

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2018**

**Vojtěch Synek**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



# **Identifikace bioaktivních molekul na automatizované HTS platformě**

**Bakalářská práce**

**Vojtěch Synek**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, PhD.**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Soni Gurské, PhD. a s pomocí citované literatury.

V Olomouci dne: ..... Podpis: .....

## **Souhrn**

Vysokokapacitní testování je prvním krokem v hledání nových léčiv. Jedná se o metodu testování velkého počtu látek za účelem jejich použití ve farmaceutickém průmyslu. Poznatky z tohoto testování vedou k výběru aktivních látek, které se posouvají do dalších testů. Velkou výhodou této metody je její účinnost, rychlost a cena. K dosažení těch nejlepších výsledků je zapotřebí automatizovaného robotického systému, citlivých detektorů a výkonného softwaru.

V práci bylo otestováno 268 látek pomocí MTS testu a rozděleno na aktivní a neaktivní. Aktivita látek byla testována v 384- jamkových destičkách na buněčných liniích nádorových i nenádorových. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru Dotmatics.

Ze souboru aktivních látek byly vybrány 3 látky, u nichž byl otestován buněčný cyklus, syntéza DNA a RNA a fosforylace histonu H3. Analýza byla provedena pomocí cytometru FACS Calibur a data byla vyhodnocena v softwaru CellQuest.

## Summary

Bioactive molecules are evaluated using high throughput screening. It is a way of testing large number of compounds in the purpose of using them in pharmaceutical industry. High- throughput screening is the first step in finding new drugs. Findings from the test lead to selection of active compounds. A great advantage of this method is its efficiency, speed and cost. The method needs automated robotic system, sensitive detectors and efficient software to achieve the best results.

In this thesis 268 compounds were tested via MTS test and sorted as active or inactive. The activity of the compounds was tested in 384- well plates on tumor and non-tumor cell lines. The data were validated via the Dotmatics software.

Three compounds were selected from the set of active compounds and cell cycle, DNA and RNA synthesis and histone H3 phosphorylation of the three compounds was analyzed. Analysis was done on cytometer FACS Calibur and the data were validated via the CellQuest software.

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Ing. Soni Gurské, Ph.D za odborné vedení, trpělivost a ochotu při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji všem pracovníkům Laboratoře molekulární a translační medicíny, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, zejména Bc. Renatě Burianové.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Seznam obrázků	8
Seznam tabulek	9
1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Literární přehled	3
3.1. Vysokokapacitní skrínig – High-throughput screening	3
3.1.1. Miniaturizace	3
3.1.2. Automatizace	4
3.1.3. Testy v HTS	5
3.1.3.1. Biochemické testy	6
3.1.3.2. Buněčné testy	6
3.1.3.2.1. Druží poslové	7
3.1.3.2.2. Reportérové geny	7
3.1.3.2.3. Buněčná proliferace	8
3.1.3.2.3.1. Testy pomocí tetrazoliových solí	8
3.1.3.2.3.1.1. MTS	9
3.1.3.2.3.2. Resazurin	10
3.1.3.2.3.3. Aminopeptidázy	10
3.1.3.2.3.4. Kvantifikace adenosintrifosfátu (ATP)	11
3.1.4. Procento inhibice, $IC_{50}$ a $Z'$ faktor	11
4. Materiál a Metody	13
4.1. Materiál	13
4.1.1. Použité chemikálie	13
4.1.2. Použité roztoky	14
4.1.3. Použitá kultivační média	16
4.1.4. Přístroje	17
4.1.5. Buněčné linie	18
4.2. Metodika	19
4.2.1. Pasážování buněčných linií	19
4.2.2. Testování mykoplazmat	19
4.2.3. Příprava buněčných linií	20
4.2.4. Příprava látek pro test	21
4.2.4.1. Primární testování	21
4.2.4.2. Sekundární testování (dose-response, stanovení hodnoty $IC_{50}$ )	21
4.2.5. Ovlivňování buněk	22

