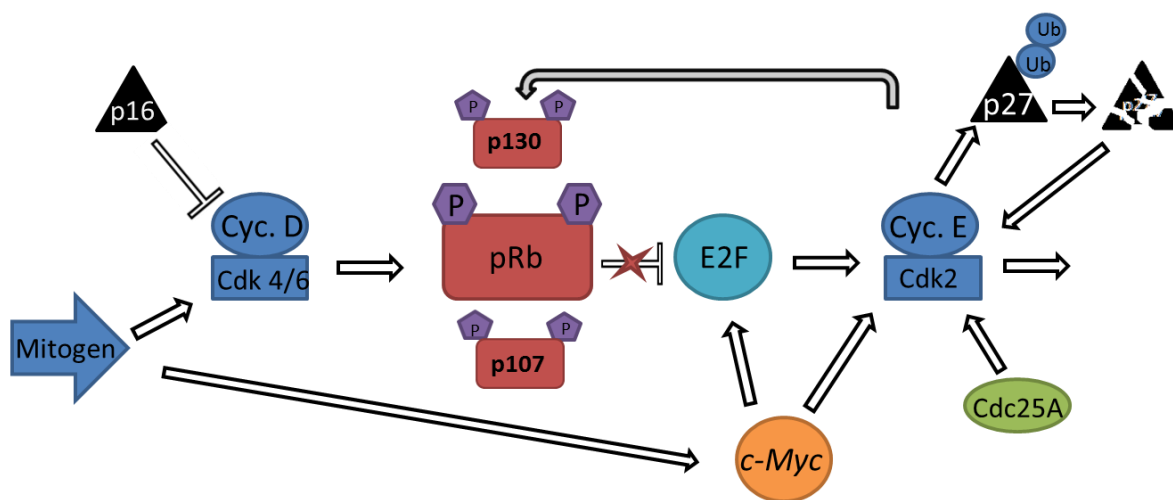
Hlavním cílem buněčného cyklu je duplikace genetické informace buňky, tedy replikace DNA a následné rozdělení DNA do dvou vzniklých dceřiných buněk. To, zda se buňka rozdělí, určuje integrita genomu a okolní tkáňové prostředí. Řízení buněčného cyklu je zprostředkováváno kontrolními body v různých částech buněčného cyklu, které při porušení integrity genomu buněčný cyklus zastavují. Selhání kontrolních bodů může vést k nekontrolovatelné proliferaci, narušení homeostáze tkáňové obnovy a tím vzniku rakoviny (Bartek J. a kol., 2001a). Molekuly řídící buněčný cyklus tvoří kaskádu proteinů. Ty zahrnují senzorické proteiny schopné detekovat genetické abnormality a skrze signální dráhy přes mediátory a transduktory ovlivňovat aktivitu efektorových proteinů, mezi něž patří například cyklin dependentní kinázy (Cdk), reparační proteiny nebo transkripční faktory. Při poškození DNA dochází ke zpoždění buněčného cyklu a k indukci reparačních procesů. Pokud je poškození DNA rozsáhlé a nelze ho opravit, zastavuje se buněčný cyklus trvale nebo dojde k řízené buněčné smrti (Bartek J. a kol., 2001b)

2.2.1.1. G1/S fáze – Restrikční, omezující bod

Restrikční bod je signální dráha, která se nachází na konci G1 fáze a dělí buněčný cyklus na dvě části. První část je závislá na přítomnosti mitogenů a růstových faktorů, druhá pak nezávislá.

Důležitou součástí restriktivního bodu je retinoblastomový protein (pRb). pRb váže transkripční faktory skupiny E2F, které regulují transkripci genů regulujících přechod z G1 do S fáze, např. cyklin A a E. K jeho uvolnění dochází pouze při fosforylaci pRb v pozdní G1 prostřednictvím komplexů Cdk4(6)/cyklinu D a Cdk2/cyklin E. Pokud není dosaženo potřebné hladiny proteinů regulovaných E2F transkripčním faktorem, nemůže buněčný cyklus pokračovat do S fáze (Bartek J. a kol., 2001a). Komplex Cdk4(6)/cyklin D může být inhibován vazbou inhibitoru p16. Stejně jako další inhibitory i p16 umožňuje buňce vystoupit z buněčného cyklu do klidové fáze a udržovat ji tam (McConnell B.B. a kol., 1999). Dalšími proteiny, které se podílejí na řízení buněčného cyklu, jsou p130 a p107. Stejně jako pRb vážou i tyto proteiny transkripční faktory skupiny E2F. Dalším regulačním komplexem v této kaskádě je komplex Cdk2/cyklinu E, jehož aktivita je kontrolována prostřednictvím Cdc25A. Regulace exprese cyklinu E je pod vlivem transkripčního faktoru E2F nebo *c-myc*, který je aktivován přítomností mitogenů a také transkripčně aktivuje E2F. E2F zároveň také indukuje transkripci cyklinu E. Jak už bylo výše popsáno, Cdk2/cyklin E udržuje fosforylovaný pRB a tím zpětnovazebně pozitivně reguluje vlastní expresi. Jeho substrátem je také Cdk inhibitor p27, jehož fosforylací a následnou degradací je zvyšována aktivita Cdk2. Za situace, kdy je nefunkční pRB, má buňka schopnost obejít tento kontrolní bod a pokračovat v cyklu díky *c-myc* a opačně, ovšem buňka není schopná dosáhnout mitózy. K zastavení cyklu tedy dochází, pokud není funkční E2F a ani *c-myc*. Komplex Cdk2/cyklin E je klíčový v přechodu z G1 do S fáze (Obr. 1). Geny, jejichž expresi řídí, jsou popsány níže v kapitole o S fázi (Bartek J. a kol., 2001a)

Obrázek č. 1: Schematické znázornění signální dráhy G1/S přechodu.



2.2.1.2. S fáze

Chyby v DNA, které při replikaci vzniknou a nejsou odstraněny, vedou ke genetickým onemocněním, vývojovým abnormalitám nebo rakovině.

Řízení iniciace replikace je evolučně konzervovaný proces. Každý počátek obsahuje iniciační místo na DNA, na které se váže origin recognition komplex (ORC), jež je přítomný v průběhu celého cyklu. V průběhu G1 dochází k asociaci ORC s dalšími faktory a výsledkem je prereplikační komplex. Mezi tyto faktory patří CDC6, CDT1 a proteiny skupiny MCM (minichromosome maintenance). Komplex je fosforylován prostřednictvím DBF4-CDC7 a Cdk2/cyklinu E. Tyto proteiny aktivují počátek a dále asociují s faktorem CDC45, čímž dojde k odvinutí DNA, navázání proteinu vázajícího DNA (PRA) a nasednutí DNA polymerázy. Aby nedošlo k opětovné aktivaci replikačního počátku, dochází k fosforylaci CDC6 prostřednictvím Cdk2/cyklinu A. Fosforylovaný CDC6 je exportován z jádra do cytoplazmy a degradován (Woo R. A. a kol., 2003).

2.2.1.3. G2/M

V této části buněčného cyklu je důležitou kinázou Cdk2, která je u savčích buněk aktivována vazbou cyklinu B1. Během G2 fáze je tento komplex importován a opět exportován z jádra. Před vstupem do mitózy je zastaven export z jádra. Dochází tak k aktivaci komplexu a jeho kumulaci zatím v inaktivní formě. Komplex Cdk1/ cyklinu B1 je v jádře aktivován fosforylací přes polo-like kinázu 1 (PLK1). Aktivita Cdk1 je dále regulována inhibiční fosforylací zprostředkovanou WEE1 a MYT1. Aktivace komplexu těsně před vstupem do mitózy je umožněna defosforylací Cdc25B fosfatázou. Hladina cyklinu B1 je snížena při přechodu z metafáze do anafáze (Stark G. R. a kol., 2006).

2.2.1.4. M fáze

Mitóza je komplikovaný buněčný proces, při kterém dochází ke strukturální reorganizaci buněčných kompartmentů. Výsledkem mitózy je přesné rozdělení genetického materiálu do dvou dceřiných buněk. Během profáze dochází nejdříve ke kondenzaci chromozomů a vzniká dělicí vřeténko. Během G2/M přechodu dochází k akumulaci

cyklinů. Komplex Cdk2/cyklinu B se podílí spolu s dalšími řídicími proteiny na vzniku bipolárního tělíska a na postavení chromozomů do metafázní desky. Ubiquitinace cyklinu prostřednictvím anafázi podporujícího komplexu (APC – anaphase promoting complex) dochází k jeho degradaci a je tak zajištěno další pokračování mitózy a rozdělení chromozomů během anafáze (Tipton A. R. a kol., 2012).

2.2.2. Buněčný cyklus za stresových podmínek

Mutace v genomu mohou být zdrojem variability a hrají důležitou roli v evoluci. Nicméně většina změn v DNA má na organismus negativní vliv. U živých organismů se proto vyvinuly procesy zahrnující kaskádovitě aktivované molekuly, které jsou schopné detekovat změnu v DNA, indukovat reparační mechanismy, dočasně pozastavit buněčný cyklus a po reparaci ho znovu zahájit. Odpověď na poškození nemusí být vždy stejná. Je ovlivněna mnoha faktory, jako je typ poškození DNA, typ dělení (mitóza, meióza) nebo stádium diferenciaci. Reparační mechanismy zajišťují, aby nedocházelo k přenosu škodlivých mutací (Bartek J. a kol., 2001b).

2.2.2.1. Typy poškození DNA

Zachování genomové integrity je důležité pro udržení nezměněné genetické informace. Jedním z nejnebezpečnějších typů poškození DNA je dvouvláknový zlom. Toto poškození vzniká působením ionizujícího záření, mechanické poškození chromozomu, chemoterapeutiky nebo působením reaktivního kyslíku. Pokud je takto poškozen esenciální gen, vede to k buněčné smrti. Dvouvláknové zlomy jsou opravovány homologní rekombinací nebo nehomologním spojením konců (Khanna K.K. a kol. 2001).

Dalším typem poškození DNA jsou jednovláknové zlomy. Toto poškození je nejčastěji vzniká působením oxidativního stresu (reaktivním kyslíkem nebo volnými radikály) nebo UV zářením. Opravným mechanismem poškození je homologní rekombinace (Caldecott K. W., 2008).

