

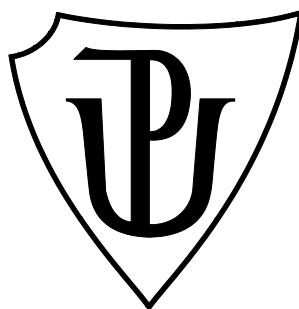
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Erik Šebrle

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití průtokové cytometrie pro analýzu regulace
buněčného cyklu po treatmentu deriváty ze skupiny
Trögerových bází.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Erik Šebrle

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Molekulární a buněčná biologie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Petr Konečný

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 5. 5. 2014

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval především vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Petru Konečnému za odborné vedení, předané zkušenosti, cenné rady a připomínky, věnovaný čas a přátelský přístup v průběhu psaní této bakalářské práce. Mé díky patří také Renatě Buriánové za ochotu, trpělivost a vstřícnost a v neposlední řadě i všem zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny při Ústavu Molekulární a Translační Medicíny, Lékařské Fakulty Univerzity Palackého a Fakultní Nemocnice v Olomouci za pomoc v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení	Erik Šebrle
Název práce	Využití průtokové cytometrie pro analýzu regulace buněčného cyklu po treatmentu deriváty ze skupiny Trögerových bází.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav Molekulární a Translační Medicíny LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Petr Konečný
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Počty pacientů, kterým bylo diagnostikováno nádorové onemocnění, se rok od roku zvyšuje. Proto se vyvíjí veliké úsilí na identifikaci všech příčin nádorových onemocnění a hledání nových potenciálních léčiv majících protinádorovou aktivitu, včetně hledání jejich molekulárních cílů. Předmětem této bakalářské práce je monitorování účinku derivátů Trögerových bází na regulaci buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie s využitím buněčné nádorové linie lidské akutní lymfoblastické leukemie CCRF-CEM. Pro zjištění účinku Trögerových bází byly využity analýzy - buněčného cyklu, apoptózy, syntézy DNA, RNA a metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10. V této práci jsme identifikovali řadu zajímavých analogů Trögerových bází, které působily na regulaci buněčného cyklu.</p>
Klíčová slova	Buněčný cyklus, buněčná smrt, Trögerovy báze, průtoková cytometrie
Počet stran	57
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Erik Šebrle
Title	Application of flow cytometry for analysis of cell cycle regulation after treatment with group of Tröger base compounds.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and dentistry, Palacký University and Faculty Hospital in Olomouc
Supervisor	Mgr. Petr Konečný
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Number of patients diagnosed with cancer is getting higher every year. Therefore, great effort for identification of causes and new potential anticancer drugs and its molecular targets is very important these days. Subject of this thesis is the monitoring of Tröger base derivatives activity, based on their ability to regulate the cell cycle. Human acute lymphoblastic leukemia cell line (CEM) was used and processed for flow cytometric analysis. For Tröger base activity, analysis of cell cycle, apoptosis, synthesis of DNA, RNA and method of phosphohistone H3-PSer10 phosphorylation were used. We have identified several interesting Tröger base analogues actively affecting cell cycle, in this thesis.</p>
Keywords	Cell cycle, cell death, Tröger base, flow cytometry
Number of pages	57
Number of appendices	2
Language	Czech

Obsah

Seznam použitých zkratek	9
Úvod.....	11
Cíle práce:	12
1.1 Teoretická část	13
1.1.1 Buněčný cyklus.....	14
1.1.1.1 Fáze buněčného cyklu	14
1.1.1.1.1 Interfáze	14
1.1.1.1.2 Mitotická fáze	16
1.1.1.2 Regulace buněčného cyklu	17
1.1.1.2.1 Tumor supresorové geny	18
1.1.1.2.2 Protoonkogeny.....	19
1.1.1.2.3 Cykliny a cyklin-dependentní kinázy	20
1.1.1.2.3.1 Rozdělení CDK podle účasti ve fázích buněčného cyklu.....	21
1.1.2 Buněčná smrt	22
1.1.2.1 Formy buněčné smrti	22
1.1.2.1.1 Anoikis	22
1.1.2.1.2 Apoptóza.....	22
1.1.2.1.2.1 Molekulární mechanismus apoptózy	23
1.1.2.1.3 Nekróza.....	25
1.1.3 Mechanizmy účinku protinádorových léčiv	26
1.1.4 Trögerovy báze	28
1.1.4.1 Využití Trögerových bází.....	28
1.1.4.2 Analogy Trögerových bází a interakce s DNA	29
1.1.5 Průtoková cytometrie.....	29
1.1.5.1 Základní komponenty průtokového cytometru	30
1.1.5.2 Princip průtokové cytometrie	30
1.1.5.3 Využití průtokové cytometrie.....	32
1.2 Experimentální část.....	33
1.2.1 Použité metody	34
1.2.1.1 Pasážování buněk	34
1.2.1.2 MTT test	34
1.2.1.3 Analýza regulace buněčného cyklu	35

1.2.1.3.1	Postup fixace buněk.....	35
1.2.1.3.2	Analýza buněčného cyklu: propidium jodid.....	36
1.2.1.3.3	Analýza syntézy RNA pomocí 5-bromouridinu.....	36
1.2.1.3.4	Analýza syntézy DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu.....	37
1.2.1.3.5	Metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10.....	37
Výsledky	38
1.2.2	MTT test	38
1.2.3	Analýza buněčného cyklu.....	39
1.2.4	Apoptóza.....	41
1.2.5	Analýza syntézy RNA pomocí 5-bromouridinu	43
1.2.6	Analýza syntézy DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu	44
1.2.7	Metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10	46
Diskuze	49
Závěr	51
Seznam použité literatury	52
Přílohy.		

Seznam použitých zkratek

Aj.	A jiné
APC	Tumor supresorový gen
ATP	Adenosintrifosfát
Bak	Člen rodiny Bcl-2
Bax	Člen rodiny Bcl-2
Bcl-2	B buňky leukemie (lymphoma)
BH3	Bcl-2-homolog 3
Bid	Člen rodiny Bcl-2
Bim	Člen rodiny Bcl-2
BRCA 1	Tumor supresorový gen
BRCA 2	Tumor supresorový gen
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BrU	5-bromuridin
BSA	Bovine serum albumin/Hovězí sérový albumin
CARD	Strukturní motiv dlouhé prodomény kaspázy
CD95	Antigen apoptózy
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CDKN1A	Inhibitor CDK
CIP1-WIF1	Inhibitor CDK
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
DCC	Tumor supresorový gen
DED	Strukturní motiv dlouhé prodomény kaspázy
DISC	Komplex signalizující indukci apoptosy
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E2F	Rodina transkripčních faktorů
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
Erb	Rodina onkogenů
FADD	Adaptorový protein/Fass sdružený s doménou smrti
FAS	Receptor na plazmatické membráně
FBS	Fetální bovinní sérum
FITC	Fluorescein izothiokyanát
FS	Forward scatter
FSC	Forward scatter channel

INK4	Inhibitor CDK
MDM-2	Rodina onkogenů
Mort1	Adaptorový protein
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
např.	Například
NP-40	Detergent – Nonidet™ P 40 substitute
p53	Transkripční faktor, produkt genu TP53
PBS	Fosfátový pufr
PI	Propidium jodid
pRb	Retinoblastomový protein
PUMA	Člen rodiny Bcl-2
RAS	Rodina onkogenů
Rb gen	Retinoblastomový gen
RIP1	Serin/threonin kináza regulující nekrozu
RNA	Ribonukleová kyselina
RNáza A	Ribonukleáza A
ROS	Reaktivní formy kyslíku
rRNA	Ribozomální RNA
SDS	Dodecylsírán sodný
SS	Side scatter
SSC	Side scatter channel
T-buňky	Druh bílých krvinek ze skupiny lymfocytů
Tj.	To je
TNF	Nádorový nekrotický faktor
TNFR1	Povrchový receptor
TP53	Tumor supresorový gen
tzv.	Takzvaný
WT1	Tumor supresorový gen
WT2	Tumor supresorový gen

Úvod

Počty pacientů, kterým bylo diagnostikováno nádorové onemocnění, se rok od roku zvyšuje. Proto se vyvíjí veliké úsilí na identifikaci všech příčin nádorových onemocnění a hledání nových potenciálních léčiv majících protinádorovou aktivitu, včetně hledání jejich molekulárních cílů. Existuje celá řada chemických sloučenin, které svými protinádorovými, cytostatickými, antibakteriálními a jinými aktivitami zaměstnávají mnohé výzkumné ústavy po celém světě. Předmětem této bakalářské práce je monitorování účinku derivátů Trögerových bází na regulaci buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie s využitím buněčné nádorové linie lidské akutní lymfoblastické leukemie CCRF-CEM. Analogy ze skupiny Trögerových bází se jeví jako látky, které by mohly mít potenciální protirakovinné účinky - ať už díky schopnostem některých derivátů inhibovat telomerázovou činnost nebo se vázat s vysokou afinitou k fosfátové páteři DNA. Pro zjištění účinku Trögerových bází na regulaci buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie byly využity dílčí analýzy buněčného cyklu, apoptózy, syntézy DNA, syntézy RNA a fosforylace fosfohistonu H3-PSer10, jakožto markeru mitózy. Měření regulace buněčného cyklu na základě různých látek poskytuje komplexní přehled o aktivitě derivátů a představuje výchozí bod pro další analýzy ke zjištění specifického cíle a potenciálního uplatnění v klinické praxi.

Cíle práce:

1. Vypracování literární rešerše z dostupných literárních zdrojů.
2. Identifikace potenciálních protinádorových léčiv metodou průtokové cytometrie.
3. Základní screening analogů derivátů Trögerových bází.

1.1 Teoretická část

1.1.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus - proces, kterým prochází somatické buňky mezi svými jednotlivými buněčnými děleními, bývá obvykle členěn do dvou fází - **interfáze** a fáze vlastního dělení **M fáze**. Interfáze tvoří převážnou část buněčného cyklu, skládá se z G1, (G0), S a G2 fáze, kdežto M-fáze tvoří jen jeho krátkou část. V interfázi dochází k buněčnému růstu, množování organel, makromolekul a syntéze DNA. DNA replikace probíhá ve fázi označované jako S fáze buněčného cyklu. Tato fáze je dále typická pro syntézu histonů, které buňka potřebuje pro zdvojnásobení počtu nukleozómů ve svých chromozómech a pro syntézu molekul RNA. M fáze zahrnuje mitózu, ve které jsou rodičovské chromozómy duplikovány za tvorby shodných sesterských chromatid a následně rozděleny do dvou jader, a cytokinezi, ve které dochází k vlastnímu rozdělení buňky za vzniku buněk dceřiných. (Karp, 2013) Časový úsek mezi jednotlivými děleními se označuje jako **generační doba**. Replikace a segregace chromozómů do dceřiných buněk musí proběhnout ve správném pořadí v každém buněčném dělení. Pokud dojde k segregaci chromozómů předtím, než je dokončena jejich replikace, bude alespoň jedna dceřiná buňka bez části genetické informace. Podobně, pokud dojde k opětovné replikaci ve stejné oblasti chromozómu předtím, než nastane buněčné dělení, zvýší se počet genů kódovaných v této oblasti v poměru k ostatním genům, což je jev, který obvykle vede k nerovnováze genové exprese, která je neslučitelná s vitalitou. (Lodish, 2013)

1.1.1.1 Fáze buněčného cyklu

Aby se buňka mohla rozdělit, musí nejdříve přesně zdvojnásobit svůj obsah DNA a zdvojit svou cytoplazmu včetně organel a makromolekul. Poté se buňka rozdělí pochodem označovaným jako mitóza, po mitóze dochází k rozdělení cytoplazmy mezi dceřinými buňkami - cytokineze. Období mezi dalším buněčným dělením se označuje jako interfáze.

1.1.1.1.1 Interfáze

Interfáze představuje minimálně 90 % z celkového času buněčného cyklu. Biologická aktivita interfázní buňky je velmi vysoká. Interfáze proto bývá někdy označována jako období kontinuálního růstu. Buňky potřebují často podstatně více času na růst a zdvojnásobení svých organel a proteinů, než vyžadují pro replikaci DNA. Proto většina buněčných cyklů obsahuje G1 a G2 fáze (z anglického gap - mezera). Jádro buňky

je v interfázi od cytoplazmy ohraničené jadernou blánou, která odděluje vnitřní prostředí jádra od cytoplazmy. Interfáze se skládá z G1, (G0), S a G2 fáze (viz schéma 1).

Po ukončení mitózy buňka vstupuje do **G1 fáze**, v průběhu které dochází k syntéze DNA polymerázy, RNA, tubulinu a bílkovin. Interfázní chromozóm je v průběhu G1 fáze jednochromatidový a obsahuje jednu dvouvláknovou molekulu DNA. Pokud jsou však extracelulární podmínky nepříznivé, mohou buňky odložit postup přes G1 kontrolní bod, popřípadě mohou vstoupit do speciálního klidového stavu nazývaného **G0 fáze**. V G0 fázi může daná buňka zůstat před obnovením proliferace hodiny, dny, týdny, nebo dokonce i roky. (Alberts, 2008) V případě, že jsou vhodné extracelulární podmínky, a pokud jsou přítomny signály pro růst a dělení, buňky mohou pokračovat v buněčném cyklu. Výjimkou jsou například neurony, plně diferenciované buňky, které zůstávají neustále v G0 fázi, protože plně diferenciované buňky se již dále nedělí. V průběhu **S fáze** (fáze syntetická) buňka syntetizuje DNA - dochází k replikaci DNA, syntéze histonů, následné duplikaci chromozómů a u živočišných buněk k duplikaci dvou centriol. Replikace chromozómů neprobíhá synchronně u všech chromozómů. K synchronní replikaci dochází například u homologních párů autozomů. (Otová, 2012) V S fázi se tak chromozómy stávají dvouchromatidovými a množství jaderné DNA je zdvojnásobené. V **G2 fázi**, jsou chromozómy stále dvouchromatidové (dvě totožné molekuly DNA) se zdvojnásobeným obsahem jaderné DNA. Tato fáze je typická metabolickou aktivitou a růstem buňky. Dochází k postreplikačním opravám a molekuly DNA interagují s histony. Na konci G2 fáze se začínají kondenzovat chromatinová vlákna.

Ke konci interfáze je jádro buňky největší. Jaderná blána stále ohraničuje jádro obsahující minimálně jedno jadérko. U vnější strany jádra se vyskytují dva páry centriolů, které vznikly rozdělením jednoho páru v průběhu interfáze. Kolem každého páru centriolů se vytvořila tzv. astrosféra (nebo také centrosféra) vzniklá polymerizací tubulinu, která tak tvoří mikrotubuly uspořádané v kruhové řadě kolem párů centriol.

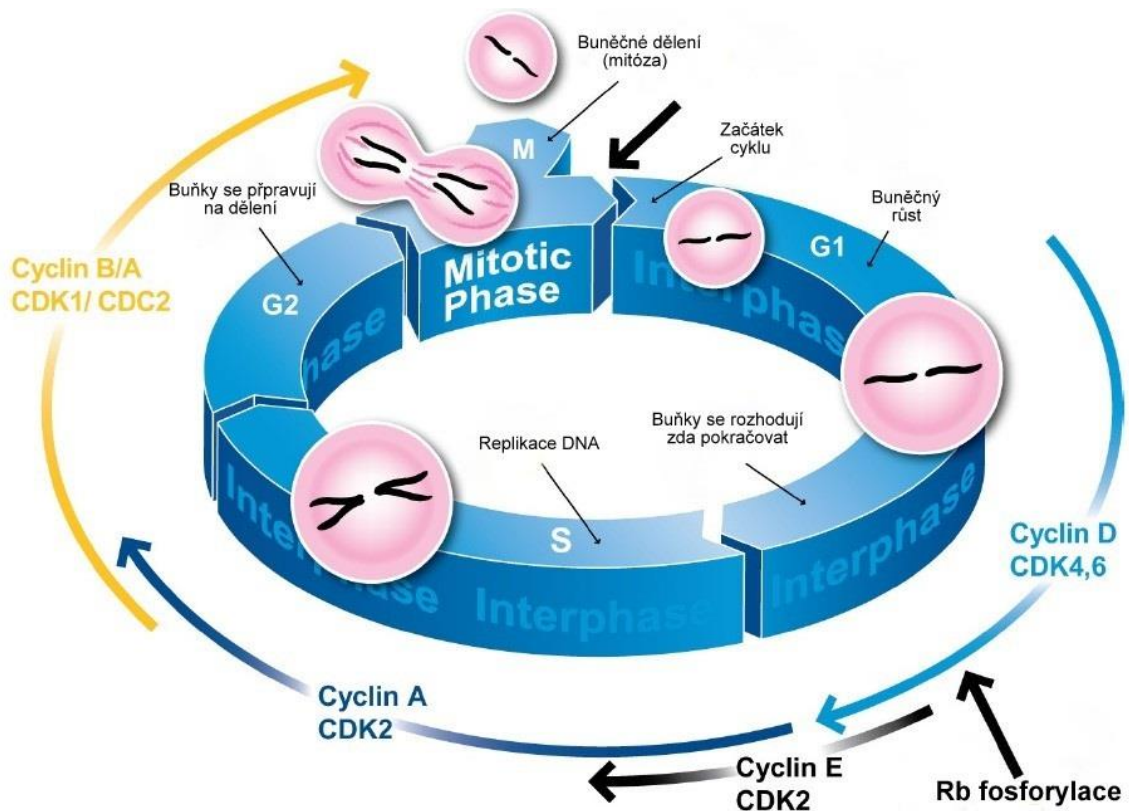


Schéma 1: Události buněčného cyklu a zapojení cyklin-dependentních kináz a cyklinů.