4.2.5.1.	Primární testování.....	22
4.2.5.2.	Sekundární testování (dose-response, stanovení hodnot $IC_{50}$ ) .....	22
4.2.6.	MTS test .....	23
4.2.7.	Analýza buněčného cyklu a měření relativní buněčné DNA.....	23
4.2.8.	Analýza DNA syntézy .....	24
4.2.9.	Analýza RNA syntézy .....	25
4.2.10.	Detekce fosforylace histonu H3 .....	26
5.	Výsledky.....	27
5.1.	Primární testování.....	27
5.2.	Sekundární testování .....	28
5.3.	Analýza buněčného cyklu .....	31
5.4.	Analýza apoptózy .....	33
5.5.	Analýza syntézy DNA.....	35
5.6.	Analýza syntézy RNA .....	37
5.7.	Analýza fosforylace histonu H3 .....	39
6.	Diskuze .....	41
7.	Závěr.....	43
8.	Literatura .....	44



## Seznam použitých zkratk

<b>%I</b>	procento inhibice
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-deoxyuridin
<b>BrU</b>	5-bromouridin
<b>BSA</b>	bovinní sérový albumin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát
<b>DMEM</b>	Dublecco's Modified Eagle's Medium
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essential Medium
<b>FRET</b>	Försterův rezonanční přenos energie
<b>GF-AFC</b>	glycyl-fenyl-amino-fluorocoumerin
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>GPCR</b>	receptory spřažené s G proteinem
<b>HTS</b>	high-throughput screening
<b>InsP</b>	inositol fosfát
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolium
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
<b>PI</b>	propidium jodid
<b>PMS</b>	fenazin methosulfátu
<b>TTC</b>	trifenyl tetrazolium chlorid
<b>uHTS</b>	micro high throughput screening

## Seznam obrázků

**Obr. 1:** Reakce MTS na formazan za přítomnosti PMS v mitochondriích životaschopných buněk (převzato od Riss et al., 2013).

**Obr. 2:** Příklad zpracování výsledků z primárního testování vyhodnocené v programu Dotmatics pro 11 látek u buněčné linie CEM-DNR.

**Obr. 3:** Příklad zpracování výsledků sekundárního testování vyhodnocené v programu Dotmatics pro látku LEM 11 465 u buněčné linie CCRF-CEM.

**Obr. 4:** Znázornění počtu látek podle hodnot IC50 u testovaných buněčných linií

**Obr. 5:** Změny v počtu buněk buněčné linie CCRF-CEM v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50 v porovnání s kontrolou. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování

**Obr. 6:** Histogramy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM v různých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50.

**Obr. 7:** Histogramy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM v subG1 po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50.

**Obr. 8:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM syntetizující DNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50.

**Obr. 9:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM syntetizující RNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50

**Obr. 10:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM pozitivně Anti-H3pSer10 – FITC značených po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50

## Seznam tabulek

**Tab. 1:** Principy jednotlivých biochemických testů

**Tab. 2:** Použité buněčné linie, jejich vlastnosti, původ a použité médium ke kultivaci

**Tab. 3:** Koncentrace buněk buněčných linií

**Tab. 4:** Objemy a výsledné koncentrace cytostatik pipetovaných ze zdrojové destičky do 384-jamkové destičky pomocí Echo 550

**Tab. 5:** Počet aktivních a neaktivních látek u všech testovaných buněčných linií při primárním testování.

**Tab. 6:** Rozdělení látek podle IC50 pro každou testovanou buněčnou linii do 4 skupin.

**Tab. 7:** Hodnoty IC50 3 látek pro všechny testované buněčné linie získané pomocí MTS testu vybrané pro další analýzy.

**Tab. 8:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

**Tab. 9:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM v subG1 po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

**Tab. 10:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM syntetizujících DNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

**Tab. 11:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM syntetizujících RNA působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

**Tab. 12:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM, u kterých byla detekována fosforylace histonu H3Ser10 po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC50 a 5x IC50. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