Dalším typem poškození DNA jsou kovalentní mezivláknové spoje. Tato propojení zabraňují rozvinutí DNA, které je nutné k replikaci. Kovalentní mezivláknové spoje jsou způsobeny chemickými látkami (v minulosti používanými i jako chemické zbraně). Poškození typu crosslink je opravováno mechanismem homologní rekombinace, nukleotidové excisní opravy nebo translesní syntézou (Deans A. J. a kol. 2011).

Posledním typem poškození DNA je deaminace purinových a pyrimidinových bází. Dochází k odstranění aminoskupiny a výsledné produkty se párují s jinými bázemi a dochází k transverzi (Nguyen T. a kol., 1991).

2.2.2.2. Odpověď na poškození DNA v G1/S přechodu

Cílem je především inhibice fosforylace pRB a aktivity komplexu Cdk2/cyklin E. Při poškození DNA odpovídá buňka indukci dvou odlišných drah. První odpověď je nezávislá na tumor supresorovém proteinu p53. Je okamžitá, ale pouze přechodná. Druhá zahrnuje protein p53. Tato odpověď nastupuje později, ale je trvalejší (Bartek J. a kol., 2001b).

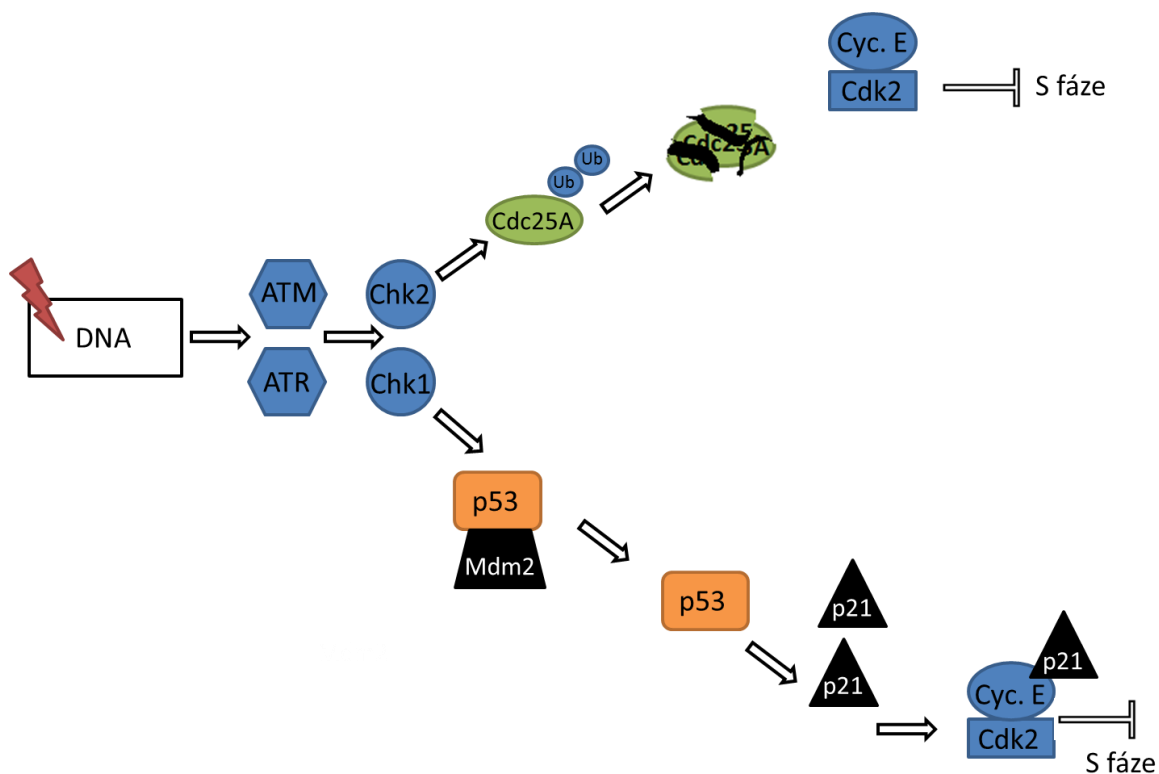
ATM a ATR jsou protein kinázy, které jsou schopné detekovat místo poškození DNA nepřímo přes interakci s proteiny lokalizovanými v místě poškození. Aktivace obou protein kináz se liší v závislosti na druhu mutagenu a typu poškození DNA. Jejich cílem je fosforylace Chk1 a Chk2 (checkpoint kinases), ale také p53 (Yang J. a kol., 2003). Chk2 je exprimován po celý průběh buněčného cyklu a aktivací skrze ATM dochází k jeho dimerizaci. Chk1 je exprimován na konci G1 fáze, v S a G2 fázi, aktivován je prostřednictvím ATR a nedochází k jeho dimerizaci. Chk1 a Chk2 mají řadu substrátů, které fosforylují. Některé jsou specifické pouze pro jeden z nich, ale spoustu jich mají společných. Fosforylace substrátů pak vede k mnoha výsledným odpovědím, jako je zastavení buněčného cyklu, apoptóza, reparace DNA nebo remodelace chromatinu. Mezi tyto substráty patří právě proteiny drah odpovídajících na poškození DNA a to jak odpověď zahrnující p53, tak odpověď na p53 nezávislou, kde je hlavním aktérem Cdc25A (Bartek J. a kol., 2003).

Tato odpověď nastupuje do 30 minut po poškození. Protein Cdc25A hraje roli v regulaci aktivace komplexů Cdk2/Cyklin A a Cdk2/Cyklin E, tím, že odstraňuje inhibiční fosforylaci. Cdc25A je regulován proteazomovou degradací. Při poškození DNA dochází k aktivaci Chk1 a Chk2 kináz, které pak fosforylují Cdc25A, a ta je následně ubikvitinována a degradována (Agner J. a kol., 2005). p53 je transkripční faktor, který reguluje expresi inhibitoru p21. Regulace genové exprese je časově náročná, proto aktivace přes p53 trvá několik hodin. p53 je aktivován fosforylací na několika místech Chk1, Chk2, ATR a ATM kinázami. Fosforylace p53 vede ke změně konformace a tím k přerušení

vazby s Mdm2. Odpověď na p53 závislá přichází až několik hodin po indukci, protože vyžaduje účinnou hladinu inhibitoru p21.

Výsledkem obou odpovědí na poškození je tedy inhibice stejného komplexu, která je ale časově oddělená. Odpověď indukovaná ihned po poškození DNA je pouze dočasná a je později nahrazena trvalejší inhibicí komplexu, jež závisí na hladině p53 (Obr. 2) (Bartek J. a kol., 2001b).

Obrázek č. 2: Schematické znázornění odpovědi na poškození DNA v G1/S.



2.2.2.3. Odpověď na poškození DNA v S fázi

Stejně jako v G1 fázi, i v S-fázi má buňka mechanismy rozpoznávající poškozenou DNA. Zde také existují dvě možné cesty vedoucí k zastavení syntézy DNA. První dráha je analogická s dráhou v G1 fázi. Dochází k aktivaci ATM, Chk2, degradaci Cdc25A a inhibici Cdk2, čímž je zablokováno hromadění Cdc45, který je esenciální pro zahájení replikace (Bartek J. a kol., 2003). Druhá alternativní cesta vede přes aktivaci ATM a fosforylaci proteinu SMC1. Ten je součástí komplexu kohezinu udržujícího pohromadě dvě

sesterské chromatidy, ale i součást komplexu RC-1, jenž podporuje rekombinaci. SMC1 se tedy podílí na udržování genomové integrity a reparaci DNA (Kitagawa R. a kol., 2004).

2.2.2.4. Odpověď na poškození v G2 fázi

Tento kontrolní bod zabraňuje buňce vstoupit do mitózy v případě, že v genomu přetrvává poškození DNA nebo je DNA neúplně zreplikovaná. Jeho cílem je inhibovat komplex Cdk1/Cyklinu B, který řídí progresi z G2 fáze do M fáze. Dochází k degradaci Cdc25C fosfatázy prostřednictvím ATM/ATR a Chk1/Chk2 (Bartek J. a kol., 2003). Druhou možnou cestou k blokadě Cdk1 je inhibice Cdc25B prostřednictvím kinázy p38, která je komponentem mitogenem aktivované kinázy. Tato cesta může být indukována stresem vyvolaným UV zářením (Bulavin D. V. a kol., 2001).

2.2.3. Buněčný cyklus kmenových buněk

Na rozdíl od diferencovaných somatických buněk mají EK buňky odlišnou strukturu buněčného cyklu. Konkrétně zkrácenou G1 a G2 fázi, což přispívá k mnohem vyšší rychlosti proliferace. Kmenové buňky nejsou schopné vstoupit do klidového stavu. Většina cyklinů je exprimována v mnohem vyšších hladinách, což opět přispívá ke zrychlení cyklu. Za zkrácenou G1 fázi stojí inaktivovaná dráha pRB-E2F. Cykliny D1 a D3 jsou exprimovány v nízkých hladinách, D2 není exprimován vůbec a aktivita Cdk4 je velice nízká. Pro diferenciaci buněk je charakteristická exprimace všech tří cyklinu D a zvýšení aktivity Cdk4. Dalšími exprimovanými cykliny u embryonálních kmenových buněk jsou E, A a B1. S výjimkou cyklinu B1 jsou všechny přítomné po celý buněčný cyklus a v mnohem vyšších hladinách, než je tomu u diferencovaných buněk. Nízké hladiny cyklinu D a E zajišťují trvalou fosforylaci pRB a příbuzných proteinů, jako je p130 a p107 po celý buněčný cyklus, to umožňuje trvalou aktivitu transkripčního faktoru E2F. Přechod z G1 do S fáze u kmenových buněk je pravděpodobně závislý na Myc. Odpověď na poškození DNA je také odlišná. Dochází k expresi p53, ale ten není schopný aktivovat p21. V případě těchto buněk slouží p53 pouze ke spuštění apoptické dráhy (Savatie P. a kol., 2004). U EK buněk je Cdc25A fosfatáza degradována jiným způsobem než je tomu u buněk somatických. Cdc25A je degradována přes aktivaci GSK3- β . Dále u EK buněk nedochází k inhibici Cdk2 degradací Cdc25A. To je vysvětlováno odlišnou lokalizací Chk1/2, Cdc25A a Cdk2. Zatímco Cdk2 je lokalizovaná na centrozomech nebo

v cytoplasmě a Chk1/2 pouze na centrozomech (u somatických buněk je Cdk2 lokalizován v jádře) Cdc25A je lokalizován v jádře. To zabraňuje jejich interakci (Koledova Z. a kol. 2010).