(Upraveno podle internetový zdroj 2)

1.1.1.1.2 Mitotická fáze

M fáze buněčného cyklu se nachází u eukariotních organismů a je mechanismem zjišťujícím genetickou identitu tělních buněk. Obvykle je dělena do pěti fází – profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze. Každá z těchto fází je typická pro určitý sled událostí. Je nutné zmínit, že tyto etapy reprezentují úsek souvislého procesu. Dělení mitózy do těchto etap se tedy uskutečňuje výhradně kvůli experimentům a diskusi. (Karp, 2013)

Během **profáze** v jádře mizí jadérka. Vlákna chromozómů se kondenzují za tvorby mitotických chromozómů pozorovatelných pod světelným mikroskopem. Každý chromozóm je tvořen dvěma sesterskými chromatidami spojenými v oblasti primární konstriktce (centromery), ve které jsou také lokalizovány dva multiproteinové útvary kinetochory. Každá chromatida v tomto okamžiku disponuje jedním kinetochorem. Páry centriolů se posouvají směrem od sebe k opačným pólům buňky v důsledku prodlužování

svazků mikrotubulů. Dochází k tvorbě dělicího (mitotického) vřeténka složeného z mikrotubulů a proteinů lokalizovaných mezi dvěma páry centriolů. Vlákna mitotického vřeténka jsou složena z kinetochorových a polárních vláken. Kinetochorová vlákna sahají směrem od centriolů ke kinetochorům, zatímco polární vlákna od pólů buňky směrem k jejímu rovníku. (Alberts, 2008) V průběhu profáze se dočasně pozastavuje genetická aktivita chromozómů. Poté následuje **prometafáze**, ve které se rozpadá jaderná blána na malé vezikuly. Kinetochorová vlákna dělicího vřeténka se připojují ke kompaktním, maximálně spiralizovaným chromozómům v oblasti kinetochorů a to tak, že každý dvouchromatidový chromozóm je spojen se dvěma kinetochorovými vlákny - vždy jedno kinetochorové vlákno z obou pólů. (Karp, 2013) V **metafázi** se centromery chromozómů shromažďují v ekvatoriální rovině buňky. Centromery spojující obě chromatidy se začínají rozdělovat. Metafáze je období, které je nejvhodnější k identifikaci a počítání chromozómů. Chromozómy jsou dynamicky stabilní. Následuje **Anafáze**, ve které se od sebe separují sesterské chromatidy. Sesterské chromatidy jsou taženy k opačným pólům nejdříve v důsledku zkracování mikrotubulů a později navíc oddalováním obou pólů buňky od sebe. (Lodish, 2013) Tímto vznikají dceřiné chromozómy. Před začátkem telofáze mají oba póly buňky totožné sestavy chromozómů. V průběhu **telofáze** jsou depolarizovány mikrotubuly dělicího vřeténka. Sady dceřiných chromozómů jsou lokalizovány při protilehlých pólech buňky, kde je iniciována tvorba dceřiných jader. Začíná se reformovat jaderná blána z vezikul rodičovské jaderné blány a vezikul pocházejících z endoplazmatického retikula. Ke konci telofáze se dekondenzují chromozómy a v místech sekundárních konstrikcí se objevují jádérka. Následuje **cytokineze** – proces, kterým se živočišná buňka za pomoci kontraktálního prstence tvořeného aktinem a myosinem rozdělí na dvě buňky dceřiné. (Alberts, 2008) Cytokineze probíhá většinou paralelně s telofází.

1.1.1.2 Regulace buněčného cyklu

Pro složité mnohobuněčné organizmy je regulace buněčného cyklu nepostradatelným procesem, prostřednictvím jehož je dosahováno harmonické funkčnosti organismu, ve kterém dochází k dělení pouze těch buněk, u kterých je to v dané chvíli potřebné. Regulace buněčného cyklu je tedy proces zodpovědný zejména za signály k proliferaci nebo diferenciaci buněk, synchronizaci dějů uvnitř buňky jako jsou replikace DNA, mitóza a cytokineze. Mezi nejvýznamnější regulátory buněčného cyklu patří

zejména tumor supresorové geny, protoonkogeny a cyklin-dependentní kinázy s jejich cykliny.

1.1.1.2.1 Tumor supresorové geny

Mezi regulátory buněčného cyklu patří například **tumor supresorové geny**, jenž kódují proteiny, které se uplatňují při inhibici růstu a proliferaci buněk. Zástupcem může být gen Rb1, který je lokalizován na q raménku třináctého chromozómu (13q14). Tento gen je aktivní u většiny somatických buněk. Jeho produktem je Rb protein (pRb), který patří mezi jaderné transkripční faktory. Rb protein je aktivní v případě, že je málo fosforylovaný, nebo nefosforylovaný. Tento protein hraje důležitou roli v regulaci buněčného dělení při indukci apoptózy a v průběhu diferenciaci. Hlavní úlohou aktivního Rb (retinoblastomového) proteinu je především aktivace transkripčních faktorů rodiny E2F. Dále je na regulaci retinoblastomového proteinu založen například **restrikční bod** u živočišných buněk, který se nachází u konce G1 fáze, a který je odpovědný za kontrolu přechodu buněk z G1 do S fáze. (Otová, 2012; Alberts, 2008) Transkripční faktory z rodiny E2F mají zásadní úlohu v kontrole buněčného cyklu. Regulují aktivitu genů podílejících se na progresi buněčného cyklu, apoptózy a syntéze DNA. Transkripci genů vedoucích k tvorbě produktů, nezbytných pro průchod přes G1/S kontrolní bod, jako jsou například cykliny E a D (viz Cykliny a cyklin-dependentní kinázy), potlačuje komplex pRb-E2F. Tím dochází k pozastavení buněčného cyklu. Neaktivní fosforylovaná forma pRb vede k uvolnění pRb z vazby s proteiny, jenž dovolují postup přes G1/S kontrolní bod. Rb proteiny se vyskytují v somatických buňkách neustále, dochází pouze k jejich fosforylaci a defosforylaci v průběhu buněčného cyklu. V neaktivní fosforylované formě se pRb vyskytují v průběhu S, G2 a M fáze. (Viatour, 2011; Otová, 2012) Dalším genem patřícím mezi tumor supresorové geny je gen **TP53**, který je lokalizován na krátkém raménku sedmnáctého chromozómu (17p13). Gen TP53 se podílí na regulaci přechodu buňky skrze buněčný cyklus. Produktem tohoto genu je protein p53, transkripční faktor vázající se na další geny, jejichž produkty jsou schopny vyvolat apoptózu, dočasně zastavit buněčný cyklus, nebo opravovat DNA. Proto buňky reagují na poškození DNA vzniklé například působením ultravioletového záření zvýšením produkce proteinu p53. Příkladem genů, na které se vážou proteiny p53, a regulují je tak, mohou být inhibitory cyklin-dependentních kináz CDKN1A, INK4 a CIP1-WIF1. (Cerveira, 2012; Bertheau, 2008; Petitjean, 2007) Mezi další tumor supresorové geny patří například geny WT1 a WT2, APC, DCC, BRCA

1 a BRCA 2. Mutace těchto genů mohou vyvolat nádorová onemocnění. Například mutace genů WT1 nebo WT2 mohou způsobit Wilmsův tumor (nefroblastom), APC a DCC rakovinu žaludku či tenkého střeva a BRCA1 nebo BRCA2 rakovinu prsu, prostaty a slinivky.

1.1.1.2.2 Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou geny, které kódují například transkripční faktory regulující expresi jiných genů, nebo regulátory buněčného cyklu zodpovědné za průchod buňky buněčným cyklem. Dále jsou zodpovědné za signální transdukcii proteinů stimulujících buněčné dělení. Proto můžeme tyto geny označit za klíčové hráče v regulaci buněčného cyklu. Pokud však dojde k mutaci těchto genů, může dojít k jejich přeměně na **onkogeny**. (Cerveira, 2012) V důsledku takovýchto mutací mohou být tyto onkogeny trvale zapnuty nebo aktivovány a to i ve chvílích, kdy by se neměly projevit. V buňce pak dochází ke zvýšené expresi genu, což vede k abnormálním hladinám strukturně normálního proteinu a nakonec k nekontrolovatelnému buněčnému růstu. Toto může vést ke vzniku rakoviny. Onkogeny jsou tedy geny obsažené v genomech rakovinných buněk, které přispívají k produkci maligních vlastností buněk. (Thorat, 2012) Onkogeny můžeme členit například na onkogeny kódující protein kinázy (příkladem může být rodina genů Erb), onkogeny, které kódují signální transduktory (například gen Ras) nebo onkogeny inaktivující nádorové supresory (například gen MDM-2). Mezi onkogeny můžeme také zařadit nádorový supresor p53, který má vlastnosti jak onkogenu, tak tumor supresorového genu. Příkladem onkogenní aktivace regulátorů buněčného cyklu mohou být abnormality ovlivňující cykliny i cyklin-dependentní kinázy. Například deregulace CDK4 a CDK6 jsou zapojeny v celé řadě nádorů. Jejich nadměrná exprese byla detekována u rakoviny prsu, lymfomu, rakoviny tlustého střeva a dalších. Příkladem deregulace cyklinů může být například deregulace cyklinu D, který působí jako senzor růstu a je zodpovědný za spojení mezi mitogenními podněty a vstupem do buněčného cyklu. Aberantní exprese cyklinu D byla detekována rovněž v mnoha lidských nádorech, jako jsou například melanom, rakovina jícnu, prostaty, tlustého střeva, močového měchýře a další. (Cerveira, 2012; Ortega, 2002)

1.1.1.2.3 Cykliny a cyklin-dependentní kinázy

Eukaryotické buňky disponují množstvím kontrolních bodů buněčného cyklu, pomocí kterých zajišťují, že k uskutečnění buněčného cyklu dochází až poté, dosyntetizují-li se všechny komponenty potřebné k vytvoření dvou dceřiných buněk a dojde k věrné replikaci DNA. Buněčné dělení je přesně řízený děj, který je regulován řadou látek. Aby bylo možné vytvořit dvě geneticky totožné buňky, všechny pochody musí proběhnout v přesně daném pořadí. Z velkého množství látek regulujících buněčný cyklus tvoří ústřední jádro regulace buněčného cyklu heterodimerní serin/threonin proteinové kinázy obsahující regulační podjednotku, na kterou se váží kofaktory **cykliny** a katalytickou podjednotku s vazebným místem pro **cyklin-dependentní kinázy** (CDK). (Boonstra, 2003; Otová, 2012) CDK jsou enzymy přenášející regulační podjednotky cykliny a fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu (ATP) na proteinové substráty obsahující threoninové, nebo serinové zbytky. Koncentrace cyklinů, jak již z názvu napovídá, v průběhu každého buněčného cyklu charakteristicky fluktuuje - tj. dochází k jejich syntéze a degradaci. Při nízké koncentraci cyklinů má CDK nedostatek regulačních proteinů, v důsledku čehož dojde k její deaktivaci. Naopak, při rostoucí koncentraci cyklinů se aktivuje cyklin-dependentní kináza a buňka vstupuje do dalších fází buněčného cyklu. Z toho vyplývá, že vstup buněk do mitózy je řízen enzymem, který pouze fosforyluje další proteiny, a že aktivita tohoto proteinu je závislá na podjednotce, která v rámci jednotlivých fází buněčného cyklu kolísá. (Karp, 2013)

CDK/cyklin páry přítomné v buňkách jsou velmi důležité pro regulaci progresu buněčného cyklu a proliferaci buněk. Dá se říct, že jejich aktivovaný stav v podstatě definuje jednotlivé fáze buněčného cyklu.

Tabulka 1 CDK a cykliny – nomenklatura a jejich funkce v buněčném cyklu savců			
CDK	Cyklin	Funkce	Název
CDK1	Cyklin A, Cyklin B	M fáze	Mitotické CDK
CDK2	Cyklin A, Cyklin E	Vstup do buněčného cyklu S fáze	CDK G1/S fáze CDK S fáze
CDK4	Cyklin D	G1 fáze Vstup do buněčného cyklu	CDK G1 fáze
CKD6	Cyklin D	G1 fáze Vstup do buněčného cyklu	CDK G1 fáze

(podle Lodish, 2013)

Do regulace buněčného cyklu se zapojují čtyři třídy cyklinů, které jsou členěny do tříd podle funkce a fáze buněčného cyklu, ve které se váží na CDK. Pro G1 fázi je charakteristický **G1/S-cyklin**, jenž se zapojuje na konci této fáze, ve které aktivuje Cyklin-dependentní kinázy. Tím umožňuje postup přes Start a vstup buňky do buněčného cyklu. Koncentrace G1-cyklinů se snižuje v S fázi. V G1 fázi se také zapojují **G1-cykliny**, které pomáhají řídit činnost G1/S-cyklinů. Krátce po vstupu buňky do začátku buněčného cyklu se váží **S-cykliny** na příslušné CDK, čímž pomáhají indukovat replikaci chromozómů. Koncentrace S-cyklinů je zvýšená i v průběhu M fáze, ve které se zapojují do kontroly některých z časných událostí. Samotný vstup do mitózy stimulují v G2/M kontrolním bodě **M-cykliny** vazbou na příslušné CDK (přehled párů CDK/cyklin je uveden v tabulce č. 1). (Alberts, 2008)

1.1.1.2.3.1 Rozdělení CDK podle účasti ve fázích buněčného cyklu

CDK2, CDK4 a CDK6 společně s jejich příslušnými cykliny (viz tabulka č. 1) zajišťují přechod přes G1 kontrolní bod buněčného cyklu. Nejdříve je v důsledku mitogenní signalizace vyvolána syntéza cyklinu D. Poté dochází k transportu CDK4 nebo CDK6 do jádra buňky. Vytvoří se aktivní komplex CDK4/cyklin D nebo CDK6/ cyklin D, který fosforyluje příslušníky pRb rodiny. Úkolem retinoblastomových proteinů je inhibice transkripce, ke které dojde po vlastním navázání pRb na transkripční faktory (histondeacetylázy, příslušníci rodiny E2F, aj.). (Cobrinik, 2005) Cykliny E patří k hlavním transkripčním produktům komplexu pRb/E2F, jenž jsou nepostradatelné pro aktivaci CDK2 a zakončení G1 fáze. Tvorbou komplexu CDK2/cyklin E je následně degradován komplex CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D. Tento proces odpovídá restričnímu bodu, ve kterém již buňky nepotřebují mitogenní podněty pro buněčné dělení. Kinázová aktivita komplexu CDK/cyklin E je také důležitá pro iniciaci replikace DNA. **Když buňky vstoupí do S fáze, musí nastat degradace komplexu CDK2/cyklin E, aby nedocházelo k opětovné replikaci DNA.** (Hwang, 2005) Potlačení aktivity retinoblastomových proteinů pozitivně ovlivňuje transkripci genů nutných pro syntézu cyklinů A a B. Další funkce tohoto komplexu je fosforylace řady proteinů, nezbytných pro ukončení a průchod přes S fázi. (Malumbres, 2005)

Ke konci S fáze dochází k tvorbě komplexu CDK1/cyklin A, jehož substrátem jsou proteiny účastníci se kontroly progresu buněčného cyklu a procesu replikace DNA. V G2 fázi buněčného cyklu jsou hojně syntetizovány cykliny B, které interagují s CDK1 a

vytváří komplex, jenž je nutný pro vstup buňky do M fáze. A naopak cykliny A jsou odbourávány procesem ubiquitin-zprostředkované proteolýzy. (Malumbres, 2005)

1.1.2 Buněčná smrt

Buněčná smrt je nedílnou součástí ontogenetického vývoje všech mnohobuněčných organismů. Dalo by se říct, že nejmasivnější uplatňování procesu buněčné smrti nastává v období prenatalního vývoje jedince, kdy dochází k hynutí celých skupin buněk během vývoje tkání a orgánových soustav. Příkladem může být rozestup tkání v průběhu vývoje prstů. Buněčná smrt se uplatňuje jako jedna ze složek obranných mechanismů živých tkání. Buňky touto formou reagují na xenobiotická agens, kterými jsou například různé chemické látky a mikroorganismy. Buněčná smrt se také účastní některých endogenních modulací, jako jsou například záněty nebo imunitní regulace mnohobuněčných organismů. (Kanduc, 2002) Je uváděno, že bez procesu buněčné smrti by běžný člověk dožívající se osmdesáti let disponoval šestnácti kilometry střeva a dvěma tunami kostní dřeně. (Melino, 2001)

1.1.2.1 Formy buněčné smrti

Pomocí indukce a regulace můžeme buněčnou smrt klasifikovat na anoikis, apoptózu, autofágii a nekrózu.