## 1. Úvod

Systematický výzkum léčiv začal zhruba před 100 lety, když chemie byla natolik vyspělá, že se její zásady a metody daly aplikovat na problémy mimo její obor. V té době se farmakologie stala jasně definovanou disciplínou. První léčivo objeveno pomocí farmaceutického testování byl Salvarsan v roce 1907 (Ehrlich et Bertheim, 1912). Až do 40. let 20. století byl Salvarsan bezkonkurenčně nejlepším lékem syfilidy, i přes jeho vedlejší účinky na lidský organismus (Alt, 1909). Až po druhé světové válce byl Salvarsan nahrazen Penicilinem, kvůli jednodušší přípravě (Benedek, 1978). V té době bylo testování založeno na fenotypových hodnotách (Ehrlich et Bertheim, 1912).

Později ve 20. století bylo testování molekul ovlivněno biochemií. Hlavními cíli léčiv se staly enzymy a receptory. Princip jejich klasifikace byl základem pro objev léčiv jako například agonisty a antagonisty  $\beta$ -adrenoreceptorů, benzodiazepiny, antagonisty angiotensinového receptoru a monoklonální protilátky. Léčiva prodáváná v současnosti mají za cíl různé biomolekuly od enzymů a transportérů po receptory spřažené s G-proteinem či iontové kanály (Kroeze et al., 2003).

Velký technologický pokrok byl zaznamenán u vysokokapacitního skríníngu (high-throughput screening, HTS) a buněčných testů v posledních 20 letech. HTS testování vedlo k novému konceptu objevování léčiv. V HTS je využíváno buněčných nebo biochemických testů, které obsahují cíle s terapeutickým potenciálem. Tyto cíle jsou vystaveny velkému počtu sloučenin (Mann, 2002). Úkolem je tedy z testovaných sloučenin vyselektovat aktivní látky, které se mohou stát kandidáty pro klinické testování. Tyto látky jsou nalézány jen zřídka a častěji spíše slouží jako výchozí body, u kterých se modifikuje struktura a tříbí se biologické vlastnosti před tím, než se konečné léčivo vyvine (Hoelder et al, 2012).

## **2. Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se vysokokapacitním testováním, metodami spojenými s touto platformou a přístroji zajišťujícími práci v tomto odvětví.

Experimentální část byla zaměřena na chod laboratoře tkáňových kultur a práci s nádorovými a nenádorovými liniemi. Hlavním cílem práce bylo otestování látek na jejich cytotoxicitu u různých buněčných linií a stanovení hodnot  $IC_{50}$

## **3. Literární přehled**

### **3.1. Vysokokapacitní skríníng – High-throughput screening**

Vysokokapacitní skríníng (High-throughput screening, HTS) je strategie využívána při objevování nových potenciálních léčiv (hity), které ovlivňují biologickou aktivitu vybraných cílů nebo buněčné fenotypy. Nalézání hitů je ve farmaceutickém výzkumu prvním krokem v hledání látek, které se mohou stát budoucími léčivy na základě hodnot z různých testů (Shun et al., 2011). První skríníngové programy se začaly používat v 70. letech. Takto byly objeveny látky jako cyclosporin A, imunosupresivum (White, 1982) nebo lovastatin, inhibitor HMGA-Co reductázy (Alberts, 1988). V 80. až 90. letech byly metody testující látky tlačeny poptávkou k vyšší rychlosti a většímu množství otestovaných chemických knihoven (Macarron, 2006). To vedlo ke vzniku HTS, disciplíny specializované k testování velkého množství látek v krátkém čase. S tím se objevilo několik stěžejních technologií, jako mikrotitrační destičky, vysokovýkonné pipetovací zařízení, homogenní testování a automatizace (Carnero, 2006). Osekvencování celého lidského genomu v roce 2005 (International HapMap Consortium, 2005) a genomu mnoha patogenů, jako mikrobů, bakterií a virů, nabídlo tisíce potenciálních biologických cílů k testování. Velké počty cílů a látek vedly ještě k rychlejšímu procesu testování, miniaturizaci destiček a automatizaci HTS. Dnes je HTS schopna otestovat 10 000 – 100 000 sloučenin denně a ultra-HTS (uHTS) více než 100 000 sloučenin denně (Mayr et Bojanic, 2009) a je považována za hlavní pilíř farmaceutického rozvoje (Inglese et al., 2006). Hlavními znaky HTS a uHTS jsou miniaturizace, automatizace a citlivé metody detekce (Mayr et Bojanic, 2009).