2.3. Metabolismus železa

Ionty železa jsou esenciálním prvkem živých organismů. Jsou důležitým kofaktorem velkého množství proteinů a enzymů, z nichž některé se podílejí na řízení buněčného cyklu. Ionty železa tak nepřímo ovlivňují genovou expresi. Buněčný cyklus je tedy závislý na dostupnosti železnatých a železitých iontů. Bez nich dochází k zastavení buněčné proliferace (Gao J a kol., 1999). Kmenové buňky jsou charakteristické svou rychlou proliferací, což vyžaduje mnohem větší příjem železa, než je tomu u normálních buněk. Kmenové buňky jsou tedy vůči chelatačním činidlům mnohem citlivější. (Le N. T. a kol., 2002).

Absorpce železa se uskutečňuje prostřednictvím enterocytů v tenkém střevě. Anorganické železo přijímané v potravě je z velké části v železité formě. Enterocyty přijímají železo pouze v železnaté formě a proto dochází k jeho redukci prostřednictvím ferrireduktázy duodenal cytochrom b (DCYTB) (Latunde-Dada G.O. a kol., 2002). Pravděpodobně jsou přítomné i další ferrireduktázy, protože knockout DCYTB nevyvolává deficit železa (Gunshin H. a kol., 2005) Fe²⁺ je pak transportováno do enterocytu pomocí proteinu divalent metal transporter-1 (DMT1) (Latunde-Dada G.O. a kol., 2002). Železo přijímané v organické formě v podobě hemu je transportováno pomocí proteinu heme carrier protein 1 (HCP1) (Shayeghi M., a kol., 2005). V enterocytu pak dochází k jeho metabolizaci hem oxygenásou na železo, biliverdin a oxid uhelnatý (Steven B. a kol., 1974). Po vstupu železa do enterocytu je část Fe uložena do zásobního proteinu ferritinu a zbytek přechází do krevního řečiště za účasti intracelulární ferroxidázy, hephaestinu (Vulpe C.D. a kol., 1999). Transportní protein ferroportin-1 přenáší Fe ionty - které skrz bazolaterální membránu (Donovan A. a kol., 2000). Na této úrovni je homeostáza železa zajišťována peptidovým hormonem hepcidinem produkovaným v játrech. Při nadbytečném příjmu železa dochází k sekreci hepcidinu a jeho stimulací k degradaci a internalizaci ferroportinu-1. Tímto krokem je snížen transport železa do krevního řečiště a dochází k ukládání přijímaného železa do ferritinu (Nemeth E. a kol. 2004). Dalším regulátorem je

hormon hemojuvelin (HVJ) produkovaný v játrech a kosterním svalstvu (Papanikolaou G. a kol., 2004), který reguluje expresi hepcidinu. Mutací v jeho genu dochází k deregulaci hepcidinu a tím nadbytečnému příjmu železa a vzniku juvenilní hemochromatózy (Niederkofler V. a kol., 2005). Při vstupu železa do krevního řečiště dochází k jeho zpětné konverzi na železitou formu prostřednictvím sérové ferroxidázy, ceruloplazminu (Vulpe C.D. a kol., 1999). Dva atomy železa se pak váží na sérový transferrin (Tf), který se váže v cílových buňkách na transferrin receptor 1 (TfR1) (Morgan E. H. a kol., 2002). Následuje zpětná redukce na železnatou formu prostřednictvím ferrireduktázy a transport z endozomu do cytoplazmy pomocí DMT1. Komplex Tf/TfR1 je recyklován. Zde v cytoplazmě jsou ionty železa využity pro buněčné procesy nebo dochází k jejich ukládání do ferritinu (Chua a kol., 2007).

Protein ferritin má tvar duté koule a skládá se z 24 podjednotek. Je rozpustný ve vodě a jeho zásobní kapacita je 4 500 atomů železa. Existují dvě možné isoformy podjednotky v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. Jsou jimi těžká (21 kDa) a lehká (19 kDa). Poměr těchto dvou isoform v celém proteinu se liší podle typů buněk. Expresie ferritinu je závislá na buněčné koncentraci železa a je regulována pomocí proteinu regulujícího železo (IRP - iron regulatory protein) popsaného níže (Koorts A.M. a kol., 2007).

Dalším zásobním proteinem je hemosiderin. Vzniká v lysozomech jako vedlejší produkt neúplné degradace ferritinu, ale na rozdíl od něj je ve vodě nerozpustný a uvolňování atomů železa je obtížnější (Richter G. W., 1986). Nejčastěji ho nalezneme v buňkách kostní dřeně, sleziny nebo Kupfferových buňkách (Niederkofler V. a kol., 2005).

Buněčná homeostaze železa je regulována expresí TfR1 v závislosti na intracelulární koncentraci železa a to skrz IRE-IRP systém. Při nízké intracelulární koncentraci železa dochází ke zvýšené syntéze TfR1 (Gunshin H. a kol., 2001) Druhý receptor, který reguluje koncentraci železa v buňce je transferrin receptor 2 (TfR2). Tento receptor má nižší afinitu než TfR1 a jeho exprese je regulována buněčným cyklem s nejvyšší expresí v G1 fázi a s nulovou v G0/G1 (Kawabata H. a kol., 2000).

2.4. Vliv deprivace iontů železa na aktivaci signálních drah buněčného cyklu

Vliv deprivace iontů železa na aktivaci signálních drah buněčného cyklu. Mechanismus jakým dochází k zastavení buněčného cyklu nebo apoptóze chelatačními činidly je založen na ovlivnění molekul buněčného cyklu. Zastavení v G1/S je způsobeno inhibicí aktivity ribonukleotid reduktázy, tím dochází k snížení hladiny nukleotidů a zastavení replikace DNA.

2.4.1. Ribonukleotid reduktáza

Ribonukleotid reduktáza je enzym, který řídí množství deoxyribonukleotidů nezbytných k replikaci DNA. Reakce vyžaduje volný tyrosylový radikál, prostřednictvím kterého dojde k redukci ribonukleotidu na deoxyribonukleotid. Na základě obsaženého kofaktoru iontu železa nebo kobalaminu se enzymy dělí do tří základních tříd. Enzymy I. třídy se nacházejí u všech eukaryot, ale také některých prokaryot a virů. Skládají se ze dvou odlišných homodimerů R1 a R2. R1 podjednotka obsahuje katalytické místo a vazebné místo pro alosterický efektor. R2 obsahuje centrum se dvěma atomy železa, kde dochází ke generaci volného tyrosylového radikálu. II. třída enzymů se nachází hlavně u prokaryot a to jak aerobních tak anaerobních. Má jednodušší stavbu a obsahuje jako kofaktor kobalamin. III. třída se nachází u anaerobních prokaryot a má podobnou strukturu jako enzymy I. Třídy. Kofaktorem je železo ve formě železito-sirného klastru (Jordan A. a kol., 1998). Kofaktor je v případě I. třídy esenciální pro funkci celého enzymu. Pokud dojde k deprivaci železa pomocí chelatačních činidel, nemůže buňka syntetizovat DNA, a dochází k zastavení buněčného cyklu. Různá chelatační činidla inhibují aktivitu enzymu odlišnou cestou. Hydroxykarbamid redukuje železnatý iont na železitý. Desferrioxamin (DFO) zase chelatuje železo v buňce a brání tak v jeho zabudování do nově syntetizované R2 podjednotky (Nyholm S. a kol., 1993).

2.4.2. Cykliny a cyklin dependentní kinázy

Cykliny a Cdk jsou molekuly kritické pro řízení buněčného cyklu. Bylo prokázáno, že chelatační látky železa mají vliv na jejich expresi a ovlivňují tedy průběh buněčného

cyklu. Se zvyšující se koncentrací deferoxamin mesylátu dochází ke snížení hladin cyklinů A1, B1, D1, D2 a D3. U cyklinu E dochází naopak ke snižování exprese (Gao J. a kol., , 2001). V případě cyklinu D1 nedochází ke změně hladiny jeho mRNA. Jeho hladina je regulována posttranskripčně proteazomovou degradací (Nurtjahja-Tjendraputra E. a kol., 2007). Z Cdk je ovlivněna deprivací železa hladina Cdk2. Se zvyšující se koncentrací chelatačního činidla dochází ke snižování nebo až úplnému zastavení exprese. Na expresi Cdk4 nebyl prokázán žádný vliv. Protože vlivem deprivace iontů železa dochází ke snižování hladiny cyklinů řady D, který aktivuje Cdk4(6), nemůže tento komplex vzniknout a fosforylovat pRB. Tím dochází k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Gao J. a kol., 2001).

2.4.3. p53

Hladina p53 se zvyšuje jako odpověď na poškození DNA. p53 řídí transkripci dalších genů, jako je WAF1, který kóduje p21, nebo GADD45 kódujícího molekuly pro reparaci DNA. Po deprivaci iontů železa se zvyšuje hladina mRNA WAF1 a GADD45, zatímco mRNA p53 se nemění. Je tedy regulována posttranskripčně stabilizací prostřednictvím HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) a zároveň dochází i ke zvýšení jeho vazebné aktivity na DNA. Nicméně hladiny WAF1 a GADD45 mohou být zvýšeny i nezávisle na p53 a to prostřednictvím transkripčních faktorů AP2 a Spl. Tyto dva faktory a p53 mají společnou redoxní regulaci. Obsahují cystein a zinek (II), které jsou zodpovědné za jejich vazebnou aktivitu. Jejich aktivita může být ovlivněna redukčními a oxidačními činidly a také chelatóry kovů (Liang S.X. a kol., 2003).

2.4.4. p21

p21 je inhibitor Cdk. Váže se na komplex cyklin E-Cdk2 a zastavuje progresi buněčného cyklu. Je také schopný inhibovat replikaci DNA vazbou na DNA polymerázu δ (Luo Y, a kol., 1995). Je také schopný regulovat aktivitu transkripčního faktoru E2F nezávisle na pRB (Delavaine L. a kol., 1999) a též aktivitu faktoru *c-Myc* (Kitaura H. a kol., 2000). Má zároveň antiapoptické účinky a zabraňuje apoptoze při poškození DNA, které lze opravit (Weiss R.H., 2003). P21 má ale i pozitivní efekt na progresi buněčného cyklu. Určitě hladina p21 je vyžadována pro vznik komplexu cyklin D-Cdk. Jak již bylo výše zmíněno, jeho hladina může být regulována na p53 závisle nebo nezávisle. Po

chelataci železa dochází ke zvýšení hladiny mRNA p21, ale hladina proteinu zůstává stejná, nebo dochází ke snížení. Příčinou nízké hladiny p21 je inhibice transportu mRNA tohoto proteinu z jádra do cytosolu a tam dále dochází k jeho ubiquitin nezávislé proteazomové degradaci. Tato regulace při deprivaci iontů železa hraje pravděpodobně roli v zastavení buněčného cyklu a apoptoze (Fu D. a kol., 2007).