1.1.2.1.1 Anoikis

Anoikis je forma apoptózy, ke které dochází narušením interakcí v extracelulární matrix, nebo ztrátou buněčné adheze. (Frisch, 1994) Funkce buněčné adheze spočívá v kontrole správného umístění buněk, popřípadě v odstraňování chybně lokalizovaných buněk. Anoikis je tak fyziologický proces, který se podílí na správné ontogenezi a udržení tkáňové homeostáze. (Chiarugi, 2008) Nepřiměřená stimulace signálních drah růstových faktorů, ke které běžně dochází v nádorových buňkách, může vést k anomáliím cytoskeletu, které jsou schopny iniciovat anoikis. V důsledku toho je pravděpodobně kladen silný selektivní tlak na buňky, aby se staly rezistentní vůči anoikis. (Frisch, 2001)

1.1.2.1.2 Apoptóza

Termín apoptóza byl poprvé použit jako označení formy buněčné smrti související s určitými morfologickými rysy v roce 1997. Od té doby byla intenzivně studována a dnes

jsou její základní signální události dobře popsány. Buňky, které mají podlehnout apoptóze jsou podrobovány radikálním změnám, které souvisí s jejich biochemií i strukturou. Apoptóza je morfologicky spojována s buněčným smršťováním, tvorbou záhybů plazmatické membrány, kondenzací chromatinu, nebo jadernou fragmentací. (Duprez, 2009) Buňka se poté rozpadne na fragmenty obklopené membránou (apoptická tělíška), jež jsou následně rozpoznány a pohlceny makrofágy či sousedními buňkami. (Orrenius, 2010) Jsou známy především dvě hlavní rodiny proteinů, které jsou spojovány s apoptózou. Rodina proteinů **Bcl-2** řídící mitochondriální integriny a **kaspázy**, jejichž úkolem je samotné spuštění apoptózy. (Duprez, 2009)

1.1.2.1.2.1 Molekulární mechanismus apoptózy

1.1.2.1.2.1.1 Kaspázy

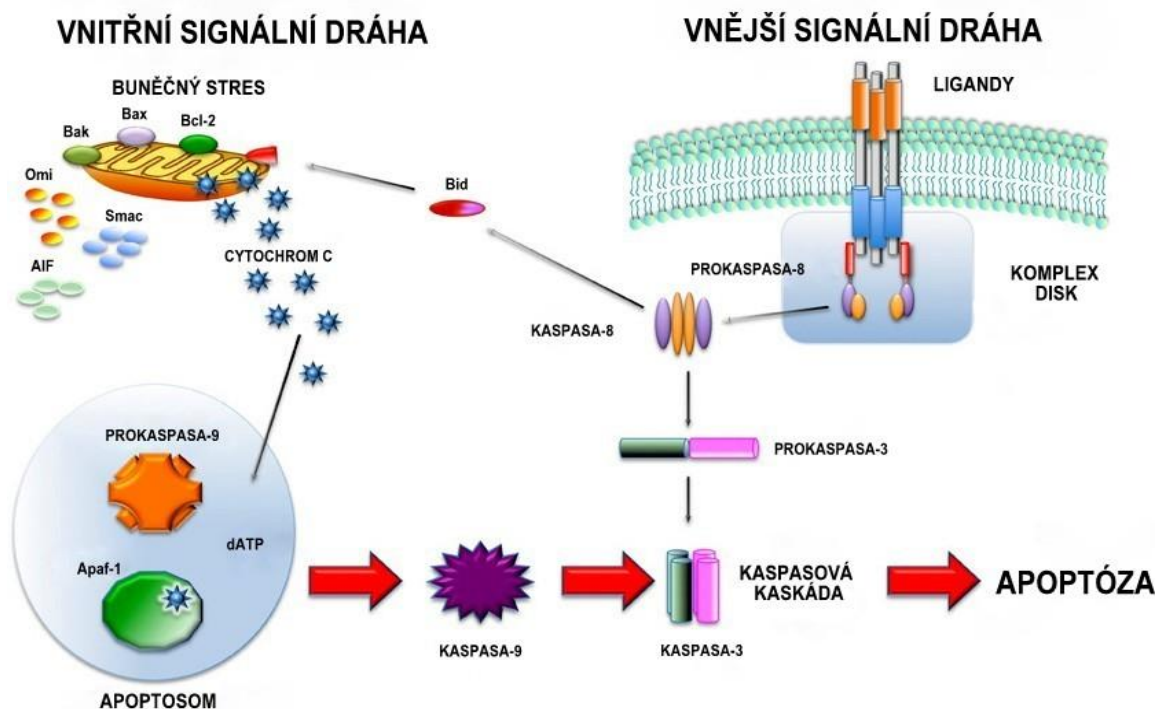
U lidí bylo identifikováno dvanáct kaspáz účastnících se apoptózy. Tyto kaspázy můžeme zařadit do apoptotických a zánětlivých podrodin kaspáz, přičemž apoptotické kaspázy mohou být dále členěny na iniciační kaspázy (kaspázy-2, -8, -9 a -10) a výkonné kaspázy (kaspázy-3, -6 a -7). Kaspázy jsou exprimované jako neaktivní proenzymy (prokaspázy), které jsou složeny z N-terminální prodomény o variabilní délce, na kterou se napojuje velká podjednotka a malá C-terminální podjednotka. Dlouhá prodoména iniciačních kaspáz obsahuje dva strukturní motivy: DEDs (death effector domains) ve dvojici tandemově uspořádané domény nebo CARDs (caspase activation and recruitment domains). (Duprez, 2009) DEDs domény kaspáz (-8, -10) a DED doména z FAS-associating protein with a death domain (Mort1 nebo FADD), molekula adaptéru která přemostňuje některé z receptorů apoptózy, spolu homotypicky interagují, čímž dochází k aktivaci kaspáz. Skupina kaspáz (-2, -4, -9) obsahuje doménu CARD, která interaguje s CARD-containing adaptor molecules. Tímto je kaspázám umožněna adaptérem zprostředkovaná agregace a samoaktivace. Na druhé straně, kaspázy obsahující krátké prodomény (-3, -6, -7) jsou výkonné. (Wang, 2000)

1.1.2.1.2.1.2 Vnitřní a vnější apoptotická dráha

Kaspázy jsou v savčích buňkách aktivovány vnější nebo vnitřní signální drahou (obrázek 2). **Vnější signální dráha** je zprostředkovaná pomocí receptoru. Ligací povrchových receptorů (např. TNFR1, CD95) dochází k tvorbě DISC (death-inducible signaling complex) a aktivaci prokaspázy-8. Kaspáza-8 aktivuje prokaspázu-3, která štěpí

cílové proteiny vedoucí k apoptóze. Kaspáza-8 může také štěpit Bid, který vyvolává translokaci, oligomerizaci a inzerci Bak nebo Bax do vnější mitochondriální membrány. V důsledku toho dojde k uvolnění některých proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrií. Uvolní se tak například cytochrom c, který poté reaguje za přítomnosti dATP nebo ATP s Apaf-1 (apoptosis activating factor) a prokaspázou-9 za tvorby cytozolického apoptozomu (obrázek 2). Aktivuje se tak prokaspáza-9, jenž spouští kaspázovou kaskádu aktivací prokaspázy-3. (Orrenius, 2010) **Vnitřní signální dráha** je aktivována např. působením protinádorových léčiv, indukci onkogenů a hypoxií. Tyto podněty způsobují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a aktivují tak mitochondriální dráhu. (Elumalai, 2012) Mitochondriální dráha je regulována proteiny z rodiny Bcl-2. Za fyziologických podmínek je mitochondriální integrita udržována pomocí anti-apoptotických Bcl-2, jenž zamezují vazbu pro-apoptotických Bcl-2 (Bak a Bax) zodpovědných za poškození mitochondrií. BH3 (Bcl-2-homology 3) proteiny jsou aktivovány v průběhu buněčného stresu a působí proti anti-apoptotickým Bcl-2. Dochází tak k uvolnění Bak a Bax, což způsobuje jejich oligomerizaci a tvorbu kanálku, přes který je následně do cytozolu uvolněn cytochrom c. Poté dochází k tvorbě apoptozomu (viz výše). (Duprez, 2009)

Život nebo smrt buňky určuje rovnováha mezi členy z anti-apoptotické Bcl-2 proteinové rodiny a pro-apoptotickými proteiny BH3. Jednotlivé BH3 proteiny se od sebe liší schopností spustit apoptózu. PUMA, Bid a Bim se vážou ke všem pro přežití Bcl-2 se silnou afinitou. Některé apoptotické stimuly přednostně aktivují určité BH3 proteiny. PUMA je důležitá pro apoptózu indukovanou poškozením DNA a Bim je nezbytný pro apoptózu vyvolanou důsledkem nedostatečného množství růstových faktorů. (Frisch, 2001)



Obrázek 2: Schématické znázornění vybraných signálních drah vedoucích k apoptóze.

(upraveno podle Favaloro, 2012)

1.1.2.1.3 Nekróza

Nekróza byla dlouhou dobu považována za formu buněčné smrti, ke které dochází náhodně a nekontrolovatelně. Takto může k nekróze docházet, pokud dojde k závažnému fyzickému poškození. Například při detergentem vyvolané cytolýze nebo hypertemii. (Duprez, 2009) Nedávný výzkum však ukazuje, že indukce a průběh nekrózy by mohl být přísně regulován. Po indukci léze vyvolané poškozením nebo signalizací, může nekróza obsahovat známky řízených procesů, jako zvýšená tvorba ROS (reactive oxygen species), vyčerpání ATP, dysfunkce mitochondrií nebo počáteční prasknutí plazmatické membrány. (Golstein, 2006) Ligandy receptorů smrti ve většině buněčných linií aktivují přednostně apoptózu. V případě, že je bráněna aktivace kaspázy, může dojít k aktivaci nekrotické buněčné smrti. Nekróza tak působí jako záložní způsob buněčné smrti. Receptor TNFR1 váže protein serin/threonin kinázu RIP1, který je ústředním iniciátorem v procesu receptorem zprostředkované nekrózy. Pokud jsou například v T-buňkách přítomny inhibitory kaspáz a současně chybí-li protein RIP1, nekrotická buněčná smrt indukovaná pomocí TNF bude zrušena. (Vanlangenakker, 2008)

1.1.3 Mechanizmy účinku protinádorových léčiv

V dnešní době je léčba rakoviny založena na různých chemických látkách, které jsou tříděny podle původu, chemické struktury nebo biochemického mechanismu protinádorového účinku (např. zastavení syntézy DNA nebo RNA, ovlivnění hormonální homeostázy a dalších). Mezi nejčastěji používanými typy léčiv patří například antimetabolity, hormony, antibiotika, inhibitory aurora kináz a v poslední době se značná pozornost věnuje inhibitorům EGFR (epidermal growth factor receptor). Existují i další typy léčiv, jako jsou např. inhibitory topoizomeráz, enzymů a další jiné látky. V této práci jim však nebude věnována větší pozornost.

Nejčastěji využívanými **antibiotiky** v léčbě proti rakovině jsou antibiotika odvozená od bakterií rodu *Streptomyces*. Patří k nim například mitomycin C a anthracykliny. Funkčnost mitomycinu C je závislá na enzymatické redukci. Redukcí je přeměněn na vysoce reaktivní bis-elektrofilní meziproduct, který aktivuje buněčné nukleofily. Hlavním mechanismem účinku mitomycinu C je kovalentní vazba do DNA a alkylace DNA, selektivní inhibice syntézy DNA, ale způsobuje také inhibici rRNA. (Neužil, 2013; Tomasz, 1995) Anthracyklinová antibiotika jsou jedny z nejučinnějších léků proti rakovině. Patří mezi ně doxorubicin a daunorubicin. Mechanismus účinku těchto léčiv je založen především na inhibici aktivity enzymu topoizomerázy II, který se váže do DNA za vzniku kovalentního komplexu. Je-li přítomen některý z těchto anthracyklinů, nedojde k rozpadu tohoto kovalentního komplexu. V důsledku toho je znemožněna opětovná ligace DNA, což vede k inhibici replikace a transkripce (respektive inhibici syntézy DNA a RNA). Další možnosti mechanismů účinku jsou produkce ROS (reactive oxygen species) a DNA interkalace. Doxorubicin a daunorubicin mají velmi podobnou strukturu, ale liší se v klinickém využití. Doxorubicin se používá především k léčbě hematologických malignit a solidních nádorů, zatímco daunorubicin zejména pro léčbu akutních leukémií. (Tylečková, 2012; Pommier, 2010)

Antimetabolity jsou látky, které mají podobnou strukturu jako přirozené metabolity. Jejich účinek je založen na kompetici. Vytlačují pro organismus vlastní metabolity, například, z enzymů, což může vést k syntéze nefunkčního produktu, nebo nedostatku přirozených metabolitů. Pro léčebné účely v oblasti rakoviny jsou využívána například antifolika (antagonisté kyseliny listové), mezi která patří methotrexát. Methotrexát disponuje imunosupresivními a protizánětlivými účinky a využívá se především pro léčbu

lymfomů a leukémií. Funkce methotrexátu spočívá v inhibici syntézy purinových a pyrimidinových bází, k čemuž dochází blokováním několika klíčových enzymů. Inhibicí aktivity dihydrofolát reduktázy dochází ke snížení hladiny tetrahydrofolátu. Výsledkem je atenuovaná DNA, inhibice thymidylát syntázy a vzájemné ovlivňování syntézy DNA a inhibice 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferázy, v důsledku čehož dochází k blokaci syntézy purinů *de novo*. (Uga, 2006; Tian, 2007)

Za růst a progresi nádorových buněk je odpovědný například receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). V mnoha nádorech (například rakovina konečníku, slinivky, karcinomu plic, a dalších) byla detekována nadměrná exprese a deregulace signální dráhy EGFR. Dnes známe dvě třídy inhibitorů receptoru epidermálního růstového faktoru - inhibitory tyrosin kináz (Gefitinib a Erlotinib) a monoklonální protilátky (Cetuximab a Panitumumab). Změna signálních drah a následný vývoj malignit může nastat vytvořením aberantních receptorů, ke kterým může dojít například v důsledku nadprůměrné exprese EGFR, aktivace mutací, zmnožení receptorových ligandů nebo ztrátou negativních regulačních mechanismů. Již zmíněné monoklonální protilátky blokují extracelulární doménu epidermálního růstového faktoru před vazbou specifického ligandu a snižují tak množství EGFR, zatímco inhibitory tyrosin kináz ovlivňují funkci EGFR až po vazbě ligandu. (Ratti, 2014; DeGeorge. 1998; Ciardiello, 2000)

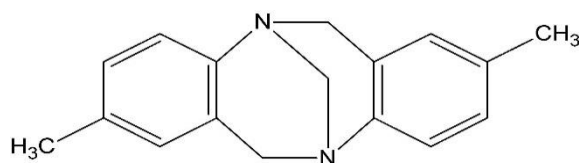
Mechanismus účinku protirakovinných léčiv odvozených od **hormonů** je výrazně odlišný od ostatních léčiv sloužících pro léčbu rakoviny, protože nevykazují přímo cytotoxicitu. Příkladem může být tamoxifen, který se váže na estrogenový receptor. Tamoxifen má estrogenní, ale i antiestrogenní účinek v závislosti na konkrétní tkáni. Silně antiestrogenní vlastnosti vykazuje například v prsní tkáni. Využívá se tak nejen při prevenci, ale i léčbě rakoviny prsu. Mechanismus účinku je založený na vazbě tamoxifenu do estrogenových receptorů a inhibice proliferativních činností estrogenu v epitelu prsníku. (Sporn, 2003)

Dalšími hojně studovanými látkami jsou inhibitory aurora kináz patřící mezi onkogenní serin/threonin kinázy, které jsou velmi důležité pro M fázi buněčného cyklu. Aurora kinázy jsou zodpovědné například za oddálení centrozómů, tvorbu mitotického vřeténka, přesnou segregaci chromozómů, cytokinezi nebo monitorování kontrolního bodu do M fáze. V lidských nenádorových a nádorových tkáních se vyskytují tři aurorakinázy. Kináza aurora A a aurora B jsou exprimovány ve všech tkáních. Kináza aurora C je

exprimována především ve tkáni varlat, kde se podílí na meióze. Nedávný výzkum však spojuje aktivitu aurora C kinázy s tumorogenezí v somatických buňkách. Inhibicí aurora kinázové aktivity dochází ke katastrofálním chybám v průběhu mitózy, jako jsou například vady mitotických vřetének, chromozómalní aneuploidie nebo nesprávný průběh cytokineze. V závislosti na těchto poznacích dochází v poslední době k vývoji protirakovinných léčiv založených na inhibici Aurorakináz. (Dar, 2010; Neužil, 2013)

1.1.4 Trögerovy báze

Historii Trögerových bází odstartovalo publikování článku, Carla J. L. Trögera, o kondenzacích mezi dimethoxymethanem a aromatickými aminy v roce 1887. V tomto článku, Carl J. L. Tröger uvedl, že reakcí p-toulidinu a dimethoxymethanu v roztoku kyseliny chlorovodíkové lze izolovat neočekávaný produkt, který popsal jako bázi $C_{17}H_{18}N$. Až v roce 1935 byla popsána správná chemická struktura vědcem Spielmanem. Trögerovy báze se skládají z bicyklické alifatické jednotky kondenzované se dvěma aromatickými kruhy (obrázek 3). (Rúnarsson, 2012) Původní využití Trögerových bází spočívalo v molekulárním rozpoznávání specifických tvarů nebo konformaci substrátů. Trögerovy báze jsou sloučeniny vykazující chiralitu, která vzniká na základě dvou stereogenních atomů dusíku připojených přes methanový můstek v diazocionovém kruhu, který je kondenzován s dvěma arylóvými kruhy, jenž jsou vůči sobě orientovány v úhlu přibližně 90° . Tímto dochází k tvorbě hydrofóbní dutiny, v molekule, připomínající V-tvar. (Baldeyrou, 2002; Faroughi, 2009)



Obrázek 3: obecná chemická struktura Trögerových bází (upraveno podle Satishkumar, 2006)