2.4.5. p27

p27 je dalším inhibítorem Cdk. Inhibuje komplex Cdk4(6)/cyklin D i Cdk2/cyklin E. Podílí se na zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Ve vysokých hladinách je exprimován zejména v klidových fázích buňky a po stimulaci růstovými faktory dochází k rychlému snížení exprese. Induktorem exprese p27 je transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Chelatace železa vyvolává zvýšení tohoto induktoru a zvyšuje se tak i exprese p27 (Yoon G. a kol., 2002). Bylo také prokázáno, že hladina p27 může být ovlivněna prostřednictvím p107. Jedná se o podjednotku iniciačního faktoru 3. Po deprivaci iontů železa prostřednictvím rostlinné aminokyseliny s chelatačnými účinky L-mimosinu dochází ke snížení exprese p107 a následnému zvýšení exprese p27. Výsledkem je tedy i ovlivnění translace velkého množství mRNA, což má dopad i na buněčný cyklus (Dong Z. a kol., 2003).

2.4.6. GDDA

GDDA (growth arrest and DNA damage-inducible genes) jsou molekuly, které jsou exprimovány za různých stresových podmínek. Zahrnují molekuly GDDA34, GDDA45 a GDDA153. GDDA45 je gen, který je indukován prostřednictvím p53. Protein kódovaný tímto genem asociuje s p21/WAF1/CIP1 a zastavuje tak proliferaci. GDDA153 je exprimován jako odpověď na přítomnost inhibitorů glykosylace proteinů nebo genotoxických látek, které vyvolávají stres v endoplazmatickém retikulu. Zvýšená hladina této molekuly pak vede k buněčné smrti (Abcouwer S.F. A kol., 1999). GDDA45 má 3 strukturně odlišné proteiny GDDA45 α , GDDA45 β a GDDA45 γ . Pouze GDDA45 α je indukován prostřednictvím p53 a zastavuje buněčný cyklus v G/M inhibicí Cdk2 (Zerbini L.F. a kol., 2005). Zvýšená exprese GDDA34 a GDDA153 vede většinou k apoptoze (Hollander M. C., 2001), zatímco aktivace všech tří GDDA k zastavení buněčného cyklu (Zhan Q. a kol., 1994) Při deficitu železa dochází ke zvyšování hladiny mRNA GDDA45

(Darnell G. A kol., 1999) i GDDA153 (Gao J. a kol., 2001).

2.4.7. p38

p38 je kináza patřící do skupiny mitogen-aktivovaných protein kináz. Její aktivita je vyvolána při různých stresových podmínkách. Je schopná zastavit růst buňky skrze svou schopnost regulovat p53 a pRb/p16 (Freund A. a kol., 2011). Na deprivaci iontů železa reagují buňky vysokou aktivitou p38 i další kinázy patřící do stejné skupiny ERK (extracellular signal regulated kinase). Aktivita p38 pak zastavuje buněčný růst aktivací p53 (Bulavin DV a kol., 1999) a také stojí za snížením hladiny cyklinu D1, který byl již popisován (Lavoie J.N. a kol., 1996).

2.4.8. HIF-1 α

HIF-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α) je transkripční faktor, který se aktivuje jako odpověď na hypoxii. Stimuluje transkripci genů, které zajistí přežití buňky nebo celého organismu za hypoxických podmínek. Jedním z genů je například erythropoetin stimulující proliferaci a diferenciaci erytroidních progenitorů. HIF-1 α se skládá z podjednotek α a β . Podjednotka β je přítomná stále, zatímco α je exprimována pouze za hypoxických podmínek (Wang G.L. a kol., 1995). Jedním z genů regulovaných prostřednictvím HIF-1 α je i TfR. Po deprivaci železa dochází ke zvýšení exprese TfR nejen prostřednictvím IRP, ale i HIF-1 (Bianchi L. a kol., 1999). Stejně tak má schopnost HIF-1 α při hypoxii nebo deprivaci iontů železa indukovat stabilizaci a aktivaci p53 (An W. G. a kol., 1998) nebo proapoptického faktoru Nip3 skrze transkripční faktor PLAGL2 (pleomorphic adenoma gene like 2) (Mizutani A. a kol., 2002). Výsledkem chelatace iontů železa je aktivace HIF-1 α a jeho podřízených genů. Odpovědí může být tedy zastavení růstu a buněčného cyklu nebo apoptóza (Le N. T. a kol., 2004).

2.4.9. NdrG-1

NdrG-1 patří mezi supresory nádorových metastáz. Ve zdravých buňkách má pravděpodobně vliv na diferenciaci a růst. Co se týče buněčného cyklu, podílí se také na odpovědi za stresových podmínek, kdy může být indukce jeho exprese vyvolána aktivitou HIF-1 α . Dále se účastní dějů, jako je myelinizace nervů, metabolismus lipidů, nebo exocytóza. Nejvyšší exprese probíhá v G1 a G2/M fázi a nejnižší je v S fázi. Celková

exprese se liší u jednotlivých tkání organismu. V rakovinných buňkách bývá často nízká exprese tohoto proteinu a také odlišná distribuce v buněčném cyklu, kdy zůstává hladina konstantní po celý cyklus. Velikost hladiny často také souvisí se stupněm diferenciaci nádoru. Dále bylo zjištěno, že primární nádory mají často vyšší expresi, než je tomu u jejich metastazujících nádorů. Tímto se potvrzuje pravděpodobnost, že Ndr-1 je významný v progresi a metastazi rakoviny. Ndr-1 je také jedním z genů regulovaných p53 a je nezbytný pro spuštění apoptózy. Chelatace iontů železa vyvolává zvýšení hladiny Ndr-1, přičemž tato cesta může být závislá nebo nezávislá na HIF-1 α (Zaklina KovacevicZ. a kol., 2006).

2.4.10. CDC14A

CDC14A je fosfatáza, která defosforyluje inhibitor p27 a tím inhibuje komplex cyklin E-Cdk2 (Kaiser BK a kol., 2002). mRNA tohoto proteinu obsahuje vazebné místo pro IRP (iron regulatory proteins). Tyto proteiny post-transkripčně regulují expresi molekul obsahujících vazebné místo IRE (iron responsive elements) v závislosti na hladině železa v buňce. To znamená, že je regulován dostupností železa. Chelatace zvyšuje expresi CDC14A a zastavuje tak buněčný cyklus v G1/S fázi (Sanchez M. a kol., 2006).

2.4.11. Apoptóza

Při apoptóze dochází k biochemickým změnám v jádře, cytoplazmě a plazmatické membráně. Dochází k ovlivnění exprese antiapoptických a apoptických proteinů skupiny Bcl-2, které řídí permeabilitu mitochondriální membrány (Yu Y. a kol., 2007).

K jejímu spuštění může dojít extracelulárně vazbou ligandu na receptor. Takovým receptorem je například CD95 nebo TNF-R (tumor-necrosis faktor receptor). Tato aktivace vede k aktivaci kaspázové signální dráhy a degradaci buňky.

Druhá cesta je aktivována intracelulárně oxidativním stresem, cytotoxickými látkami atd. Tato cesta vede přes mitochondrie. Dochází k uvolnění cytochromu C z vnitřní membrány a opět k aktivaci kaspáz. Příkladem intracelulární aktivace apoptózy je chelatace iontů železa (Lawen A., 2003).

3. Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši na téma buněčný cyklus myších embryonálních kmenových buněk a vliv deprivace iontů železa na signální dráhy buněčného cyklu.
2. Lokalizovat vybrané proteiny buněčného cyklu pomocí imunofluorescence.
3. Detekovat vybrané proteiny buněčného cyklu pomocí western blotu a studium dynamiky buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie při různých koncentracích chelatačního činidla.

4. Materiál

4.1. Biologický materiál

- Linie HM1-myší embryonální kmenové buňky
- Linie V6.5-myší embryonální kmenové buňky
- Linie STO-myší embryonální fibroblasty

4.2. Chemikálie:

- 1% bovinní sérový albumín (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Bradford reagent (Biotechnolog Grade)
- Acryl/Bis 40% (w/v) solution (Amresco)
- N,N,N'-Tetramethyl-ethylene diamine (TEMED) (Serva)
- 10% dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich)
- 10% ammonium persulfát (Sigma-Aldrich)
- 1,5M Tris (pH 8,8) (Sigma-Aldrich)
- 1,5M Tris (pH 6,8) (Sigma-Aldrich)
- destilovaná voda
- 70% etanol (Sigma-Aldrich)
- Tween (Sigma-Aldrich)
- 0,1M Na₂B₄O₇ (Sigma-Aldrich)
- 2M HCl (Sigma-Aldrich)
- Triton X (Serva)
- Vectashield with DAPI (Vector)
- Developer (AGFA) – ředění 1:5 s vodou
- Manual Fixing Bath (AGFA) – ředění 1:4 s vodou
- Super Signal West Dura Stabl Peroxide Buffer (Thermo Scientific)
- Super Signal West Femto Stabl Peroxide Buffer (Thermo Scientific)

- Super Signal West Pico Stabl Peroxide Buffer (Thermo Scientific)
- Super Signal West Dura Stabl Luminol/Enhancer solution (Thermo Scientific)
- Super Signal West Femto Stabl Luminol/Enhancer solution (Thermo Scientific)
- Super Signal West Pico Stabl Luminol/Enhancer solution (Thermo Scientific)

4.3. Roztoky

- 6x LSB (187,6 mM TRIS pH 6,8, 6% SDS, 30% glycerol, 0,003% bromfenolová modř, 120 mM DTT)
- 10x Running buffer, pH 8,3 (250 mM TRIS, 1,9 M glycine, 1% (w/v) SDS)
- Semi-dry transfer bufer (50 mM TRIS, 40 mM glycin, 0,037%(w/v), 20% metanol)
- 10x Ponceau (2 % ponceau, 30 % trichloracetové kyseliny, 30 % 5-sulfosalicylové kyseliny)
- 1x PBS (187 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄)

4.4. Přístroje:

- IKA Stone Shaker (Scholler Instruments s.r.o.),
- Bio Vortex V1 (Biosan)
- Dry Block Heating Thermostat (Biosan)
- Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- Pipetus (Hirschmann Laborgerate)
- analytické váhy (Kern EW)
- fluorescenční mikroskop BX51 FM (Olympus)
- kamera DP70 (Olympus)
- Nano Quant Infinite M200 (Tecan)
- Cytomics FC 500 (Beckman Coulter)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Trasfer Cell (Bio-rad)
- PowerPac HC (Bio-Rad)
- Elektroforéza (Bio-Rad)

5. Metody

5.1. Kultivace kmenových buněk

Buňky byly kultivovány na Petriho miskách potažených želatinou. Jako základ média bylo použito DMEM médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), do něhož bylo přidáváno FBS, směs antibiotik, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny a L-glutamin. Výsledné médium obsahovalo 15% FBS 0,4% směsi antibiotik Penicilin-Streptomycin, 1% pyruvátu sodného, 1% neesenciálních aminokyselin, 2% L-glutaminu. Kultivaci buněk jsem neprováděla.

5.2. Fixace buněk

Buňky připravené pro imunofluorescenci byly fixovány ve směsi metanolu a acetonu v poměru 1:1. Pro průtokovou cytometrii byly fixovány v 70% etanolu.

5.3. Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie byla použita pro měření množství DNA v buňkách. Na základě změřeného množství byla vyhodnocena fáze cyklu v jaké se buňka nachází. Pro průtokovou cytometrii byly fixované buňky značené BrdU barveny interkalačním barvivem propidiumiodidem (PI). Výsledný signál PI je úměrný množství DNA.

1. Fixované buňky značené BrdU (v médiu 10 μ M BrdU, inkubace 30 minut) v eppendorfových zkumavkách byly centrifugovány 5 minut při 2800 otáčkách. Supernatant byl odstraněn a buňky ve zkumavce resuspendovány v 50 μ l PBS/1%FBS.
2. Při mírném vortexování byl do zkumavky po kapkách přidáván 1 ml 2M HCl/Triton X-100 (0,5 % v/v). A buňky se takto nechaly inkubovat 30 minut za promíchávání cca každých 10 minut.
3. Po inkubaci byly buňky opět centrifugovány a supernatant odstraněn. Přidaná HCl byla neutralizována resuspendováním buněk v 0,1M Na₂B₄O₇ (pH 8,5). Opětovná

centrifugace buněk při 2800 otáčkách 5 minut.

4. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 1 ml PBS/1%FBS/0,5% Tween pro permeabilizaci buněk.
5. Buňky byly opět promyty centrifugací, supernatant odstraněn a resuspendovány v 95 μ l PBS/1%FBS/0,5% Tween do kterého bylo přidáno 5 μ l antiBrdU-FITC. Buňky se nechaly s protilátkou inkubovat 30 minut.
6. Buňky byly promyty centrifugací v 1 ml PBS a resuspendovány ve 200 μ l PI s 1 μ l RNázy a nechaly se inkubovat 30 minut ve tmě. Po inkubaci byly analyzovány na průtokovém cytometru.

5.4. Western blot

Pro detekci specifických proteinů buněčného cyklu byl použit western blot. Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech byla změřena pomocí metody Bradfordové a pro jejich separaci byla použita gelová elektroforéza s 10% nebo 8% akrylamidovým gelem o tloušťce 1,5 mm. Protein na membráně byl detekován dvoukrokovou metodou tedy pomocí primární a sekundární protilátky. Po navázání sekundární protilátky s peroxidázou a přidání substrátu dochází k chemoluminiscenci bylo uvolněné světlo detekováno expozicí membrány na film.

5.4.1. Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

1. Do mikrozkušavky byl napipetován 1 ml činidla Bradfordové a 1 μ l buněčného lyzátu. Směs byla promíchána překlopením.
2. Pro přípravu kalibrační řady byl použit standardní roztok BSA o koncentraci 1 μ g/ μ l. Do mikrozkušavky byl přidán 1ml Bradfordova činidla a proteinový standard tak, aby koncentrace proteinů byla: 0; 2,5; 5; 7,5; 10 μ g/ μ l. Připravené vzorky s činidlem včetně kalibrační řady byly napipetovány do mikrotitrační destičky po 200 μ l.
3. Měření na spektrofotometru proběhlo při vlnové délce 595 nm. Byla vytvořena kalibrační křivka pomocí rovnice lineární regrese byla vypočítána koncentrace celkových proteinů ve vzorcích buněčných lyzátů.

4. Ze známé koncentrace proteinů byl spočítán objem lyzátu tak, aby obsahoval 50 μ g proteinů a tento objem byl napipetován do mikrozkušavky. K tomuto množství bylo přidáno 6 krát menší množství 6xLSB. Vzorke byly zahřívány na 90°C v termobloku po dobu 5 minut a prudce schlazeny na ledu. Po krátké centrifugaci byly zamrazeny do druhého dne při -80°C.

5.4.2. Akrylamidová elektroforéza

1. Akrylamidový gel byl připravován v digestoři. Jednotlivé složky gelu byly pipetovány do plastových zkumavek v takovém pořadí, v jakém jsou vedeny v tabulce (Tab. 1). TEMED byl přidáván vždy těsně před nalitím gelu mezi skla, aby nedošlo k předčasné polymerizaci. Stejným způsobem byl připraven i zaostřovací gel (Tab. 2).
2. Před nalitím gelu byla obě skla odmaštěna 70% etanolem a umístěna do stojanu tak, aby nedošlo k protékání gelu. Do prostoru mezi skla byl nalit nejdříve rozdělovací gel asi 1 cm pod okraj. Rychlejší polymerizaci zajistilo převrstvení gelu destilovanou vodou, aby nedošlo ke kontaktu se vzduchem. Po zatuhnutí gelu (cca 15 minut) byla vrstva vody vylita a na rozdělovací gel byl nanesen zaostřovací až po okraj skel a vsunut hřebínek tak, aby nedošlo k vytvoření bublin v gelu.
3. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu, byla skla s gelem vyjmuta ze stojanu a umístěna do elektroforetické vaničky, do které se až po okraj nalit running buffer. Do první jamky bylo naneseo 10 μ l molekulární markeru. Vzorke zmrazené při -80°C byly opětovně zahřáty na 90°C (5 minut) a prudce zchlazeny na ledu. Do jamky v gelu byl nanesen vždy celý objem vzorku. Celá vanička byla uzavřena víkem a elektrody připojeny ke zdroji. Prvních 15 minut bylo na zdroji nastaveno 100 V a po uplynutí této doby bylo napětí navýšeno na 150 V.
4. Průběh elektroforézy byl ukončen jakmile čelo vzorků označení LSB pufrem vymigrovalo z gelu. Skla byla vyjmuta z vaničky a oddělena. Z gelu byla oříznuta část se zaostřovacím gelem a rozdělovací gel s proteiny umístěn do semi-dry buffer.

Tabulka č. 1: Složky 8% a 10% akrylamidového gelu.

Složka	8% gel	10% gel
H ₂ O	5,3 ml	4,8 ml
40% akrylamid	2 ml	2,5 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% ammonium persulfate	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 ul	4 ul
Celkový objem	10 ml	10 ml

Tabulka č. 2: Složky zaostřovacího akrylamidového gelu.

Složka	Zaostřovací gel
H ₂ O	7 ml
40% akrylamid	1,5 ml
1,5M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	0,1 ml
10% ammonium persulfate	0,1 ml
TEMED	10 ul
Celkový objem	10 ml

5.4.3. Western blot

1. Byly připraveny filtrační papíry shodné s velikostí gelu, dále pak membrána pro blotování. Obojí bylo ponořeno na několik minut do semi-dry transfer pufru. V pufru byl již ponořen gel.
2. Do blotovacího zařízení Trans-Blot SD byl nejprve umístěn jeden filtr, na něj membrána, gel a druhý filtr. Pomocí skleněné pipety byly tlakem na vrchní filtr vytlačeny bubliny vzduchu mezi membránou a gelem. Po uzavření blotovacího zařízení bylo připojeno ke zdroji nastaveném na napětí 20 V.
3. Po 45 minutách bylo blotování ukončené. Membrána byla vytažena z blotovacího zařízení a nabarvena v ponceau. Tím jsme ověřili přenos proteinů na membránu. Podle molekulového markeru byla z membrány vyříznuta pouze ta část, kde se nacházel požadovaný protein a ta byla promyta v PBS 1% Tween, aby došlo k odstranění ponceau.
4. Pro blokování membrány bylo použito 5% mléko. Na váze byly naváženy 2 g sušeného mléka, rozpuštěny v plastové zkumavce ve 40 ml PBS a roztok promíchán na vortexu. V připraveném 5% mléce byla membrána po dobu 60 minut blokována.
5. Pro každou membránu byla do mikrozukavky připraveno 0,5 ml primární protilátky ředěné v 5% mléku (Tab.3). Protilátka byla napipetována na membránu připravenou na skle potaženém parafilmem. Aby se zabránilo vyschnutí, byla okolo membrán na sklo nanesena voda a membrány přiklopeny plastovým krytem. Takto se nechala působit protilátka přes noc v lednici.
6. Druhý den byla membrána promývána v PBS 1% Tween na třepačce 3x po 10 minut. Do mikrozukavky byla připravena sekundární protilátka ředěná 1000x s 5% mlékem (Tab.3). Na promytou membránu bylo naneseno 0,5 ml protilátky a zabráněno vyschnutí. Sekundární protilátka se nechala působit 60 minut a poté byla membrána opět promyta v PBS 1% Tween 3x po 10 minutách.
7. Pro každou membránu bylo do mikrozukavky připraveno 0,5 ml chemoluminiscenčního substrátu, který se nechal působit 5 minut. Přiložením filtračního papíru byla membrána osušena a zabalena do saranu.
8. V temné komoře pak proběhla expozice membrány na světlo citlivý film nejdříve

po dobu cca 30 sekund a podle síly signálu byl čas další exponace prodloužen nebo zkrácen (případně byl substrát omyt v PBS 1% Tweenu a nanesen slabší nebo silnější substrát). Po exponaci byl film ponořen do vývojky do doby, než došlo ke zviditelnění bandů, dále na cca 2 minuty do ustalovače a na cca 5 minut do vody, aby nedošlo ke žloutnutí filmu.

Tabulka č 3: Použité protilátky pro metodu western blot a jejich ředění.