1.1.4.1 Využití Trögerových bází

Bylo připraveno veliké množství analogů Trögerových bází pomocí substituovaných aminoarylů. Tehdejší studie molekulárního modelování naznačovaly, že analogy mohou poskytovat poměrně rigidní, chirální „opory“ pro výstavbu biomimetických nebo chelátotvorných systémů. (Wilcox, 1985) Trögerovy báze byly

využívány jako solvatační činidla nebo například receptory pro aromatické a cyklické amidy a alicyklické substráty. Pokroky v syntetických přístupech vedly k syntéze analogů (derivátů) Trögerových bází, které měly zajímavé vlastnosti, což vedlo ke zkoumání těchto analogů v nových oblastech. Byly zkoumány například jako kandidáti nových léčiv, inhibitory enzymů, sondy struktury nukleových kyselin, ligandy v asymetrické katalýze nebo jako nové materiály pro optické a fotografické aplikace. (Bailly, 2000; Rúnarsson 2012)

1.1.4.2 Analogy Trögerových bází a interakce s DNA

Deriváty Trögerových bází obsahující aromatické heterocykly prokazují poměrně velkou schopnost interagovat s DNA. Například Veale Gunnlaugsson ve své práci uvedl informace o syntéze malé knihovny fluorescenčních 1,8-naftalenamidových analogů. Předpokládalo se, že při fyziologické hodnotě pH se kationtové konce analogů Trögerových bází váží se silnou afinitou k fosfátové páteři DNA. Studie fluorescenční vizualizace prokázaly rychlý příjem těchto analogů rakovinnými buňkami, a jejich lokalizaci v jádrech. (Rúnarsson, 2012) V roce 2012 byly benzimidazolové analogy Trögerových bází, v závislosti na jejich schopnosti inhibovat telomerázovou činnost, použity jako aspiranti pro léčbu rakoviny. Inhibice telomerázové aktivity způsobuje buněčnou smrt. V rakovinných buňkách dochází k nadměrné expresi telomerázy, zatímco exprese telomerázy v běžných tělních buňkách je nedetekovatelná. Toto je základem pro léčbu založenou na aktivitě telomeráz. Tyto analogy inhibují aktivitu lidských telomeráz tak, že působí jako G-kvadruplex ligandy, které skládají DNA bohatou na guanidin do G-kvadruplex DNA a v důsledku toho dochází k inhibici aktivity telomeráz. (Paul, 2012; Rúnarsson, 2012)

1.1.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní progresivní metoda, která nachází uplatnění především ve výzkumných, biologicky nebo medicínsky orientovaných, laboratořích a klinické praxi. K měření využívá průtokový cytometr, který je pomocí laserového paprsku a počítačového softwaru schopen současně měřit a analyzovat fyzikálně-chemické vlastnosti buněk a jiných především biologických částic (například chromozómové preparáty, jádra, nebo latexové částice). K nejvýraznějším kladům průtokové cytometrie patří především schopnost analyzovat velké množství vlastností na úrovni jednotlivých

buněk v průběhu krátkého časového úseku (obvykle do 1000 částic za sekundu, je ale možné měřit rychlostí až 10 000 částic za sekundu, nicméně při tak rychlém měření často dochází ke zvýšení možnosti chyby měření). Měření může být provedeno opakovaně z jednoho vzorku tvořeného dostatečným množstvím buněk v suspenzní formě.

1.1.5.1 Základní komponenty průtokového cytometru

Základními komponentami průtokového cytometru jsou především fluidní systém tvořený průtokovou komorou se vzorkem a nosnou kapalinou, optický systém tvořen detektory, optickými hranoly a filtry a počítačový software. Tyto komponenty jsou vzájemně propojené.

Fluidní systém je odpovědný za tvorbu fokusovaného streamu jednotlivých po sobě jdoucích částic nebo buněk. Tohoto je dosahováno vstříkáním částic (buněk) ze vzorku do nosné kapaliny malým otvorem a to takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke smíchání částic s nosnou tekutinou – princip hydrodynamické izofokuzace (obrázek 4). (Roubalová, 2012) Po hydrodynamické izofokuzaci putuje každá částice přes jeden nebo více paprsků světla, které jsou produkovány **optickým systémem**. V moderní průtokové cytometrii jsou jako zdroje světla v optických systémech průtokových cytometrů nejčastěji využívány lasery a obloukové lampy. Emise fluorescence (za předpokladu, že je daná částice značena fluorochromem) nebo rozptyl světla poskytují informace o fyzikálně-chemických vlastnostech částice. (Rahman, 2013) Poté následuje digitalizace získaného optického signálu a zpracování dat s využitím určeného **Počítačového softwaru** a nakonec statistické vyhodnocení provedených analýz.

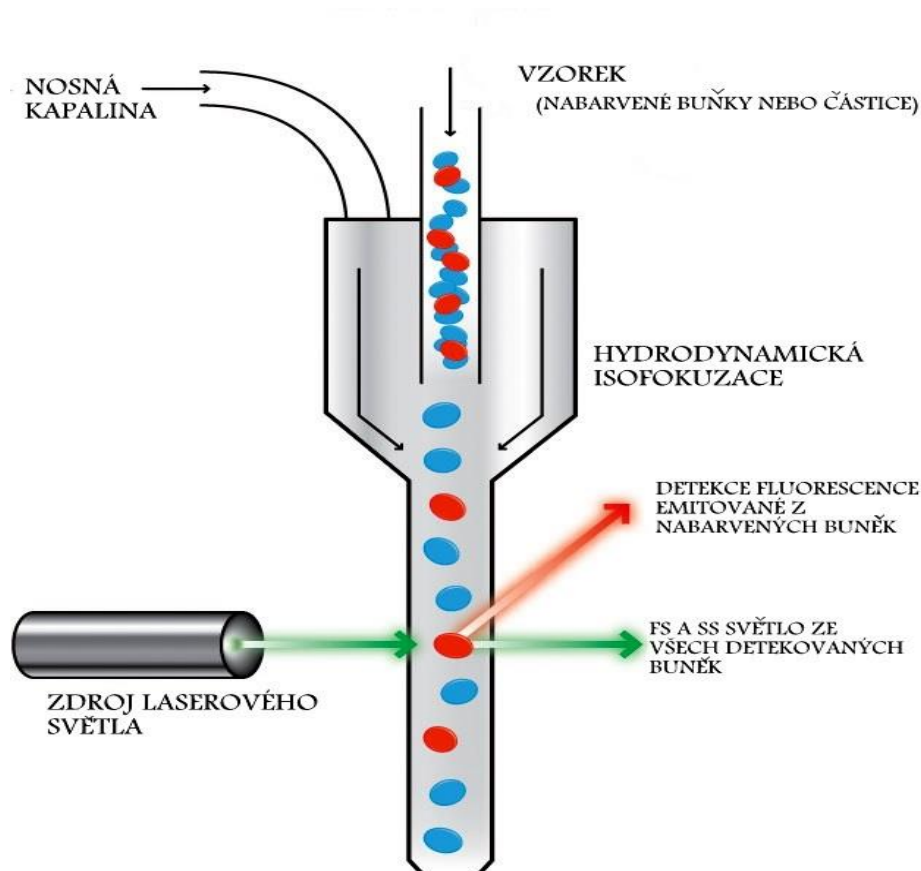
1.1.5.2 Princip průtokové cytometrie

Suspendované buňky prochází v průtokovém cytometru průtokovou komorou. Průtoková komora je koncipována pro doručení jednotlivých buněk do místa měření. Do středu proudu nosné kapaliny je centrálním kanálkem vstříkován vzorek. Zúžený centrální kanálek (nejčastěji o průměru kolem 10 μm) je v tomto okamžiku obklopen podstatně rychleji proudící nosnou kapalinou (hydrodynamická izofokuzace). Nosná kapalina tak s sebou strhává jednotlivé částice, které postupují dále průtokovou komorou až do měřicí komory, ve které jsou tyto částice detekovány laserovým paprskem. (Rahman, 2013; Ormerod, 2008) Počet analyzovaných částic lze regulovat rychlostí průtoku nosné

kapaliny, přičemž je důležité brát na vědomí, že se zvyšující se rychlostí analýzy také roste pravděpodobnost nepřesnosti měření.

Částice, které doputují do měřicí komory, jsou ozářeny koherentním a monochromatickým zářením. Nejběžnějším zdrojem záření jsou lasery. Nejfrekventovanějšími lasery užívanými v komerčních průtokových cytometrech jsou vzduchem chlazené argonové lasery, které emitují záření o vlnové délce 488 nm. Tyto lasery umožňují paralelní excitaci několika fluorochromů. (Roubalová, 2012) Dalším použitelným excitačním zdrojem může být například rtuťová oblouková lampa. Zaměření světelného paprsku na analyzované částice může být docíleno například užitím jednoduchých nebo eliptických čoček. Čočky by měly mít pokud možno co nejvyšší numerickou aparaturu. Je totiž důležité shromáždit největší možné množství fluorescenčního záření. (Ormerod, 2008) Interakcí světelného paprsku s částicí vzniká signál, který je následně detekován. Nejdříve dochází k detekci vzniklého signálu pomocí FSC (forward scatter channel), který je v rovině se světelným paprskem (do úhlu 20° od osy světelného paprsku). Intenzita FSC přibližně odpovídá velikosti dané částice a tak ji můžeme využívat k rozlišení buněčné drti od živých buněk. Detektor SSC (side scatter channel) měří rozptýlený paprsek pod úhlem přibližně 90° od osy světelného paprsku. Zároveň využívá fotonásobič, protože intenzita dopadajícího světla není dostatečně velká. SSC poskytuje informace o granulárním obsahu v dané částici. Hodnoty z FSC a SSC detektorů jsou jedinečné pro každou měřenou částici. Kombinací těchto dvou hodnot může být využita pro odlišení různých buněčných typů v heterogenním vzorku podle jejich velikosti a granularity. (Rahman, 2013) Fluorescenčními detektory získáme další informace o měřených částicích. Intenzita fluorescenčního záření je nízká a proto musíme i v případě fluorescenčních detektorů využít fotonásobiče pro její zesílení. K fluorescenci dochází, když dojde k excitaci molekuly světlem o jedné vlnové délce a energie ve formě fotonů excitované molekuly klesá z vyšší energetické hladiny do nižší za současné emise světla. Přičemž světlo, které je emitované má delší vlnovou délku, ale menší energii než mělo světlo, které fluorescenci vyvolalo. (Wulf, 2006) Barviva, která po osvětlení světlem o určité vlnové délce vykazují fluorescenci, nazýváme fluorochromy. V průtokové cytometrii se často používá proces imunofenotypizace. Jde o děj, ve kterém se barevně značené fluorochromy váží na antigeny, které mají buňky na svém povrchu. Tímto jsou zviditelňovány buňky, o které máme zájem. Pokud naznačíme buňky (částice) více fluorochromy, jsme schopni detekovat několik znaků současně.

Takto vzniklé signály jsou následně převedeny na elektrické impulzy a pomocí počítačového softwaru zpracovány.



Obrázek 4: Princip průtokové cytometrie. (upraveno podle - internetový zdroj 1)

1.1.5.3 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie má široké uplatnění ve výzkumných, biologicky nebo medicínsky orientovaných, laboratořích a klinické praxi. Je využívána ve vědních oborech jako jsou například cytotaxonomie a cytogenetika, molekulární a buněčná biologie, hematonekologie a další. Poskytuje informace o povrchových nebo intracelulárních znacích měřeného objektu (imunofenotypizace). Pomocí průtokové cytometrie můžeme například studovat buněčný cyklus, provádět diagnostiku a monitoring autoimunitních onemocnění (např. HIV), funkční vyšetření monocytů leukocytů a erytrocytů, imunofenotypizaci leukémií a nádorů, analyzovat obsah jaderné DNA, sortování buněk nebo vyšetření periferní krve a kostní dřeně.

1.2 Experimentální část

1.2.1 Použité metody

1.2.1.1 Pasážování buněk

Pasážování buněk slouží pro doplnění živin v médiu a snížení počtu buněk. Buňky poté mají dostatek živin a místa důležitého k růstu.

Pro účely této bakalářské práce byla používána suspenzní standardizovaná buněčná linie CCRF-CEM. CCRF-CEM je nádorová buněčná kultura odvozená od lidské lymfoblastické leukémie. Buňky byly pasážovány pravidelně třikrát týdně a kontrolovány pod inverzním světelným mikroskopem.

1. Pro vyloučení kontaminace byly buňky před každým pasážováním prohlédnuty pod inverzním světelným mikroskopem.
2. Přesná koncentrace buněk v suspenzi byla spočítána na přístroji Vi-Cell, nebo pomocí Bürkerovy komůrky.
3. Buňky byly z kultivační láhve převedeny do 50ml zkumavky a zcentrifugovány po dobu 5 min při 2000 rpm a pokojové teplotě.
4. Poté byly převedeny do nové kultivační láhve a doplněny médiem RPMI 1640 na požadovaný objem tak, aby bylo v médiu zhruba 300 000 - 500 000 buněk/1 ml.
5. Nakonec byla kultivační láhev vrácena do inkubátoru.

1.2.1.2 MTT test

Test MTT se v laboratorní praxi využívá pro stanovení cytotoxické aktivity látek *in vitro*. Buňky se inkubují v 96 jamkových panelech s různými cytostatiky, přičemž každé cytostatikum má svou koncentrační řadu. Inkubace trvá 3 dny při 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého (CO₂). Následně se pomocí spektrofotometrie vyhodnotí přežití nádorových buněk. Princip této metody spočívá v redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustné modře zbarvené krystaly hvězdicovitého tvaru – formazanu. Samotná reakce se odehrává na mitochondriálních membránách živých buněk. Poté se formazan rozpustí přidáním roztoku SDS (dodecylsírany sodného) a vzniklé zbarvení se spektrofotometricky vyhodnotí při vlnové délce 540 nm. Získaná hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. V podstatě lze říct, že čím vyšší absorbance a tedy tmavší barva roztoku, tím je

vyšší procento živých buněk. Data získaná ze spektrofotometru byla nakonec vyhodnocena pomocí softwaru CytoRezist v. 3.3.3 (Ličman, L software pro BIOMEDREG) pomocí tzv. masky panelů a stanovena tak hodnota IC50. Hodnota IC50 představuje polovinu maximální inhibiční koncentrace, nebo-li koncentraci cytostatika, při které dochází k 50% letalitě nádorových buněk.

Tyto deriváty již byly v naší laboratoři v minulosti testovány na více buněčných liniích a na nenádorových kontrolách. Porovnáním účinnosti těchto látek na nádorových liniích a nenádorových kontrolách můžeme odvodit jejich terapeutický index, přičemž dobrý terapeutický index obecně vykazují látky, které jsou účinné na nádorových liniích (zabíjejí rakovinné buňky), ale neúčinné na nenádorových kontrolách. Dalo by se tedy říct, že terapeutický index značí specifitu účinku testované látky vůči nádorovým buňkám.

1.2.1.3 Analýza regulace buněčného cyklu

Pro analýzu regulace buněčného cyklu byly využity tyto analýzy. Abychom zjistili účinnost látek na regulaci jednotlivých fází buněčného cyklu, využíváme analýzu pomocí inkorporace interkalačního barviva propidium jodidu do DNA. Analýza apoptózy poskytuje specifitější informace o cytotoxicitě testovaných látek. Pro bližší pochopení mechanismu účinku testovaných látek na specifické znaky v průběhu regulace buněčného cyklu nádorových buněk využíváme analýzu syntézy DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu, který se váže na nově syntetizovanou DNA replikujících buněk. Pro zjištění inhibice syntézy RNA se používá cílené inkorporace 5-bromouridinu do RNA v analýze syntézy RNA a analýza fosforylace fosfohistonu H3-P_{ser} 10 slouží k detekování změn v rámci G2/M fáze buněčného cyklu.

1.2.1.3.1 Postup fixace buněk

Pro analýzy buněčného cyklu, apoptózy a syntézy DNA a syntézy RNA

Buňky naředíme na koncentraci 300 000 buněk/ml a poté vysadíme do 6 jamkových panelů (do každé jamky 4 ml naředěné buněčné suspenze). Poté následuje 23 a půl hodinová inkubace buněk s testovanými látkami v 6 jamkových panelech. V případě syntézy DNA a RNA následně do každé jamky přidáme 40 μ l 10 mmol/dm³ zásobního roztoku 5-bromo-2'-deoxyuridinu (DNA syntéza) nebo 100 mmol/dm³ zásobního roztoku 5-bromouridinu (RNA syntéza) a buňky inkubujeme dalších 30 min. Suspenzi s buňkami poté převedeme do 10ml zkumavek stočíme při 500g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant

odsajeme a přidáme 3 ml 1 x PBS a opět zcentrifugujeme. Pro analýzu syntézy RNA po odsátí supernatantu na mírném vortexu přidáme po kapkách 2 ml PBS obsahujícího 1% formaldehyd a 0,05% NP-40 a zkumavky umístíme na rotátor, kde je promícháváme 15 min za laboratorní teploty. Poté je uchováváme v lednici při 4 °C, než provedeme analýzu. Pro všechny ostatní analýzy po odsátí supernatantu přidáme na mírném vortexu 2 ml 70% ledového ethanolu po kapkách a necháme alespoň přes noc v mrazáku.

1.2.1.3.2 Analýza buněčného cyklu: propidium jodid

Pro optimální výsledek použijeme 1 milion buněk v suspenzi a stočíme. Přidáme 1 ml citrátového pufru, promícháme pipetou a přidáme další 3 ml citrátového pufru. Poté připipetujeme 1 ml citrátového pufru, promícháme pipetou a přidáme další 3 ml citrátového pufru. Suspenzi zcentrifugujeme, odsajeme supernatant a přidáme 600 µl propidium jodidu a zvortexujeme na vortexu při maximálních otáčkách. Buněčnou suspenzi následně inkubujeme 15 min ve vodní lázni za tmy. Poté přidáme 500 µl RNázy A a opět inkubujeme 15 min za stejných podmínek. Po inkubaci uchováváme vzorky alespoň 1 hodinu v lednici při 4 °C a následně provedeme měření na průtokovém cytometru.