	Protilátka (výrobce)	Ředění
Primární protilátky	Cdc25A (F-6): sc-7389 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500
	p-Chk1 (Ser345): sc-21866 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Sekundární protilátky	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:1000
	Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:1000

5.5. Imunofluorescence

Metoda imunofluorescence byla použita pro určení lokalizace molekul buněčného cyklu. Na primární protilátku proti specifické molekule se váže sekundární protilátka s navázaným fluorochromem. Buňky byly zároveň barveny pomocí DAPI, která se váže na DNA. Výsledek barvení byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem název.

1. Fixované buňky na sklíčkách byly nejdříve hydratovány v roztoku PBS/1%FBS 3x po dobu 15 minut na třepačce.
2. Sklíčka s buňkami byly umístěny na sklo potažené parafilmem. Na ně byla nanášena primární protilátka s příslušným ředěním s PBS/1%FBS (Tab. 4) a nechala se působit 1 hodinu.
3. Po působení primární protilátky se nechaly sklíčka opětovně promývat v PBS/1%FBS na třepačce 3x po 15 minutách.

4. Na kruhová sklička umístěná na skle byla nanášena sekundární protilátka naředěná v PBS/1%FBS v poměru 1:1000. Doba působení byla 30 minut.
5. Buňky byly znovu promyty stejně jako v předchozích krocích. Na podložní skličko bylo napipetováno 5 μ l Vectashield s DAPI a přiložen suché skličko tak, aby v oleji nevznikaly bubliny.
6. Výsledné fotografie z fluorescenčního mikroskopu byly upraveny pomocí programu DPManager.

Tabulka č. 4: Použité protilátky pro imunofluorescenci a jejich ředění

	Protilátka (výrobce)	Ředění
Primární protilátka	Cyclin B1 (M-20): sc-595 (Santa Cruz Biotechnology)	1:100
	Cyclin A (C-19): sc-596 (Santa Cruz Biotechnology)	1:100
	Cdc25A (F-6): sc-7389 (Cell Signaling)	1:100
	Phopo-Cdk2 (Thr160) Antibody (Cell Signaling)	1:100
	Anti- γ -Tubulin antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich)	1:100
	Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9) (Cell Signaling)	1:100
	Phospho-histone H2AX (Ser139) (Cell Signaling)	1:50
Sekundární protilátka	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:1000
	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako)	1:0000

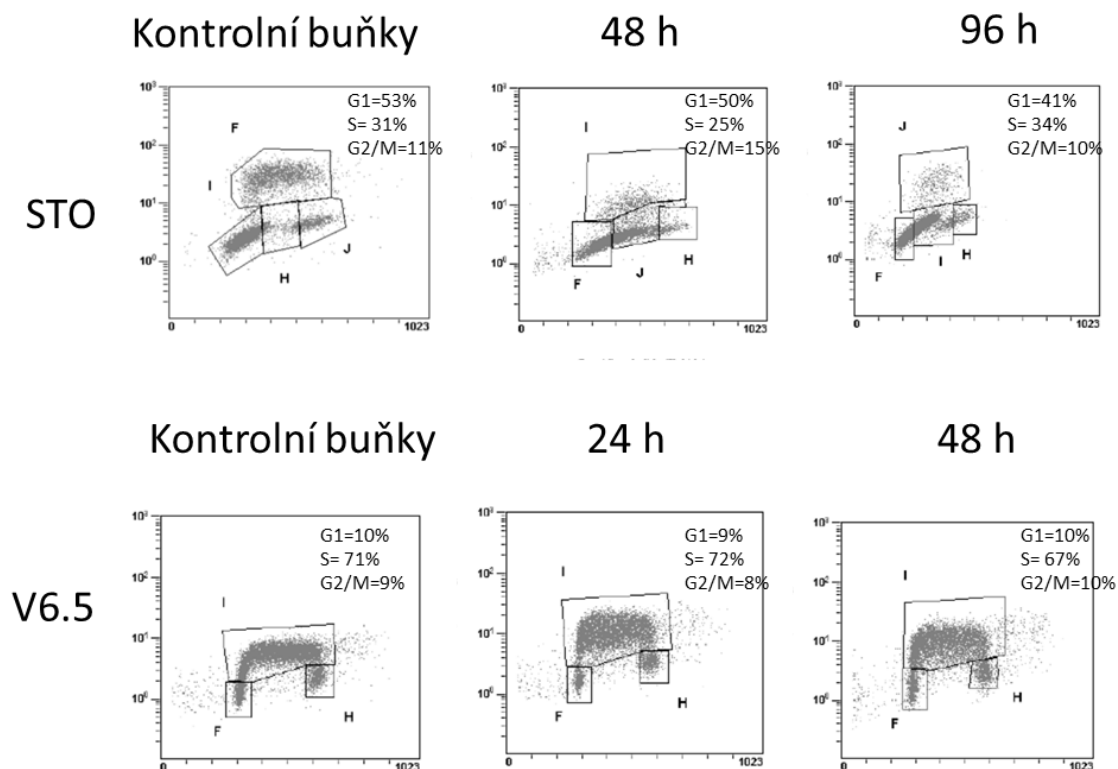
6. Výsledky

6.1. Změny buněčného cyklu u mEK buněk a myších embryonálních fibroblastů

U somatických buněk zastoupených linií STO, došlo k zastavení buněčného cyklu po 48 h kultivace v přítomnosti 5 μ M DFO. Na obrázku č. 3 je výsledek průtokové cytometrie – kombinace barvení propidium jodidem a BrdU. BrdU specificky barví buňky v S-fázi tím, že je při replikaci umísťován do nově vznikající DNA místo tyminu. Na obrázku je vidět zastavení buněčného cyklu v S- fázi.

mEK buňky nezastavují buněčný cyklus, množství buněk v S-fázi je stále stejné. Také nedochází k zastavení v ostatních fázích buněčného cyklu – nepozorujeme akumulaci buněk v G1 nebo G2/M.

Obrázek č. 3: Dynamika buněčného cyklu linií STO a V6.5 v přítomnosti 5 μ M DFO. Délka kultivace v přítomnosti DFO je označena nad jednotlivými grafy.

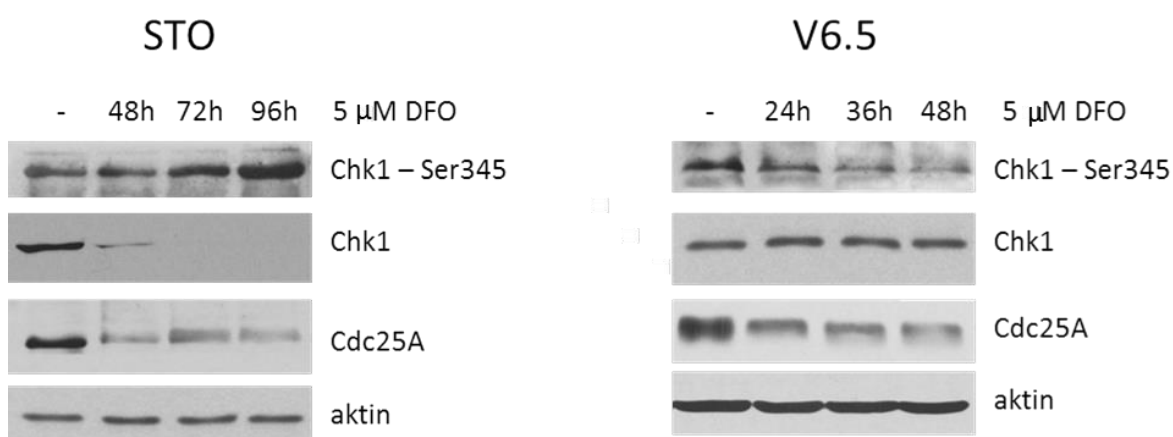


6.2. Ověření aktivace kontrolních signálních drah u mEK buněk a myších embryonálních fibroblastů

Aktivaci kontrolních drah byla ověřena western blotem pro fosforylovanou formu kinázy Chk1, konkrétně Chk1-Ser345, dále pak sledováním degradace Cdc25A fosfatázy. Oba tyto enzymy jsou důležitou součástí aktivace signálních drah. Na obrázku č. 4 je vidět zvýšená fosforylace Chk1-Ser345 u somatických buněk. Zvýšení fosforylace ukazuje na aktivaci kontrolních signálních drah, což bylo potvrzeno i western blotem ukazujícím degradaci Cdc25A fosfatázy.

U mEK buněk western blot nepotvrdil aktivaci kontrolních signálních drah. U mEK buněk ošetřených 5 μ M DFO nedochází k zvýšení fosforylace Chk1-Ser345, dokonce bylo pozorováno snížení. K degradaci Cdc25A však dochází. Tento nesoulad vysvětlujeme rozdílnou lokalizací Chk1 a Cdc25A u mEK buněk.

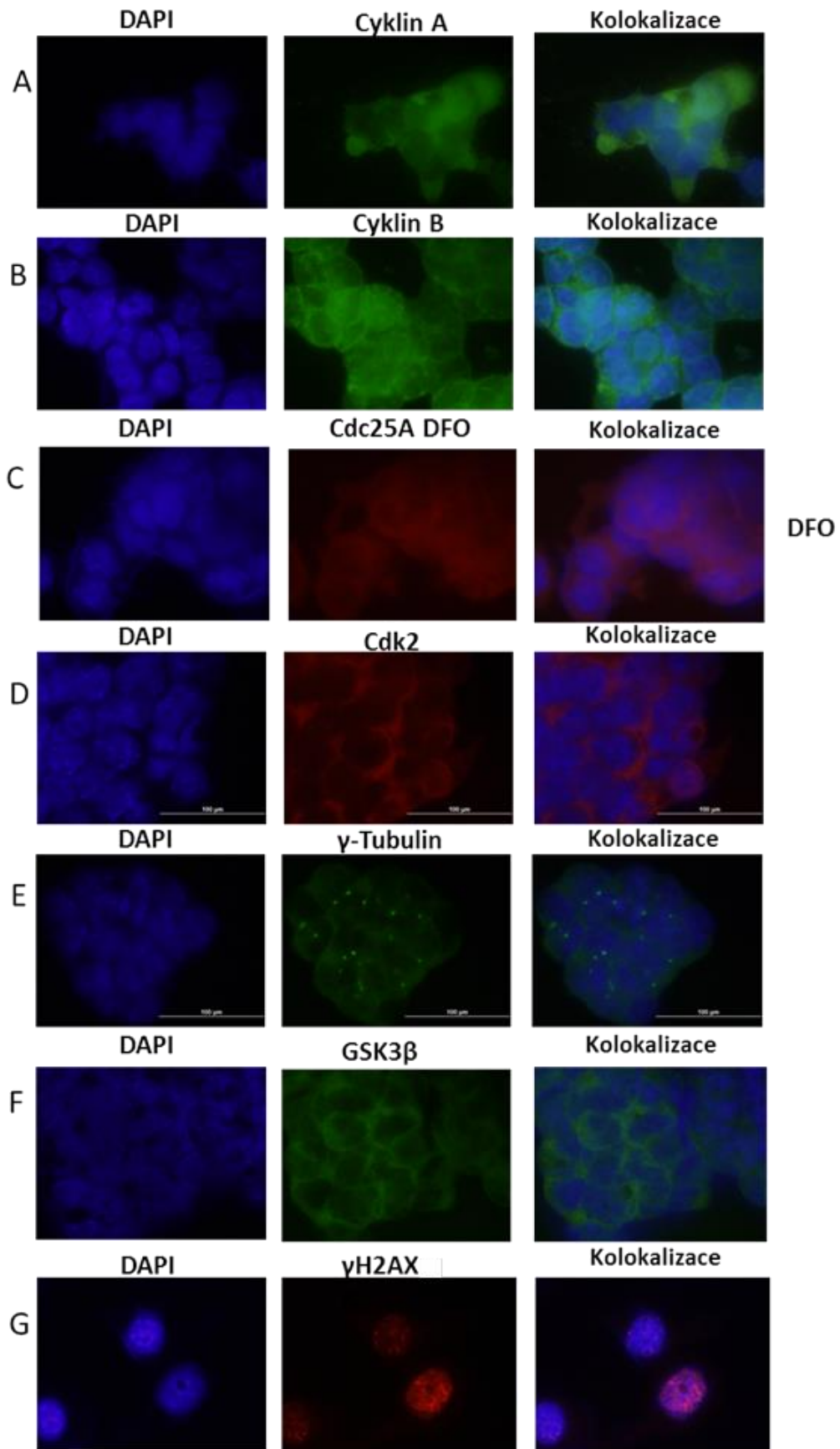
Obrázek č. 4: Detekce fosforylovaného Chk1-Ser345, celkového Chk1 a Cdc25A pomocí western blotu. Kontrola množství proteinu v jednotlivých jamkách byla provedena pomocí aktinu.



6.3. Lokalizace proteinů buněčného cyklu

Imunofluorescencí byla detekována lokalizace molekul buněčného cyklu. Metoda byla prováděna na buněčné linii myších embryonálních kmenových buněk HM1 kultivovaných za nestresových podmínek nebo v přítomnosti desferioxaminu a fixovaných v metanol-acetonové směsi. Všechny vzorky buněk byly kromě cílené protilátky barveny DAPI vážícího se na DNA, díky čemuž bylo možné určit, zda je protein lokalizován v jádře nebo cytoplazmě.

Obrázek č. 3: (A,B) Cykliny A i B se nacházejí, stejně jako je tomu u somatických buněk, v cytoplazmě. (C) Cdc25A je za nestresových podmínek lokalizována v jádře. Na obrázku jsou buňky kultivovány s desferioxaminem v 5 μ M koncentraci, kdy je Cdc25A ubikvitinován a transportován do cytoplazmy, kde dochází k jeho degradaci. (D) Cdk2 se za normálních podmínek u kmenových buněk nachází převážně v cytoplazmě a centrozomech. V případě somatických buněk se nachází v jádře. (E) γ -tubulin je složkou centrozomů, na kterých je u kmenových buněk zakotven Cdk2 a Chk1/2. (F) GSK3 β se v neaktivní formě kumuluje v cytoplazmě. Při stresových podmínkách dochází k jeho aktivaci a exportu do jádra, kde indukuje ubikvitinylaci Cdc25A. U somatických buněk je GSK3 β v jádře. (G) γ H2AX je to histon, který se nachází v místech dvouvláknových zlomů DNA. Jeho detekcí lze tedy odhadnout míru poškození DNA.



7. Diskuze

Embryonální kmenové buňky se v mnoha aspektech liší od buněk somatických. Významný je rozdíl ve struktuře a regulaci buněčného cyklu kmenových buněk. G1 a G2 fáze jsou u kmenových buněk zkrácené. Nejdéle tak kmenová buňka tráví čas v S fázi. Dále se liší v odpovědi na poškození DNA. Při narušení integrity genomu dochází v případě somatických buněk k zastavení buněčného cyklu a opravě DNA. U embryonálních kmenových buněk jsou molekuly této kontrolní dráhy (Cdk2, Chk1, Cdc25A) lokalizovány v odlišných buněčných kompartmentech. To zabraňuje jejich interakci. Transkripční faktor p53 slouží u kmenových buněk pouze pro spuštění apoptózy.

Ionty železa hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu. Jsou důležitým kofaktorem mnoha enzymů řídících buněčnou proliferaci. Příkladem je enzym ribonukleotid reduktáza, která katalyzuje vznik základní stavební jednotky DNA deoxyribonukleotidu. Při chelataci železa dochází u somatických buněk k zastavení buněčného cyklu. Buňka nemůže replikovat DNA v důsledku malého množství dNTPs. Deficit iontů železa nepřímo postihuje i aktivitu dalších molekul buněčného cyklu, jež vedou k zastavení v G1/S fázi.

Odpověď kmenových buněk na chelataci železa nebyla doposud popsána. Kmenové buňky jsou díky své rychlé proliferaci na deficit iontů železa citlivější než buňky somatické. Zabývala jsme se studiem vlivu netoxických koncentrací chelatačního činidla desferioxamin mesylátu na buněčný cyklus embryonálních kmenových buněk.

Pro studium buněčného cyklu byla použita linie embryonálních kmenových buněk V6.5. Odpověď této linie jsme srovnávali s linií somatickou - myšími embryonálními fibroblasty STO. mEK buňky byly kultivovány v médiu s 5 μ M koncentrací chelatačního činidla desferioxaminu po dobu 24 a 48 hodin. Fibroblasty byly kultivovány po dobu 48 a 96 hodin. Časové úseky odpovídají počtu buněčných cyklů. 24 h odpovídá dvěma buněčným cyklům u mEK buněk, stejně jako 48 h u linie STO. U linie STO došlo k úbytku buněk v S fázi a jejich kumulaci v G1 a G2/M fázi, což poukazuje na zastavení buněčného cyklu. V případě HM1 linie, nebyla pozorována žádná změna buněčného cyklu.

Dále jsme pozorovali aktivaci kontrolních signálních drah. U linie STO bylo pozorováno zvyšování množství fosforylovaného Chk1 (aktivovaného) při vystavení

chelatačnímu činidlu. Aktivací Chk1 docházelo ke snižování proteinu Cdc25A. V případě linie V6.5 byl pozorován mírný úbytek fosforylovaného Chk1, přesto došlo ke snižování Cdc25A. Výsledek poukazuje na to, že degradace Cdc25A není u embryonálních kmenových buněk zprostředkovávána prostřednictvím Chk1 jako je tomu u somatických buněk. Chybějící komunikaci mezi Chk1 a Cdc25A vysvětlujeme rozdílnou lokalizací. Cdc25A je v jádru, Chk1 je na centrozomech.

V průběhu mé práce jsem se zabývala lokalizací různých proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu. Lokalizaci jsem pak srovnávala s lokalizací těchto proteinů u somatických buněk. Výrazně odlišná je lokalizace GSK3- β , která se u mEK buněk nachází v cytoplazmě. U ostatních proteinů se lokalizace nelišila.

8. Závěr

V bakalářské práci byla zpracována literární rešerše na téma regulace buněčného cyklu embryonálních kmenových buněk a vliv deprivace iontů železa na signální dráhy buněčného cyklu.

V praktické části byla studována dynamika buněčného cyklu myších embryonálních kmenových buněk a myších embryonálních fibroblastů v přítomnosti netoxické koncentrace chelatačního činidla železnatých iontů desferioxaminu. Výsledky poukázaly na to, že u fibroblastů dochází vlivem chelatačního činidla k zastavení buněčného cyklu, kdežto u embryonálních kmenových buněk k zastavení buněčného cyklu nedochází. Dále byly detekovány u těchto buněk proteiny kontrolní dráhy Cdc25A a aktivovaný Chk1. Bylo prokázáno, že u embryonálních kmenových buněk, nedochází k aktivaci Chk1 a k degradaci Cdc25A dochází jinou cestou.

9. Literatura

Abcouwer SF, Schwarz C, Meguid RA. (1999): Glutamine deprivation induces the expression of GADD45 and GADD153 primarily by mRNA stabilization. *J Biol Chem*; 274:2864551.

Agner J., Falck J., Lukas J., Bartek J. (2005): Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway. *Experimental Cell Research* 302: 162–169

An W.G., Kanekal M., Simon M.C., Maltepe E., Blagosklonny M.V., Neckers L.M.(1998): Stabilization of wildtype p53 by hypoxiainducible factor 1alpha. *Nature*392: 4058.

Bartek J., Lukas J. (2001a): Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters* 490: 117-122

Bartek J., Lukas J. (2001b): Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 738–747.

Bartek J.,Lukas J. (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *CANCER CELL* 3: 421-429.

Bulavin D.V.,Higashimoto Y., Popoff I.J., Gaarde W.A.,Basrur V.,Potapova O., Appella E., Fornace A.J. (2001): Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *NATURE* 411: 102-107.

Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. (1999): HIF1mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids* 27:42237.

Bulavin D.V., Higashimoto Y., Popoff I.J., Gaarde W.A., Basrur V., Potapova O., Appella E., Fornace A.J. (2001): Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *NATURE* 411: 102-107.

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace Jr AJ. (1999): Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates Nterminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J*; 18:684554.

Caldecott K. W. (2008): Single-strand break repair and genetic disease. *Nature* 9: 619-631.

Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H., Lensch W.M., Andrews P.W., Itskovitz-Eldor J., Daley M.D. (2004): LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 22:770–778.

Darnell G, Richardson DR. (1999) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents III: The effect of the ligands on molecular targets involved in proliferation. *Blood*; 94:78192.

Deans A. J., West S. C. (2011): DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature* 11: 467-480.

Delavaine L., La Thangue N.B.. (1999): Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*; 18:538192.

Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I. (2000): Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*; 403:776-81.