1.2.1.3.3 Analýza syntézy RNA pomocí 5-bromouridinu

Nastavíme centrifugu na 500g a 4 °C, 5 min. Zafixované buňky stočíme, odsajeme a promyjeme s 3 ml 1 x PBS obsahujícího 1% glycin. A opět zcentrifugujeme. Po odsání supernatantu připipetujeme 100 µl zředěné primární protilátky (antimouse BrdU) a inkubujeme 45 min za laboratorních podmínek. Následně přidáme 3 ml 1 x PBS obsahujícího 0,1% NP-40 a 0,1% BSA a provedeme centrifugaci. Supernatant odsajeme a přidáme 100 µl zředěné sekundární protilátky (antimouse IgG FITC) i inkubujeme ve tmě 30 min za laboratorní teploty. Poté připipetujeme 3 ml 1 x PBS obsahujícího 0,1% NP-40 a 0,1% BSA a stočíme. Po odsání supernatantu přidáme po kapkách na vortexu (maximální otáčky) 1 ml PBS obsahujícího 1% formaldehyd a 0,05% NP-40 a zkumavky umístíme na rotátor, kde je promícháváme 15 min ve tmě za laboratorní teploty. Buněčnou suspenzi poté je inkubujeme 1 hodinu v lednici při 4 °C a provedeme centrifugaci. Odsajeme supernatant a připipetujeme 100 µl RNázy A, inkubujeme ve tmě 15 min za laboratorní teploty a poté přidáme 600 µl propidium jodidu a inkubujeme ve tmě dalších 15 min.

Nakonec buněčnou suspenzi převedeme do cytometrických zkumavek a provedeme analýzu na průtokovém cytometru.

1.2.1.3.4 Analýza syntézy DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu

Nastavíme centrifugu na 500g, 5 min a laboratorní teplotu. 1 ml zafixovaných buněčných suspenzí převedeme do cytometrických zkumavek a zcentrifugujeme. Poté odsajeme supernatant a přidáme na mírném vortexu po kapkách 2 ml 2N HCL/Triton X-100. Buněčnou suspenzi inkubujeme 30 min ve tmě za laboratorní teploty. Následně provedeme centrifugaci, odsajeme supernatant a přidáme 2 ml 0,1 mol/dm³ boraxu a opět stočíme. Odsajeme supernatant a připipetujeme 2 ml PBS-T, zcentrifugujeme a opět odsajeme. Poté přidáme 200 µl zředěné primární protilátky (Anti-BrdU) a inkubujeme ve tmě 30 min za laboratorní teploty. Připipetujeme 2 ml PBS-T a stočíme na centrifuze. Po odsání přidáme 200 µl zředěné sekundární protilátky (Anti-Mouse-IgG-FITC) a inkubujeme ve tmě za laboratorní teploty 30 min. Poté přidáme 2 ml PBS-T, zcentrifugujeme a odsajeme. Připipetujeme 100 µl RNázy A a inkubujeme za laboratorní teploty 15 min ve tmě. Nakonec přidáme 600 µl propidium jodidu a buněčnou suspenzi inkubujeme 15 min v přednastavené vodní lázni na 37 °C. Necháme 30 min v lednici a můžeme provést analýzu na průtokovém cytometru.

1.2.1.3.5 Metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10

Nastavíme centrifugu na 2000 rpm a laboratorní teplotu po dobu 5 min. Buňky zcentrifugujeme a odsajeme supernatant. Následně připipetujeme 1 ml PBS + 1% FBS, zcentrifugujeme a odsajeme. Na vortexu přidáme 1 ml vychlazeného PBS s 0,25% Triton X-100 a ihned vložíme do ledu na 15 min. Poté přidáme 5 ml PBS s 1% FBS, zcentrifugujeme a odsajeme. Poté připipetujeme 100 µl zředěné primární protilátky (Anti-phospho-Histone) k peletce a promícháme pipetou. Inkubujeme 1 hodinu za laboratorní teploty (po 30 min promícháme). Poté přidáme 5 ml PBS s 1% FBS, zcentrifugujeme a odsajeme. Přidáme 100 µl zředěné sekundární protilátky (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG), promícháme pipetou a inkubujeme po dobu 30 min ve tmě za laboratorní teploty. Následně přidáme 5 ml PBS s 1% FBS, zcentrifugujeme a odsajeme. Nakonec přidáme 700 µl propidium jodidu s RNázou A a inkubujeme půl hodiny ve tmě při 37 °C. Poté můžeme provést analýzu na průtokovém cytometru.

Výsledky

1.2.2 MTT test

Hodnoty IC₅₀ byly testovány na následujících nádorových buněčných liniích CCRF-CEM (buněčná linie odvozená od akutní lymfoblastické leukémie), CCRF-CEM-DNR (akutní lymfoblastické leukémie s rezistencí na doxorubicin), K562 (akutní myeloidní leukémie), K562-TAX (akutní myeloidní leukémie s rezistencí na paklitaxel), HCT116 (kolorektální karcinom), HCT116p53 (kolorektální karcinom s deletovaným genem p53), A549 (plicní adenokarcinom a kontrolních nenádorových liniích BJ (fibroblasty předkožky) MRC-5 (plicní tkáň 14 denního plodu). Pro všechny experiment prováděné v této práci, byly používány pouze buněčné nádorové linie CCRF-CEM. Z celkového počtu 17 testovaných látek mělo 14 derivátů hodnotu IC₅₀ pod 10 μmol a 10 derivátů vykazovalo submikromolární hodnoty IC₅₀. Pomocí hodnot IC₅₀ získaných z nádorových (CCRF-CEM) a nenádorových linií (BJ) byl vypočítán terapeutický index. Terapeutický index udává specifitu účinku daného derivátu vůči nádorové linii. Čím vyšší hodnota terapeutického indexu, tím více je daný derivát cytotoxický k nádorovým buňkám a méně cytotoxický k normálním buňkám. Z hlediska terapeutického indexu jsou nejzajímavější deriváty LEM 526, 530 a 606. Výsledné cytotoxické hodnoty IC₅₀ a terapeutické indexy testovaných derivátů jsou znázorněny v tabulce 2.

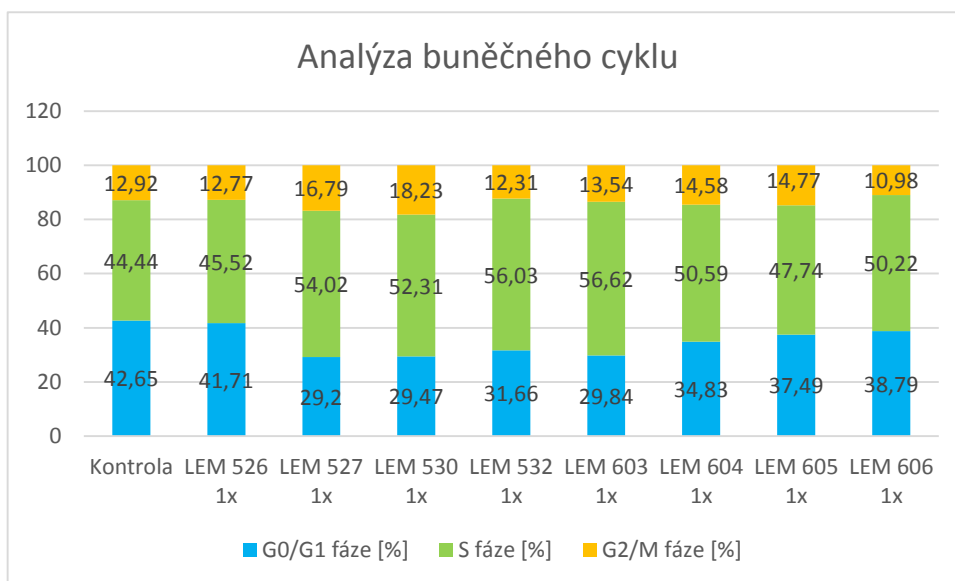
Tabulka 2: Hodnoty IC₅₀ [μmol] testovaných derivátů a výsledné hodnoty terapeutických indexů.

Derivát	CEM	BJ	Terapeutický index
LEM 525	0,691	50	72,36
LEM 526	0,113	22,672	200,637
LEM 527	0,43	19,58	45,535
LEM 528	8,132	50	6,149
LEM 530	0,282	50	177,305
LEM 532	0,283	25,684	90,756
LEM 533	1,477	50	33,852
LEM 603	0,361	0,266	0,737
LEM 604	0,584	0,694	1,188

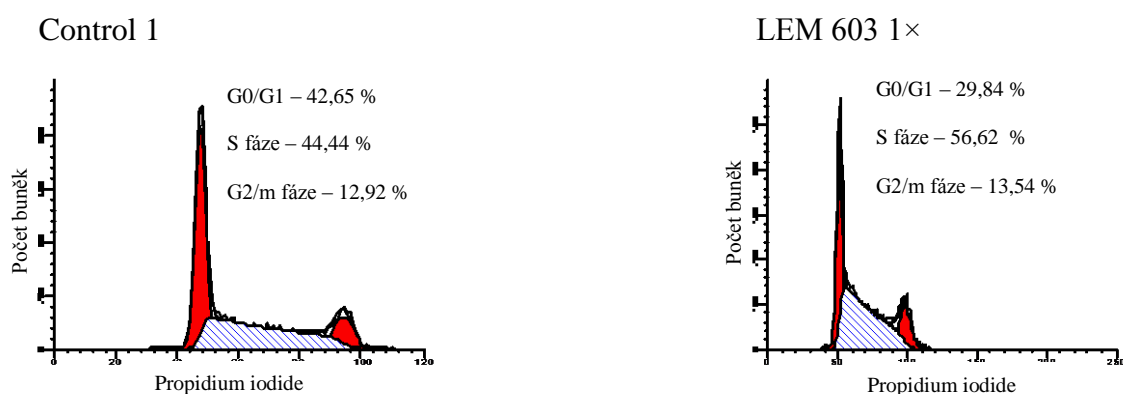
LEM 605	0,056	6,546	116,893
LEM 606	0,176	57,149	324,710
LEM 607	1,58	54,145	36,269
LEM 608	42,141	100	2,373
LEM 609	100	100	1
LEM 610	5,622	87,416	15,549
LEM 611	36,562	100	2,735
LEM 612	6,289	0,581	0,092

1.2.3 Analýza buněčného cyklu

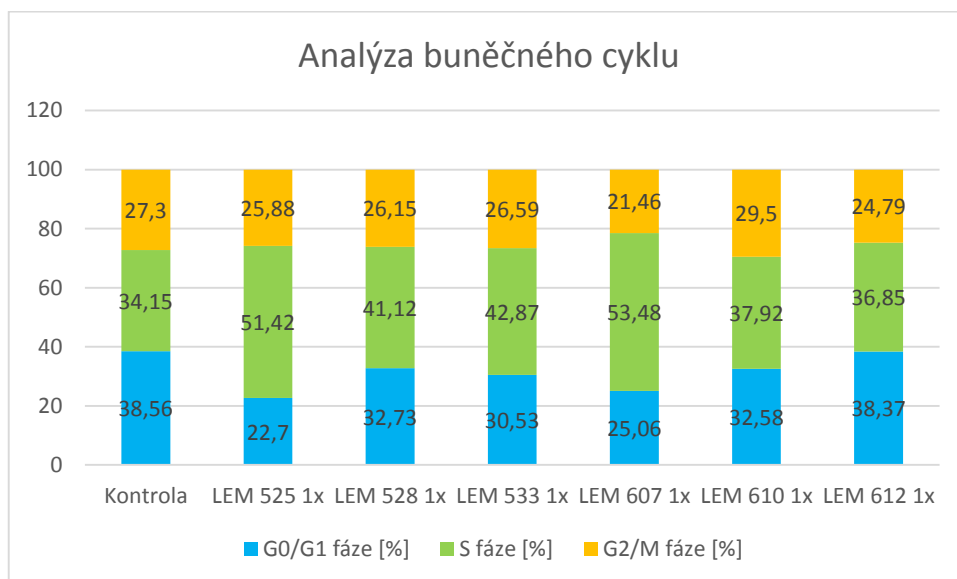
Deriváty, jejichž hodnota IC₅₀, u nádorové buněčné linie CCRF-CEM, byla pod 10 μ mol, byly využity pro analýzu buněčného cyklu. Podle výsledků této analýzy je možné identifikovat změny v jednotlivých fázích buněčného cyklu a tedy blíže pochopit mechanismus účinku testovaných derivátů na nádorové buňky. Tato skupina 14 testovaných látek vykazovala různé účinky na regulaci buněčného cyklu. Některé deriváty působily inhibičně na G₀/G₁fázi buněčného cyklu (deriváty LEM 525, 532, 533, 603, 610) až o 27,06 % (LEM 532 v koncentraci 5 \times IC₅₀), další působily na buněčný cyklus výraznou akumulací buněk v S fázi (deriváty LEM 525, 532, 533, 610) až o 35,47 (LEM 525 v koncentraci 5 \times IC₅₀) a 4 deriváty vykazovaly výraznější akumulací, ve fázi G₂/M (deriváty LEM 527, 603, 604, 606) a to až o 7,1 % (LEM 606 v koncentraci 5 \times IC₅₀) – viz obrázek 5. Přesné hodnoty získané z analýzy buněčného cyklu jsou znázorněny v příloze 1 (tabulky A1 a A2). Z hodnot 1 \times IC₅₀ byly vytvořeny grafy 1 a 2.



Graf 1: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy buněčného cyklu. Z grafu je patrné že deriváty LEM 527, 530, 532 a 603 v koncentraci $1 \times IC_{50}$ působí inhibičně na G0/G1 fázi buněčného cyklu a naopak způsobují akumulaci buněk v S fázi v porovnání s kontrolou.



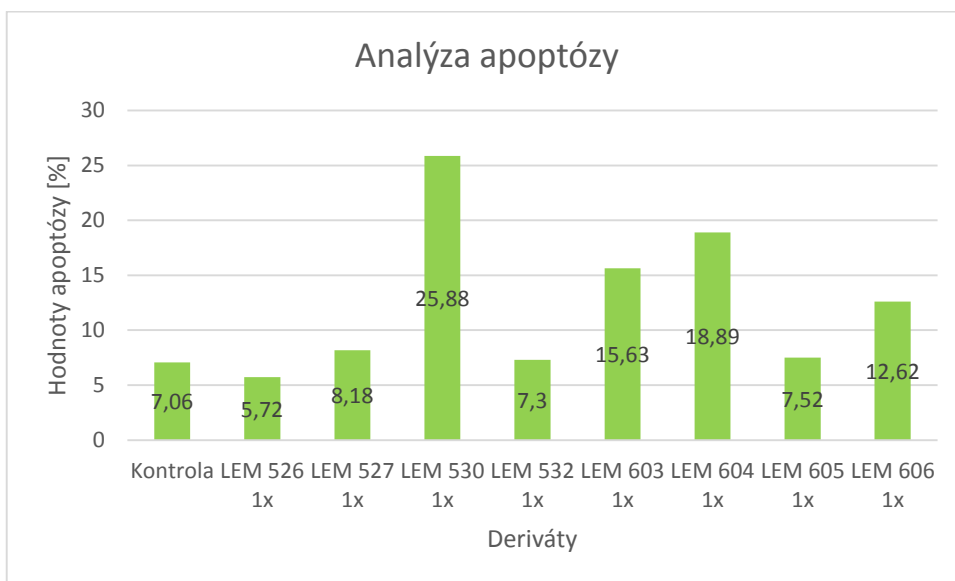
Obrázek 5: Buněčný cyklus. Srovnání kontroly a derivátu LEM 603 při koncentraci $1 \times IC_{50}$. Derivát způsobuje akumulaci buněk v S fázi buněčného cyklu.



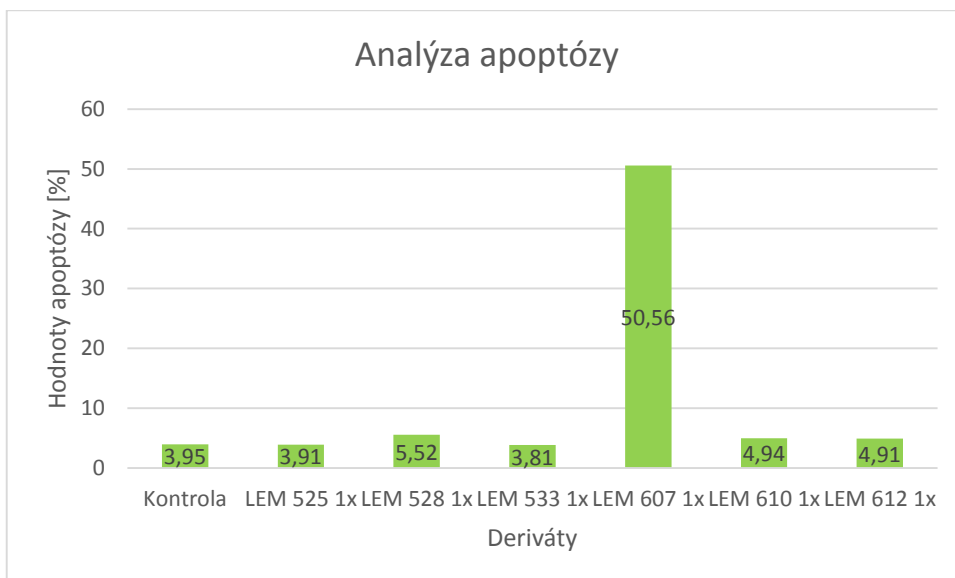
Graf 2: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy buněčného cyklu. Z grafu lze vyčíst, že 2 deriváty (LEM 525, 607) působí na rakovinné buňky akumulací buněk v S fázi.