Donzelli M., Draetta G.F. (2003): Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* 4: 671-677

Dong Fu, Des R. Richardson (2007): Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{CIP1/WAF1} by iron depletion. *BLOOD* 110: 752-761.

Dong Z, Zhang JT. (2003): EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression. *Mol Biol Cell*; 14:394251.

Dreesen O., Brivanlou A. H., (2007): Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Rev* 3:7–17.

Freund A., Patil Ch., Campisi J. (2011): p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal* 30: 1536–1548.

Gao J., Lovejoy D., Richardson D.R. (1999): Effect of iron chelators with potent anti-proliferative activity on the expression of molecules involved in cell cycle progression and proliferation. *Redox Report*;4:311–312.

Gao J, Richardson D.R. (2001): The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: The mechanisms involved in inhibiting cellcycle progression. *Blood*; 98:84250.

Gunshin H., Allerson C.R., Polycarpou-Schwarz M., Rofts A., Rogers J.T., Kishi F., Hentze M.W., Rouault T.A., Andrews N.C., Hediger M.A. (2001) Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett* 509: 309–316.

Gunshin H., Starr C.N., Drenzo C., Fleming M.D., Jin J., Greer E.L., Sellers V.M., Galica S.M., Andrews N.C.. (2005): Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*; 106:2879-83.

Hollander M.C., Sheikh M.S., Yu K., Zhan Q., Iglesias M., Woodworth C., Fornace A.J. (2001): Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors. *Int J Cancer* ; 96:2231.

Humphrey R.K., Beattie G.M., Lopez A.D., Bucay N., King Ch.C., Firpo M.T., Rose-John S., Hayek M.D.A. (2004): Maintenance of Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells Is STAT3 Independent. *STEM CELLS* 22:522–530.

Hyun S., Rosen E.M., Jang Y. (2012): Novel DNA damage checkpoint in mitosis: Mitotic DNA damage induces re-replication without cell division in various cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423: 593–599.

Chua A.C.G, Graham R.M., Trinder D., Olynyk J.K. (2007): The Regulation of Cellular Iron Metabolism . *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 44: 413-459.

Jordan A., Reichard P. (1998): Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67:7198

Kaiser BK, Zimmerman ZA, Charbonneau H, Jackson PK. (2002): Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Mol Biol Cell* 13: 2289-2300.

Kawabata H., Germain R.S., Vuong P.T., Nakamaki T., J. W. Saidi J. W., Koeffler H. P. (2000): Transferrin Receptor 2-a Supports Cell Growth Both in Iron-chelated Cultured Cells and *in Vivo*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275: 16618–16625.

Khanna K.K., Jackson S.P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature* 27: 247-254.

Kitagawa R., Bakkenist Ch. J., McKinnon P. J., Kastan M.B. (2004): Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM–NBS1–BRCA1 pathway. *GENES & DEVELOPMENT* 18:1423–1438.

Kitaura H., Shinshi M., Uchikoshi Y., Ono T., IguchiAriga S.M., Ariga H.. (2000): Reciprocal regulation via proteinprotein interaction between cMyc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* 275:1047783.

Koledova Z.,Raskova Kafkova L., Kramer A., Divoký V. (2010): DNA Damage-Induced Degradation of Cdc25A Does Not Lead to Inhibition of Cdk2 Activity in Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 28: 450–461.

Koorts A.M., Viljoen M. (2007): Ferritin and ferritin isoforms I: Structure–function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Archives of Physiology and Biochemistry* 113: 30 – 54.

Kovacevic Z., Richardson R. (2006): The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis* 27: 2355–2366.

Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V., Rubtsov N.B., Kiselev S.L.(2010): Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal* 46:284–293.

Latunde-Dada G.O., Van der Westhuizen J., Vulpe C.D., Anderson G.J., Simpson R.J., McKie A.T. (2002): Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis*; 29:356-60.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. (1996): Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*; 271:2060816.

Lawen A. (2003): Apoptosis-an introduction. *Bioessays*; 25:888-896.

Le N.T., Richardson D.R.. (2002): The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1603:31-46.

Le NT, Richardson DR. (2004): Competing pathways of iron chelation: Angiogenesis or antitumor activity: Targeting different molecules to induce specific effects. *Int J Cancer* 110:468-469.

Liang S.X., Richardson DR. (2003): The effect of potent iron chelators on the regulation of p53: Examination of the expression, localization and DNA binding activity of p53 and the transactivation of WAF1. *Carcinogenesis* 24:160114.

Luo Y., Hurwitz J., Massague J. (1995): Cellcycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*; 375:15961.

Marión R.M., Blasco M.A. (2010): Telomeres and telomerase in adult stem cells and pluripotent embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol* 695: 118-131.

Mizutani A, Furukawa T, Adachi Y, Ikehara S, Taketani S. (2002): A zincfinger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem* 277:158518.

Morgan E.H., Oates P.S. (2002): Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol Dis*; 29:384-399.

Munro, E., Nance, J. & Priess, J. R. (2004): Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior–posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell* 7, 413–424.

Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. (2004): Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306:2090-3.

Nguyen T., Brunson D., Crespi C. L., Penman B. W., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. (1991): DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3030-3034.

Niederkofler V., Salie R., Arber S. (2005): Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest* 115:2180-21806.

Nurtjahja-Tjendraputra E., Fu D., Phang J.M., Richardson D.R. (2007): Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth suppression. *BLOOD* 109: 4045-4054.

Nyholm S., Mann G.J., Johansson A.G., Bergeron R.J., Graslund A., Thelander L. (1993): Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem* 268:26200-26205.

Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. (2004): Mutations in *HFE2* cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36:77-82.

Raffin S.B., Woo Ch.H., Roost K.T., Price D.C., Schmid R. (1974): Intestinal Absorption of Hemoglobin Iron-Heme Cleavage by Mucosal Heme Oxygenase. *The Journal of Clinical Investigation* 54: 1344-1352.

Reyal T., Morrison S.J., Michael F. Clarke³ & Irving L. Weissman (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *NATURE* 414: 105-111.

Richter G.V. (1986): Studies of Iron Overload: Lysosomal Proteolysis of Rat Liver Ferritin. *Pathology - Research and Practice* 181: 159-167

Sanchez M., Galy B., Dandekar T., Bengert P, Vainshtein Y, Stolte J, Muckenthaler MU, Hentze MW. (2006): Iron regulation and the cell cycle: Identification of an ironresponsive element in the 3' untranslated region of human civisell dion cycle 14A mRNA by a refined microarray based screening strategy. *J Biol Chem*; 281: 22865-22874.

Savatier P., Malashicheva A. (2004): Cell-Cycle Control in Embryonic Stem Cells. Handbook of Stem Cells 1: 53-6.

Shayeghi M., Latunde-Dada G., Oakhill J., Laftah A., Takeuchi K., Halliday N., Khan, Alice Warley Y., McCann F., Hider R., Frazer D., Anderson G., Vulpe Ch., Simpson R., McKie A. (2005): Identification of an intestinal heme transporter. Cell 122: 789-80

Sherley J.L. (2002): Asymmetric Cell Kinetics Genes: The Key to Expansion of Adult Stem Cells in Culture. STEM CELLS 20: 561-572.

Stark G.S., Taylor W.R. (2006): Control of the G2/M Transition. MOLECULAR BIOTECHNOLOGY 32: 227-248

Suemori H., Nakatsuji N., (1987): Establishment of the Embryo-derived Stem (ES) Cell Lines from Mouse Blastocysts: Effects of the Feeder Cell Layer. Develop. Growth and Differ.. 29: 133-139.

Tipton A.R., Wang K., Oladimeji P., Sufi S., Gu Z., Liu S. (2012): Identification of novel mitosis regulators through data mining with human centromere/kinetochore proteins as group queries. BMC Cell Biology 13:15

Vaghefi S. H. E. a kol., (2009): Isolation and primary culture of ES-like colonies from NMRI mouse embryos. Iranian Journal of Reproductive Medicine 7: 145-152.

Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G.J. (1999): Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. Nat Genet 21:195-199.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci USA; 92:55104.

Weiss RH. (2003): p21^{Waf1/Cip1} as a therapeutic target in breast and other cancers. Cancer Cell; 4:4259.

Wobus A. M., Bohler K. R. (2005): Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev* 85: 635–678.

Woo R.A., Poon R.Y.C. (2003): Cyclin-Dependent Kinases and S Phase Control in Mammalian Cells. *Cell Cycle* 2: 316-324

Yang J., Yu Y., Hamrick H. E., Duerksen-Hughes P. J. (2003): ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24: 1571-1580.

Yoon G, Kim HJ, Yoon YS, Cho H, Lim IK, Lee JH. (2002): Iron chelation induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: Association of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mediated p27Kip1 expression. *Biochem J*; 366:61321.

Yu Y., Kovacevic Z., Richardson D. R. (2007): Tuning Cell Cycle Regulation With an Iron Key. *Cycle* 6: 1982-1994

Zerbini LF, Liebermann TA. (2005): GADD45 deregulation in cancer: Frequently methylated tumor suppressors and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res*; 11:640913.

Zhan Q, Lord KA, Alamo Jr I, Hollander MC, Carrier F, Ron D, Kohn KW, Hoffman B, Liebermann DA, Fornace Jr AJ. (1994): The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol*; 14:236171.

<http://www.eurostemcell.org/factsheet/embryonic-stem-cell-research-ethical-dilemma>

10. Seznam použitých zkratek

APC	anafáze podporující komplex
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	bovinní sérový albumín
Cdk	cyklin-ependentní kináza
DCYTB	duodenal cytochrom b
DFO	Deferoxamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMT1	proteinu divalent metal transporter-1
EK	embryonální kmenové buňky
mEK	myší embryonální kmenové buňky
ERK	extracellular signal regulated kinase
GDDA	growth arrest and DNA damage-inducible genes
HCP1	heme carrier protein
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
HJV	hemojuvelin
IRP	iron regulatory protein
LIF	Leukemický inhibiční faktor
LSB	Laemmli buffer
MCM	minichromosome maintenance
ORC	origin recognition komplex
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	propidiumiodid
PLAGL2	pleomorphic adenoma gene like 2
PLK1	polo-like kináza1
pRb	retinoblastomový protein
SDS	dodecylsírán sodný
TEMED	N,N,N'-Tetramethyl-ethylene diamine
Tf	transferrin
TfR1	transferrin receptor 1

TfR2	transferrin receptor 2
TGF- β 1	transformující růstový faktor β 1
TNF-R	tumor-necrosis faktor receptor