1.2.4 Apoptóza

Z výsledků analýz bylo zřejmé, že testované látky měly při zvyšující se koncentraci výraznější cytotoxický účinek v porovnání s kontrolou. Vlivem působení testovaných derivátů docházelo téměř vždy k vyšší apoptóze než u kontrolních buněk. Nejvíce cytotoxické byly deriváty LEM 603, 604 a 607 (viz příloha 1: tabulky B1 a B2). Z hodnot $1 \times IC_{50}$ byly vytvořeny grafy 3 a 4.



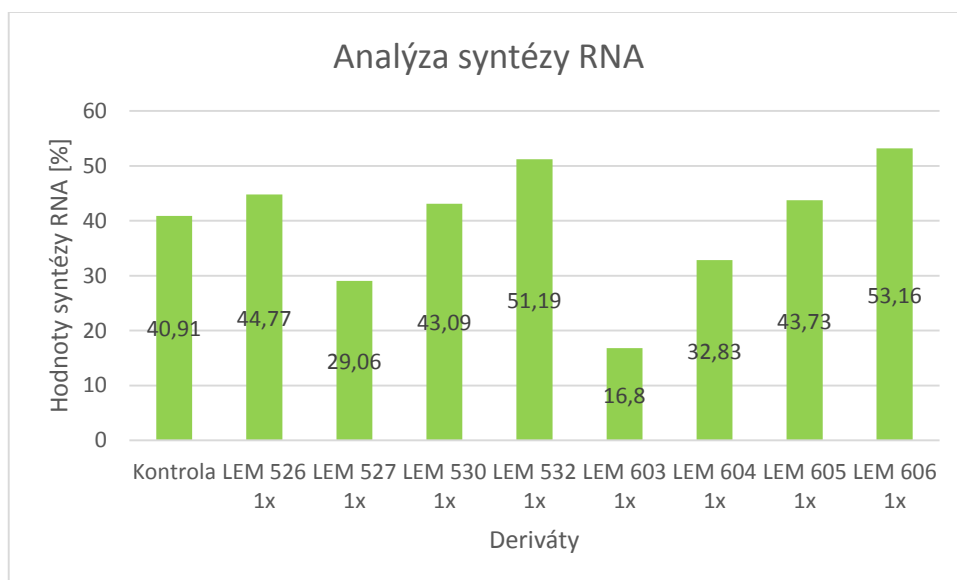
Graf 3: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy apoptózy. Z grafu je možné vyvodit, že nejvíce cytotoxické byly 3 deriváty (LEM 530, 603 a 604), již při velmi nízkých koncentracích odpovídajících $1 \times IC_{50}$.



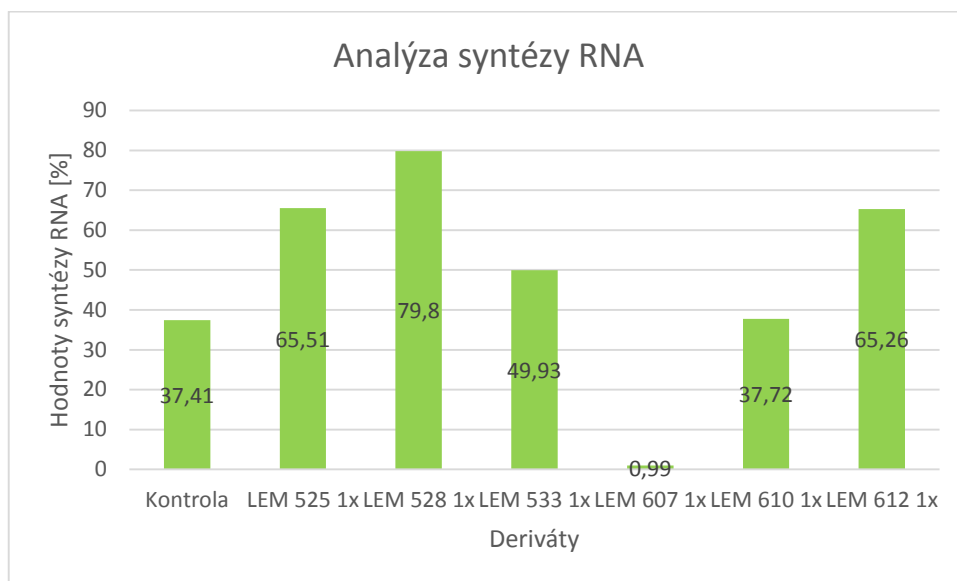
Graf 4: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy apoptózy. Z grafu je patrné, že v koncentraci $1 \times IC_{50}$ je srovnání s kontrolou nejvíce cytotoxický derivát LEM 607.

1.2.5 Analýza syntézy RNA pomocí 5-bromouridinu

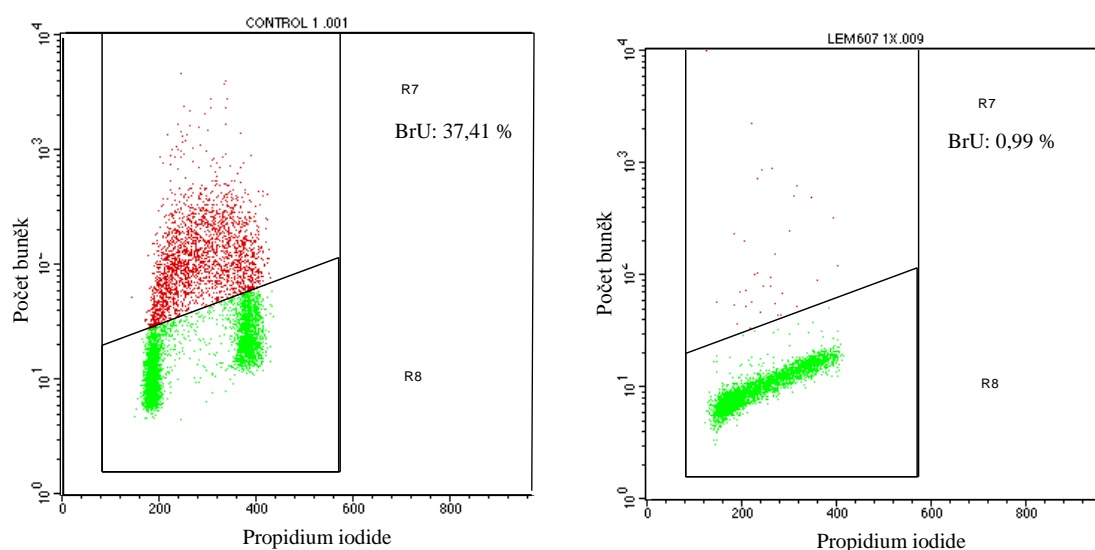
Z výsledků analýzy syntézy RNA pomocí BrU, které jsou uvedeny v příloze 1 (tabulkách C1 a C2) je patrné, že zejména 3 testované deriváty pozitivně stimulovaly syntézu RNA (deriváty LEM 525, 532 a 612), přičemž derivát LEM 525 nejvíce (až o 28,1 % v koncentraci $1 \times IC_{50}$) a 4 deriváty (zejména deriváty LEM 603, 604, 605 a 607) syntézu RNA inhibovaly. Například derivát LEM 607 až o 36,42 % v koncentraci $1 \times IC_{50}$ (viz obrázek 6). Výraznější změny v syntéze RNA při koncentraci látek $5 \times IC_{50}$ mohou být způsobeny nespecifickým vlivem apoptózy. Z hodnot $1 \times IC_{50}$ byly vytvořeny grafy 5 a 6.



Graf 5: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy syntézy RNA. Ve srovnání s kontrolou vykazovaly 2 deriváty (LEM 527 a 603) inhibici syntézy RNA a naopak zejména 2 deriváty (LEM 532 a 606) stimulovaly syntézu RNA až o 12 %.



Graf 6: Grafické znázornění hodnot $1\times IC_{50}$ z analýzy syntézy RNA. Derivát LEM 607 vykazuje výraznou inhibici syntézy RNA a naopak deriváty LEM 525, 528 a 612 pozitivně působí na syntézu RNA v porovnání s kontrolou.

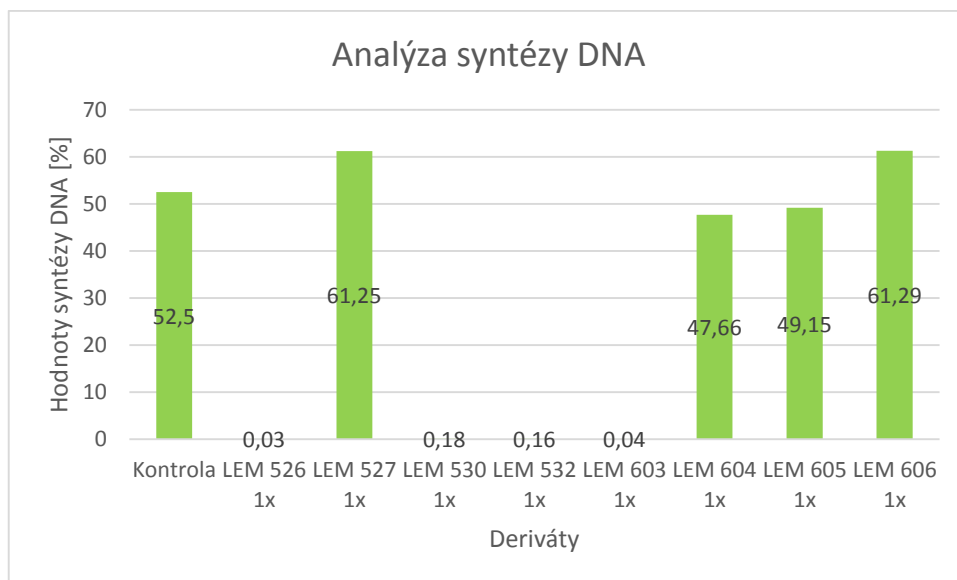


Obrázek 6: Srovnání kontroly a derivátu LEM 607 při koncentraci $1\times IC_{50}$ v analýze syntézy RNA. Z obrázku je zřejmé, že derivát má výrazný inhibiční efekt.

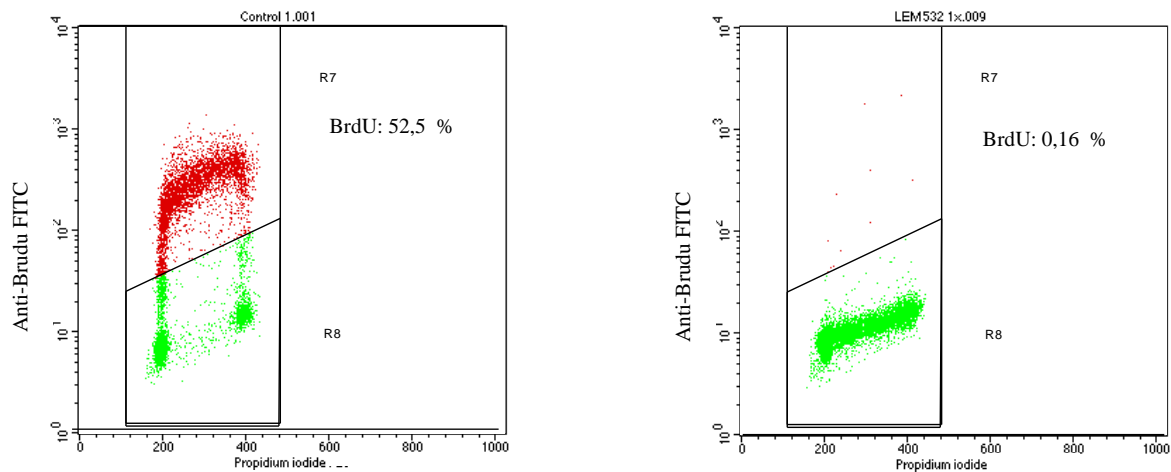
1.2.6 Analýza syntézy DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu

Z testované skupiny látek působí na rakovinné buňky především 2 indukující syntézu DNA, v porovnání s nešetřenou kontrolou (deriváty LEM 532 a 533) a 6 derivátů v porovnání s kontrolou naopak syntézu DNA inhibují - deriváty LEM 526, 530, 532, 603, 604 a 607 (viz obrázek 7). S ohledem na použité koncentrace jsou zajímavé látky, které

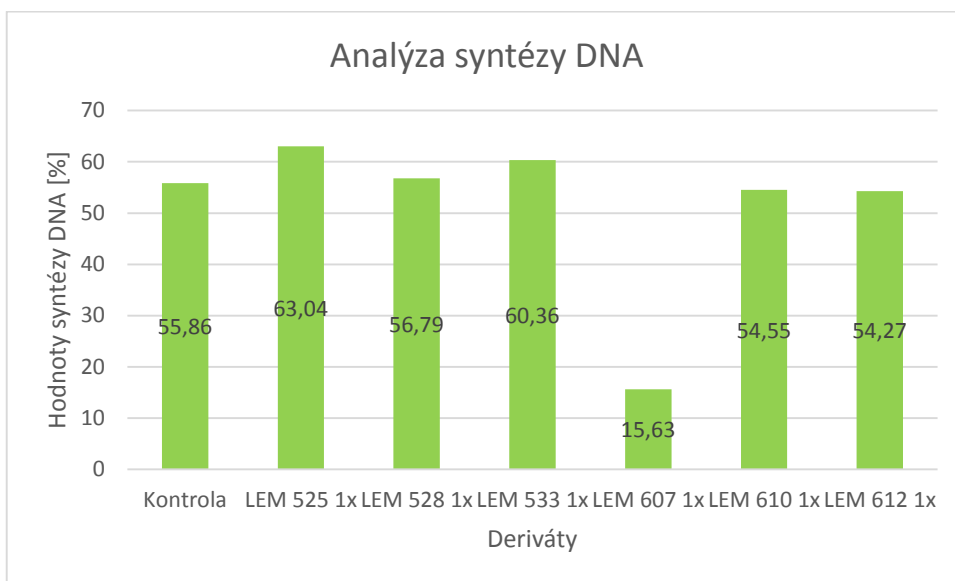
vykazují v nižších koncentracích (1×) inhibiční efekt, zatím co ve vyšších koncentracích (5 x) působí pozitivně na syntézu DNA (deriváty LEM 526, 530, 532 a 607). Přehled hodnot analýzy syntézy DNA pomocí BrdU je v příloze 1 (tabulky D1 a D2). Z hodnot 1× IC50 byly vytvořeny grafy 7 a 8.



Graf 7: Grafické znázornění hodnot 1× IC50 z analýzy syntézy DNA. Deriváty LEM 526, 530, 532 a 603 působí ve srovnání s kontrolou značným inhibičním efektem.



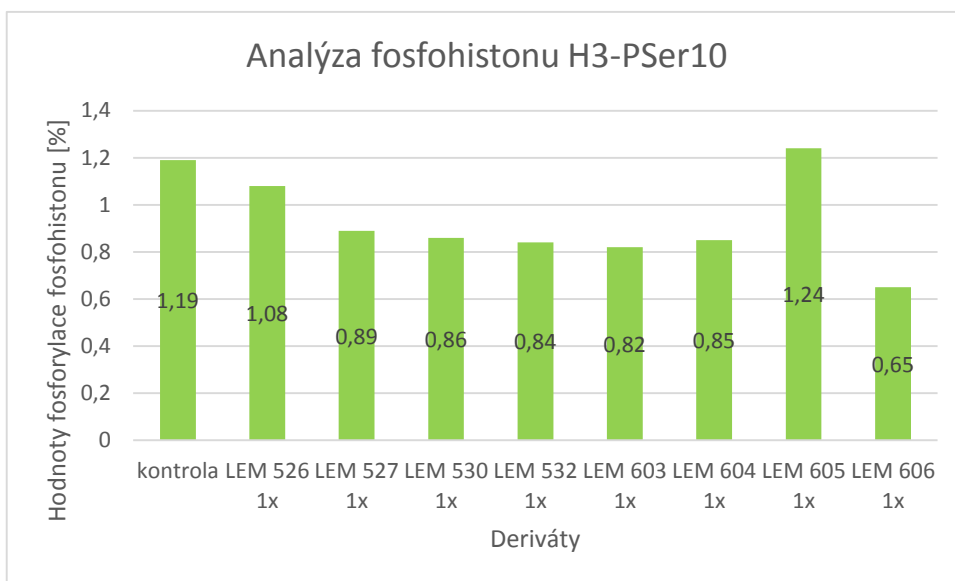
Obrázek 7: Srovnání kontroly a derivátu LEM 532 v koncentraci 1× IC50 v analýze syntézy DNA. Derivát vykazuje silný inhibiční efekt.



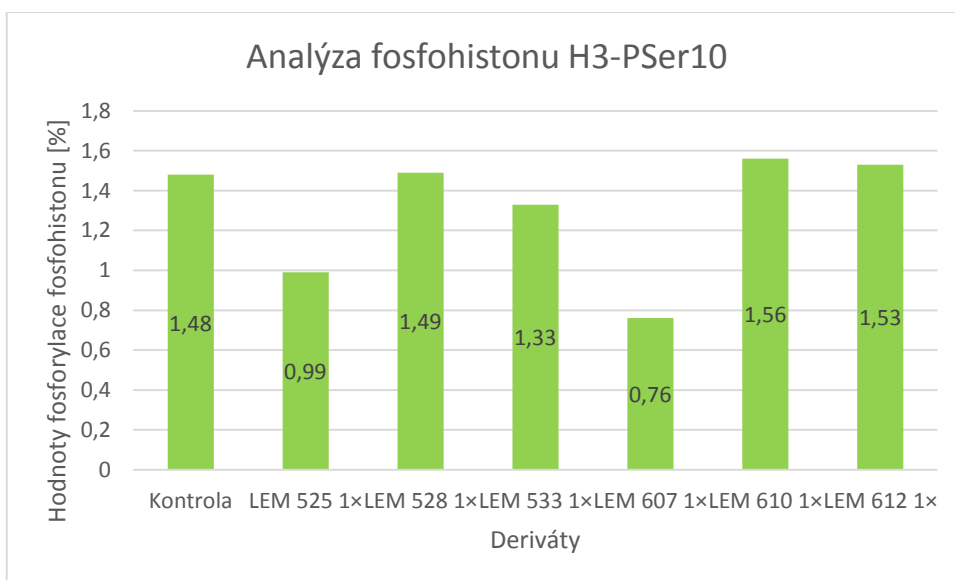
Graf 8: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z analýzy syntézy DNA. Syntézu DNA také inhibuje derivát LEM 607.

1.2.7 Metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10

Testované deriváty byly podrobeny značení protilátkou vůči fosfohistonu H3-PSer10, představujícího marker mitózy. Hodnocením fosforylace histonu H3 na aminokyselině serinu 10 bylo zjištěno, že deriváty LEM 528, 605, 610 a 612 fosforylaci fosfohistonu zvyšují (viz příloha 1: tabulky E1 a E2). Největší inhibici fosforylace fosfohistonu způsobovaly deriváty LEM 525, 606 a 607 (viz obrázek 8). Z hodnot $1 \times IC_{50}$ byly vytvořeny grafy 9 a 10.

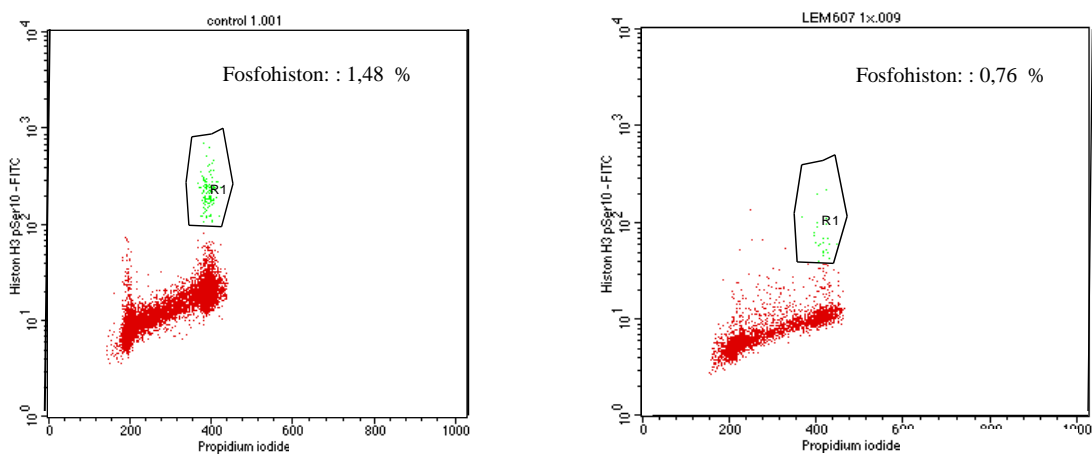


Graf 9: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10. Téměř všechny deriváty z této testované sady vykazovaly inhibici fosforylace fosfohistonu H3-PSer10. Derivát LEM 606 působil na nádorové buňky výraznou inhibicí. Naopak jako jediný derivát, který mírně působil mírně pozitivně na fosforylaci fosfohistonu je derivát LEM 605.



Graf 10: Grafické znázornění hodnot $1 \times IC_{50}$ z metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10. Z druhé sady testovaných látek vykazovaly na fosforylaci fosfohistonu velikou

inhibici dva deriváty (LEM 525 a 607). Mírně pozitivně ve srovnání s kontrolou působily deriváty LEM 528, 610 a 612.



Obrázek 8: Metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10. Srovnání kontroly a derivátu LEM 607 o koncentraci 1× IC50 ukazuje, že látka inhibuje fosforylaci fosfohistonu.

Diskuze

Pro účely této bakalářské práce byly vybrány deriváty ze skupiny Trögerových bází. Na 17 derivátech patřících do skupiny Trögerových bází byl proveden MTT test a následně zjištěna hodnota IC₅₀. Deriváty, které měly hodnoty IC₅₀ pod 10 μmol u buněčné linie CCRF-CEM byly následně testovány na regulaci buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Poměrem hodnot IC₅₀ získaných z nenádorové buněčné linie BJ a nádorové buněčné linie CCRF-CEM byl vypočítán terapeutický index. Terapeutický index udává specifitu účinku dané látky vůči nádorové linii. Čím vyšší hodnota terapeutického indexu, tím více je daný derivát cytotoxický k nádorovým buňkám, ale méně cytotoxický k buňkám nenádorovým. Z hlediska terapeutického indexu jsou nejzajímavější deriváty LEM 526, 530, 532, 605 a 606.

Za účelem regulace buněčného cyklu byly využity analýzy: buněčný cyklus s využitím inkorporace interkalačního barviva propidium jodidu do DNA, apoptóza, syntéza RNA pomocí začleňování 5-bromouridinu do RNA, syntéza DNA pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu, který se váže na nově syntetizovanou DNA replikujících buněk a metoda fosforylace fosfohistonu H3-PSer10 jako marker mitózy. S ohledem na získaná data, z analýzy buněčného cyklu, jsou nejzajímavějšími deriváty LEM 530 a 532, které mají vysoký terapeutický index, a které způsobují, v porovnání s kontrolou, výraznou akumulaci nádorových buněk v G₀/G₁ fázi. Derivát LEM 603 způsobuje také blok ve fázi G₀/G₁, ale má současně značně nízkou hodnotu terapeutického indexu, což znamená, že působí i na nenádorové buňky. Analýza apoptózy ukázala, že ze skupiny Trögerových bází působí na nádorové linie nejcytotoxičtější derivát LEM 607, který má ovšem nižší hodnotu terapeutického indexu. Zajímavým derivátem je z pohledu cytotoxicity derivát LEM 530, který vykazoval rovněž vysokou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, současně však disponuje i vysokou hodnotou terapeutického indexu. Z hlediska syntézy RNA se zajímavě jeví derivát LEM 528, který pozitivně ovlivňuje syntézu RNA a derivát LEM 607, který naopak syntézu, v porovnání s kontrolou, značně inhibuje. Oba tyto deriváty však mají nižší hodnoty terapeutického indexu. Analýza syntézy DNA ukázala, že testovaný derivát LEM 532 v koncentraci 1× IC₅₀ vykazuje v kontrastu s kontrolou výraznou inhibici DNA, ale v koncentraci 5× IC₅₀ syntézu DNA stimuluje. Derivát LEM 607 inhiboval syntézu DNA v obou koncentracích. Z výsledků metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10 jsou zajímavé deriváty LEM 606 a 607, které způsobují významnou inhibici fosforylace

fosfohistonu a derivát LEM 610, který působil na fosforylaci fosfohistonu H3-PSer10 ze všech testovaných látek nejpozitivněji.

Celkově vykazují testované látky poměrně různorodé mechanismy účinku - od různé míry specifity vůči nádorovým a nenádorovým liniím, až po odlišné působení na buněčný cyklus. Ze všech testovaných derivátů se nejzajímavějšími jeví deriváty LEM 530 a 532. Mají vysokou hodnotu terapeutického indexu a zároveň působí i na regulaci buněčného cyklu. Derivát LEM 530 působil cytotoxickým efektem na nádorové buňky v analýze apoptózy a způsoboval inhibici syntézy DNA v analýze syntézy DNA pomocí BrdU o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a pozitivně působil na syntézu DNA při koncentraci $5 \times IC_{50}$. Derivát LEM 532 působil inhibičně na G0/G1 fázi v analýze buněčného cyklu a zvyšoval syntézu DNA o koncentraci $5 \times IC_{50}$. Při koncentraci $1 \times IC_{50}$ však syntézu DNA v analýze syntézy DNA pomocí BrdU inhiboval. I tento efekt mohl být způsoben nespecifickým vlivem apoptózy.

Použité analýzy mohou být využity pro modifikaci další syntézy testovaných látek za účelem získání příznivějších vlastností. Látky, které měly vysokou hodnotu terapeutického indexu, budou dále testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu. Aktivní deriváty budou dále podrobeny detailnímu testování.

Závěr

V teoretické části bakalářské práce byl rozveden buněčný cyklus i s jeho regulací, buněčná smrt zahrnující anoikis, apoptózu a nekrózu. Dále jsou v práci popsány poznatky o mechanismech účinků protinádorových léčiv, Trögerových Bází a průtokové cytometrie.

V experimentální části bakalářské práce jsme se zaměřovali na monitorování potenciálních protinádorových derivátů, které jsou odvozené od Trögerových bází. Všechny deriváty byly otestovány MTT testem na několika nádorových a nenádorových buněčných liniích a následně byla zjištěna hodnota IC₅₀ pro každou buněčnou linii. Poměrem hodnot IC₅₀ nenádorové a nádorové buněčné linie byl vypočítán terapeutický index. Deriváty, které měly hodnotu IC₅₀ pod 10 μmol, na nádorové buněčné linii odvozené od lidské akutní lymfoblastické leukémie CCRF-CEM, byly využity pro analýzu regulace buněčného cyklu, která zahrnovala analýzy buněčný cyklus, apoptózu, syntézu DNA pomocí BrdU, syntézu RNA pomocí BrU a metodu fosforylace fosfohistonu H3-P_{Ser10}. V bakalářské práci bylo identifikováno několik derivátů, které zajímavě působily na regulaci buněčného cyklu, tak jak již bylo prezentováno a rozvedeno v diskuzi. K lepšímu pochopení mechanismu účinku těchto testovaných derivátů na nádorové buňky bude potřebné provést další analýzy. Všechny deriváty Trögerových bází budou ještě testovány na antimikrobiální a antifungální aktivitu.

Cíle bakalářské práce byly úspěšně splněny.

Seznam použité literatury

Alberts, Bruce – Johnson, Alexander – Lewis, Julian – Ralf, Martin – Roberts, Keith – Walter, Peter – Wilson, John – Hunt, Tim (2008): *Molecular Biology of THE CELL*. fifth edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4106-2

Bailly, Christian – Laine, William – Demeunynck, Martine – Lhomme, Jean (2000): Enantiospecific Recognition of DNA Sequences by a Proflavine Tröger Base. *Biochemical and Biophysical Research Communicatins* 273: 681 – 685.

Baldehyrou, Brigitte – Tardy, Christelle – Bailly, Christian – Colson, Pierre – Houssier, Claude – Charmantray, Franck – Demeunynck, Martine (2002): Synthesis and DNA interaction of a mixed proflavine-phenanthroline Tröger base. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37: 315 – 322.

Bertheau, Philippe. – Espié, Marc – Turpin, Elisabeth – Lehmann, Jacqueline – Plassa, Louis-Francois – Varna, Mariana – Janin, Anne – Thé, Hugues de (2008): TP53 Status and response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathobiology* 75: 132 – 139.

Boonstra, J. – Wittenberg, C. – Flick, K. – Bird, C. – Tyner, A. L. – Gartel, A. L. – Yee, A. S. – Wang, J. Y. J. – Hulleman, E. – Rossum, G. S. A. T. van – Juliano, R. L. – Verrips, C. T. – Munoz, C. M. – Post, J. A. – Herrero, E. – Torre, M. A. de la – Torres, J. – Bellí, G. – Jones, S. M. – Kazlauskas, A. – Cinti, C. – Trimarchi, C. – Giordano, A. – Alonso, M. J. M. – León, J. (2003): *G1 Phase Progression*. New York: Landes Bioscience/ Kluwer Academic/ Plenum publishers. ISBN: 0-306-47831-5

Cerveira, Nuno – Bizarro, Susana – Teixeira, Mmanuel R. (2012): Cancer cell cycle. *Canal BQ, Revista da sociedade poruguesa de bioquímica* 40 – 47.

Ciardello, Fortunato (2000): Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors as Anticancer Agens. *Drugs* 60: 25 – 32.

Cobrinik, David (2005): Pocket proteins and cell cycle control. *Nature Publishing Gorup, Oncogene* (24): 2796 – 2809.

Dar, Altaf A. – Goff, Laura W. – Majid, Shahana – Berlin, Jordan – El-Rifai, Wael (2010): *aurolecular Cancer Therapeutics* 9 (2): 268 – 278.

DeGeorge, Joseph J. – Ahn, Chang-Ho – Andrews, Paul A. – Brower, Margaret E. – Giorgo, Diana W. – Goheer, M. Anwar – Lee-Ham, Doo Y. – McGuinn, W. David – Schmidt, Wendelyn – Sun, C. Joseph – Tripathi, Satish C. (1998): Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 41: 173 – 185.

Duprez. Linde – Wirawan, Ellen – Berghe, Tom Vanden – Vandenabeele, Peter (2009): Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection* 11: 1050 – 1062.

Elumalai, P. – Ganadharini, D. N. – Senthilkumar, K. – Banudevi, S. – Arunkumar, R. – Benson, C. S. – Sharmila, G. – Arunakaran, J. (2012): *Toxicology Letters* 215: 131 – 142.

Faroughi, Masoud – Jensen, Paul – Try, Andrew C. (2009): Halogenation of Tröger's base analogues. *ARKIVOC* 2: 269 – 280.

Favaloro, B. – Allocati, N. – Graziano, V. – Ilio, C. Di – Laurenzi, V. De (2012): *Open-Access Impact Journal on Aging* 4 (5): 330 – 349.

Frisch, Steven M. – Francis, Hunter (1994): Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 124 (4): 619 – 626.

Frisch, Steven M. – Screaton, Robert A. (2001): *Current Opinion in Cell Biology* 13: 555 – 562.

Golstein, Pierre – Kroemer, Guido (2006): Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochemical Sciences* 32 (1): 37 – 43.

Hwang, Harry C. – Clurman, Bruce E. (2005): Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Nature Publishing Group, Oncogene* 24: 2776 – 2786.

Chiarugi, Paola – Gainnoni, Elisa (2008): Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology* 76: 1352 – 1364.

Kanduc, Darja – Mittelman, Abraham – Serpico, Rosario – Sinigaglia, Eberta – Sinha, Animesh A. – Natale, Costanzo – Santacrose, Raffaella – Corcia, M. Grazia di – Luchese, Alberta – Dini, Luciana Pani, Paolo – Santacrose, Salvatore – Simone, Simone – Bucci, Romano – Farber, Emanuel (2002): Cell death: Apoptosis versus necrosis. *International Journal of Oncology* 21 (1): 165 – 170.

Karp, G. (2013): *Cell and molecular biology: Concepts and experiments*. 7th edition. Wiley. ISBN 13 978-1118-20673-7

Lodish, Harvey – Berk, Arnold – Kaiser, Chris A – Krieger, Monty – Bretscher, Anthony – Ploegh, Hidde – Amon, Angeika – Scott, Mathew P. (2013): *Molecular cell biology*. 7th edition. New York: W. H. Freeman and company. ISBN-13: 978-1-4292-3413-9

Malumbres, Marcos – Barbacid, Mariano (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *TRENDS in Biochemical sciences* 30 (11): 630 – 641.

Melino, Gerry (2001): The siren's song. *Nature* 412: 23

Neužil, Jiří – Dong, Lan-Feng – Rohlena, Jakub – Truksa, Jaroslav – Raplh, Stephen J. (2013): Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 13 (3): 199 – 208.

Ormerod, Michael G. (2008): *Flow cytometry: A basic information*.

Dostupné na WWW: <http://flowbook.denovosoftware.com/>

Orrenius, Sten – Nicotera, Pierluigi – Zhivotovsky, Boris (2010): Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicological Sciences* 119 (1): 3 – 19.

Ortega, Sagrario – Malumbres, Marcos – Babbacid, Mariano (2002): Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochemica et Biophysica Acta*: 73 – 87.

Otová, Berta – Mihalová Romana (2012): *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. vydání. V Praze: Karolinum. ISBN 978-802-4621-098

Paul, Ananya – Mají, Basudeb – Misra, Santosh K. – Jain, Akash K. – Muniyappa, K. – Bhattacharya, Santau (2012): Stabilization and Structural Alternation of the G-Quadruplex DNA Made from the Human Telomeric Repeat Mediated by Tröger's Base Based Novel Benzimidazole Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 7460 – 7471.

Petitjean, A. – Achatz, M. I. W. – Dale, A. L. B. – Hainaut, P. – Oliver, M. (2007): TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Nature Publishing Group, Oncogene* 26: 2157 – 2165.

Pommier, Yves – Leo, Elisabetta – Zhang, HongLiang – Marchand, Christophe (2010): DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry & Biology* 17: 421 – 433.

Rahman, Misha – Lane, Andy – Swindell, Angie – Bartram, Sarah (2013): Introduction to Flow Cytometry. *AbD Serotec, A Bio-Rad Company*.

Ratti, Margherita – Tomasello, Gianluca (2014): Emerging combination therapies to overcome resistance in EGFR-driven tumors. *Anti-Cancer Drugs* 25 (2): 127 – 139.

Roubalová, L. (2012): Průtoková cytometrie. *FONS Bulletin*.

Dostupné na WWW: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/labo1.pdf>

Rúnarsson, Ögmundur V. – Artacho, Josep – Wärnamark, Kenneth (2012): The 125th Anniversary of the Tröger's Base Molecule: Synthesis and Applications of Tröger's Base Analogues. *European Journal of Organic Chemistry* 7015 – 7041.

Satishkumar, Sakilam – Periasamy, Mariappan (2006): A convenient method for the synthesis and resolution of Tröger base. *Tetrahedron: Asymmetry* 17: 1116 – 1119.

Sporn, Michael B. – Lippman, Scott M. (2003): Agens for Chemoprevention and Their Mechanism of Action. In: Kufe, D. W. – Pollock, R. E. – Weichselbaum, R. R. – et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12522>

Thorat, R. M. – Gaikwad, D. D. – Jadhav, S. L. – Kokate, S. T. (2012): Oncogene: The Dominant Evil. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences* 1 (2): 570 – 583.

Tian, Henghe – Cronstein, Bruce N. (2007): Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate, Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulltein of the NYU Hospital for Joint Disases* 65 (3): 168 – 173.

Tomasz, Maria (1995): Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology* 2: 575 – 579.

Tylečková, Jiřina – Hrabáková, Rita – Mairyčhová, Kateřina – Halada, Petr – Radová, Lenka – Džubák, Petr – Hajdúch, Marián – Gadher, Suresh J. – Kovářová, Hana (2012): Cancer Cell Response to Anthracyclines Effects: Mysteries of the Hidden Proteins Associated with These Drugs. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12): 15536 – 15564.

Uga, Hitoshi – Kuramori, Chikanori – Otha, Akiko – Tsuboi, Yasunori – Tanaka, Hiroshi – Hatakeyama, Mamoru – Yamaguchi, Yuki – Takahashi, Takashi – Kizaki, Masahiro – Handa, Hiroshi (2006): A New Mechanism of Methotrexate Action Revealed by Target Screening with Affinity Beads. *Molecular Pharmacology* 70: 1832 – 1839.

Vanlangenakker, Nele – Berghe, Tom V. – Krysko, Dmitri V. – Festjens, Nele – Vandennebeele, Peter (2008): Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine* 8: 207 – 220.

Viatour, Patrick – Sage, Julien (2011): Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Disease Models & Mechanisms* 4 (5): 581 – 585.

Wang, Jin – Lenardo, Michael J. (2000): Roles of caspases, in apoptosis, developmnet, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science* 113: 753 – 757.

Wilcox, Craig S. (1985): Tröger's Base Analogs: New Structural Units fot the Preparation of Chiral Hosts and Metal Ligands. *Tetrahedron Letters* 26 (47): 5749 – 5752.

Wulf Sonja (ed) (2006): Flow cytometry: Educational Guide. 2nd edition. California: Dako.

Internetový zdroj 1:

Dostupné na WWW: <http://www.pathologystudent.com/wp-content/uploads/2013/07/flow.jpg>

Internetový zdroj 2:

Dostupné na WWW: <http://www.abcam.com/?pageconfig=resource&rid=13432>

Přílohy

Příloha 1: Tabulky

Tabulka A1: Výsledky měření z analýzy buněčného cyklu

Derivát	G0/G1 fáze [%]	S fáze [%]	G2/M fáze [%]
Kontrola	42,65	44,44	12,92
LEM 526 1×	41,71	45,52	12,77
LEM 526 5×	31,26	54,30	14,44
LEM 527 1×	29,20	54,02	16,79
LEM 527 5×	57,82	23,01	19,17
LEM 530 1×	29,47	52,31	18,23
LEM 530 5×	53,02	34,69	12,28
LEM 532 1×	31,66	56,03	12,31
LEM 532 5×	15,59	73,82	10,58
LEM 603 1×	29,84	56,62	13,54
LEM 603 5×	25,50	55,37	19,14
LEM 604 1×	34,83	50,59	14,58
LEM 604 5×	26,62	53,95	19,44
LEM 605 1×	37,49	47,74	14,77
LEM 605 5×	28,99	56,68	14,33
LEM 606 1×	38,79	50,22	10,98
LEM 606 5×	34,35	45,63	20,02

Tabulka A2: Výsledky měření z analýzy buněčného cyklu.

Derivát	G0/G1 fáze [%]	S fáze [%]	G2/M fáze [%]
Kontrola	38,56	34,15	27,30
LEM 525 1×	22,70	51,42	25,88
LEM 525 5×	13,49	69,97	16,54
LEM 528 1×	32,73	41,12	26,15
LEM 528 5×	31,89	41,05	27,06
LEM 533 1×	30,53	42,87	26,59
LEM 533 5×	13,79	68,43	17,78
LEM 607 1×	25,06	53,48	21,46
LEM 607 5×	32,33	40,61	27,06
LEM 610 1×	32,58	37,92	29,50
LEM 610 5×	18,45	64,67	16,88
LEM 612 1×	38,37	36,85	24,79
LEM 612 5×	38,42	38,39	23,19

Tabulka B1: Výsledky měření z analýzy apoptózy.

Derivát	Hodnota apoptózy [%]
Kontrola	7,06
LEM 526 1×	5,72
LEM 526 5×	7,28
LEM 527 1×	8,18
LEM 527 5×	19,03
LEM 530 1×	25,88
LEM 530 5×	16,64
LEM 532 1×	7,30
LEM 532 5×	14,24
LEM 603 1×	15,63
LEM 603 5×	67,24
LEM 604 1×	18,89
LEM 604 5×	58,60
LEM 605 1×	7,52
LEM 605 5×	20,64
LEM 606 1×	12,62
LEM 606 5×	38,66

Tabulka B2: Výsledky měření z analýzy apoptózy.

Derivát	Hodnota apoptózy [%]
Kontrola	3,95
LEM 525 1×	3,91
LEM 525 5×	5,29
LEM 528 1×	5,52
LEM 528 5×	7,24
LEM 533 1×	3,81
LEM 533 5×	9,24
LEM 607 1×	50,56
LEM 607 5×	57,41
LEM 610 1×	4,94
LEM 610 5×	13,24
LEM 612 1×	4,91
LEM 612 5×	4,27

Tabulka C1: Výsledky měření z analýzy syntézy RNA.

Derivát	Syntéza RNA [%]
Kontrola	40,91
LEM 526 1×	44,77
LEM 526 5×	30,73
LEM 527 1×	29,06
LEM 527 5×	38,36
LEM 530 1×	43,09
LEM 530 5×	42,13
LEM 532 1×	51,19
LEM 532 5×	57,27
LEM 603 1×	16,80
LEM 603 5×	0,57
LEM 604 1×	32,83
LEM 604 5×	0,96
LEM 605 1×	43,73
LEM 605 5×	48,73
LEM 606 1×	53,16
LEM 606 5×	2,10

Tabulka C2: Výsledky měření z analýzy syntézy RNA.

Derivát	Syntéza RNA [%]
Kontrola	37,41
LEM 525 1×	65,51
LEM 525 5×	18,42
LEM 528 1×	79,80
LEM 528 5×	25,29
LEM 533 1×	49,93
LEM 533 5×	35,61
LEM 607 1×	0,99
LEM 607 5×	0,27
LEM 610 1×	37,72
LEM 610 5×	45,43
LEM 612 1×	65,26
LEM 612 5×	33,64

Tabulka D1: Výsledky měření z analýzy syntézy DNA.

Derivát	Syntéza DNA [%]
Kontrola	52,50
LEM 526 1×	0,03
LEM 526 5×	61,35
LEM 527 1×	61,25
LEM 527 5×	60,67
LEM 530 1×	0,18
LEM 530 5×	62,13
LEM 532 1×	0,16
LEM 532 5×	72,28
LEM 603 1×	0,04
LEM 603 5×	1,35
LEM 604 1×	47,66
LEM 604 5×	2,72
LEM 605 1×	49,15
LEM 605 5×	63,63
LEM 606 1×	61,29
LEM 606 5×	2,36

Tabulka D2: Výsledky měření z analýzy syntézy DNA.

Derivát	Syntéza DNA [%]
Kontrola	55,86
LEM 525 1×	63,04
LEM 525 5×	53,68
LEM 528 1×	56,79
LEM 528 5×	60,06
LEM 533 1×	60,36
LEM 533 5×	67,97
LEM 607 1×	15,63
LEM 607 5×	0,49
LEM 610 1×	54,55
LEM 610 5×	56,45
LEM 612 1×	54,27
LEM 612 5×	48,04

Tabulku E1: Výsledky měření z metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10

Derivát	fosfohiston H3-PSer10 [%]
kontrola	1,19
LEM 526 1×	1,08
LEM 526 5×	0,80
LEM 527 1×	0,89
LEM 527 5×	0,08
LEM 530 1×	0,86
LEM 530 5×	0,10
LEM 532 1×	0,84
LEM 532 5×	0,53
LEM 603 1×	0,82
LEM 603 5×	0,25
LEM 604 1×	0,85
LEM 604 5×	0,26
LEM 605 1×	1,24
LEM 605 5×	1,57
LEM 606 1×	0,65
LEM 606 5×	0,43

..

Tabulka E2: Výsledky měření z metody fosforylace fosfohistonu H3-PSer10.

Derivát	fosfohiston H3-PSer10 [%]
Kontrola	1,48
LEM 525 1×	0,99
LEM 525 5×	0,56
LEM 528 1×	1,49
LEM 528 5×	1,21
LEM 533 1×	1,33
LEM 533 5×	0,41
LEM 607 1×	0,76
LEM 607 5×	0,7
LEM 610 1×	1,56
LEM 610 5×	0,84
LEM 612 1×	1,53
LEM 612 5×	1,15

Příloha 2: Chemické látky, materiál, roztoky a přístrojové vybavení

Chemické látky

DMSO (Sigma); BSA (Sigma); FBS (Pan-Biotech); penicilin G1,0 draselná sůl (Biotika); streptomycin (sigma); ethanol bezvodý p.a. (Dr Kulich Pharma s.r.o.); formaldehyd solutio 35% (Fagron); Propidium jodid (Sigma); ribonukleáza A z bovinního pankreatu (Sigma); médium RPMI 1640 (Sigma); NP-40 (Sigma); triton X-100 (Koch-light limited); NaCl (Sigma); KCl (Sigma); borax (Sigma); Tween-20 (Sigma); glycin (Sigma); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (Sigma); (-)-5-Bromouridine 98% (Aldrich); 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, BrdU) minimum 99 % (Sigma); Anti-Mouse IgG (whole molecule) F(ab')₂ fragment-FITC (antibody produced in sheep, affinity isolated antibody (Sigma); Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen); Anti-BrdU clone MoBu-1 (EXBIO Praha a.s.); Anti-phospho-histone (Millipore).

Materiál

Plastové zkumavky 10 ml (GAMA GROUP a.s.), cytometrické zkumavky 5 ml (BD Falcon), mikrozukavky, 6 jamkové panely (TPP), filtr, kultivační láhev, skleněná láhev, jehla a injekční stříkačka 20 ml (B|BRAUN), automatické pipety, špičky na automatické pipety.

Roztoky

Příprava 10x koncentrovaného PBS

V 600 ml destilované vody se dokonale rozpustí 32,1 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄ a doplní na objem 1 litr. Poté se upraví pH takto připraveného 10 x koncentrovaného roztoku na pH = 7,4 pomocí HCl, doplní se do 1 litru deionizovanou H₂O.

Příprava 1 x PBS

500 ml roztoku 1 x PBS se připraví ředěním 50 ml 10 x koncentrovaného PBS a 450 ml destilované vody (v poměru 1:10).

Příprava zásobního roztoku PBS-T

500 ml zásobního roztoku PBS-T se připraví se rozpuštěním 2,5 ml Tween 20 a 0,5 ml BSA v 497 ml 1 x PBS.

Příprava 10 x koncentrovaného citrátového pufru

500 ml 10 x koncentrovaného citrátového pufru se připraví rozpuštěním 5,68 g monohydrátu citrátu trisodného v 494,3 ml destilované vody.

Příprava zásobní roztoku Tritonu X-100

100 ml zásobního roztoku Tritonu X-100 se připraví rozpuštěním 2 ml Tritonu X-100 v 98 ml 10 x koncentrovaného citrátového pufru.

Příprava pracovní roztok PI

80 ml pracovního roztoku propidium jodidu se připraví rozpuštěním 4 mg propidium jodidu a 4 ml 2% zásobního roztoku Triton X-100 76 ml destilované vodou.

Příprava 1% roztoku paraformaldehydu

100 ml 1% roztoku paraformaldehydu se připraví smícháním 2,86 ml paraformaldehydu s 50 µl NP-40 v 97,35 ml 1× PBS.

Příprava zásobního roztoku 2N HCl/Triton X-100

1000 ml zásobního roztoku 2N HCl/Triton X-100 se připraví rozpuštěním 5 ml Tritonu X-100 a 300 ml koncentrované HCl v 695 ml destilované vody.

Příprava pracovního roztoku 1 x PBS + 1% glycin

100 ml pracovního roztoku 1 x PBS + 1% glycin se připraví rozpuštěním 1 ml glycinu v 1 x PBS a jeho doplněním na objem 100 ml.

Příprava pracovního roztoku 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40

100 ml pracovního roztoku 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40 se připraví rozpuštěním 100 mg BSA a 100 µl NP-40 v 1 x PBS a jeho doplněním na objem 100 ml.

Příprava pracovního roztoku 1 x PBS + 1% FBS

500 ml pracovního roztoku 1 x PBS + 1% FBS se připraví rozpuštěním 5 ml FBS v 495 ml 1 x PBS.

Příprava 100mmol/dm³ zásobního roztoku BrU

10 ml zásobního roztoku BrU se připraví rozpuštěním 323 mg BrU v 10 ml média RPMI 1640.

Příprava 1mmol/dm³ zásobního roztoku BrdU

10 ml zásobního roztoku BrdU se připraví rozpuštěním 30,71 mg BrdU v RPMI 1640 médiu a jeho doplněním na objem 10 ml.

Příprava roztoku propidium jodidu

- Pro BrU - 100 ml roztoku propidium jodidu pro BrU se připraví rozpuštěním 0,5 mg propidium jodidu ve 100 ml 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40
- Pro BrdU - 100 ml roztoku propidium jodidu pro BrdU se připraví rozpuštěním 5 mg propidium jodidu ve 100 ml 1 x PBS.
- Pro fosforylaci histonu H3-P - 100 ml roztoku propidium jodidu pro fosforylaci histonu H3-P se připraví rozpuštěním 0,5 mg propidium jodidu ve 100 ml 1 x PBS + 1% FBS.

Příprava zásobního roztoku RNázy A

- Pro BrU - 5 ml zásobního roztoku RNázy A pro BrU se připraví rozpuštěním 50 mg RNAázy A v 5 ml 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40.
- Pro BrdU - 5 ml zásobního roztoku RNázy A pro BrdU se připraví rozpuštěním 50 mg RNAázy A v 5 ml 1 x PBS.
- Pro fosforylaci histonu H3-P – 5 ml zásobního roztoku RNázy A pro fosforylaci histonu H3-P se připraví rozpuštěním 2,5 mg RNAázy A v 5 ml 1 x PBS + 1% FBS.

Příprava ředěných protilátek

- Pro BrU - primární protilátka se ředí v poměru 1:250, což odpovídá 4 µl protilátky Anti BrdU clone MoBu-1 na 1 ml 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40. Sekundární protilátka Anti-mouse-IgG-FITC se ředí v poměru 1:250, což odpovídá 4 µl protilátky a 1 ml 1 x PBS/0,1% BSA/0,1% NP-40.
- Pro BrdU - primární protilátka Anti-BrdU (clone MoBu- 1) FITC se ředí v poměru 1:250, to znamená 4 µl protilátky smícháme s 1 ml 1 x PBS. Sekundární protilátka Anti-mouse-IgG-FITC se ředí ve stejném poměru jako primární protilátka.
- Pro fosforylaci histonu H3-P – primární protilátka Anti-phoso-histone H3 se ředí v poměru 1:500, což odpovídá 2 µl a 1 ml 1 x PBS + 1% FBS. Ředění sekundární látky Alexy Fluor 488 goat anti-rabbit IgG je 1:500, což odpovídá 2 µl protilátky a 1 ml 1 x PBS + 1% FBS

Příprava média pro pasážování buněk.

Připraví se smícháním 500 ml RPMI 1640 s 2,5 ml streptomycinu, 250 µl penicilinu a 50 ml fetálního bovinního séra. Následně se směs přefiltruje. Celkově tak vznikne médium o objemu 552,75 ml.

Přístrojové vybavení

Centifuga 5810R (Eppendorf), centrifuga 420R (Rottina), mrazák (Vestfrost), kombinovaná lednice C40230 (Liebher), vodní lázeň sub aqua 12 plus (Grant), vortex genie 2T komplet (Scientific industries), průtokový cytometr FACSCalibur (Becton Dickinson), flowbox Herasafe KS (Thermo scientific), inkubátor CO₂ 371 (Thermoscientific), Cell viability analyzer Vi-Cell XR (Beckman Coulter), mikroskop IX51 (Olympus), analytické váhy SBC 21 (Scaltek), váhy BBI-41 (Boeco Germany), multi-rotator multi RS-60 (Biosan), magnetic stirrer MSH 300 (Biosan).