#### **3.1.1. Miniaturizace**

Zvýšení počtu chemikálií a molekulárních cílů vedlo k miniaturizaci HTS (Mayr et Bojanic, 2009). První mikrotitrační systém vyrobil maďarský lékař a mikrobiolog Gyula Takatsy (Kensy et al., 2005). Jednalo se o 96- jamkové destičky a tyto destičky byly použity k sérologickým studiím (Duetz, 2007). 96- jamkové mikrotitrační destičky se používaly do poloviny 90. let. Ovšem během dalších deseti let se začaly vyvíjet destičky s větší hustotou jamek na stejné ploše. Nová destička měla čtyřikrát více jamek než destička 96- jamková, tedy 384. Objemy, se kterými se pracuje v 96- jamkových destičkách se pohybují v rozmezí 100 - 200  $\mu$ l. U 384- jamkových destiček tento objem činí maximálně 50  $\mu$ l. 384- jamkové destičky jsou zavedeným standardním formátem u většiny farmaceutických a biotechnologických firem (Mayr et Bojanic, 2009).

S nástupem uHTS se počet jamek na destičku ještě zvýšil. HTS se vyvinula do podoby, kdy bylo testování prováděno na 1536- jamkových destičkách s objemy menšími než 2  $\mu$ l. To markantně zrychlilo a snížilo cenu testování. Extrémně malé objemy vyžadují určité vlastnosti destičky. Tvar i hloubka jamky mají přímý vliv na test. Hluboké destičky minimalizují vypařování. Čím strmější je stěna jamky, tím lépe se látka fokusuje v jejím středu, což snižuje riziko tvorby vzduchových bublinek (Carnero, 2006).

V uHTS se v některých laboratořích běžně pracuje i s 2080- až 9600- jamkovými destičkami. 2080- jamková destička například umožňuje distribuci 1536 sloučenin, 4 řady jamek obsahující kontroly a okrajové jamky s vodou, které slouží jako ochrana před vypařováním (Wölcke et Ullmann, 2001). Výhody těchto destiček jsou ještě větší snížení ceny za použité sloučeniny díky malým pipetovaným objemům a možnosti testovat v duplikátech a triplikátech na rozdíl od tradičních testů, které testují singlety. Nakonec tyto vysokokapacitní destičky dovolují otestovat i ty největší chemické knihovny na méně než 100–400 destičkách (Oldenburg et al., 1998). V případě buněčných testů je míra miniaturizace limitována. Se snižujícím objemem se snižuje i počet buněk v jamce, což nám umožňuje studovat jednotlivé buňky. V takových případech se právě individualita buněk stává problémem, jelikož buňky nedávají vyrovnané výsledky a znehodnocují naměřená data (Smith, 2002). Tento problém představuje technologickou výzvu, která se obtížně překonává (Wölcke et Ullmann, 2001).

### **3.1.2. Automatizace**

Miniaturizované testy prováděné v 2 $\mu$ l objemech vyžadují vybavení schopné spolehlivě pracovat v těchto objemových jednotkách (Carnero, 2006). Využíváme k tomu pokročilé skriningové technologie jako robotické manipulátory s destičkami, nízko-objemové dispenzery, citlivé detektory (Inglese et al., 2006) a software pro kontrolu a zpracování dat (Hong et al., 2009).

Robotické manipulátory jsou robotická automatizovaná ramena, která přesně a precizně zacházejí s destičkami. Každé rameno se může pohybovat až v šesti osách a na koncích obsahuje úchyt a čtečku čárových kódů. Úchyty jsou uzpůsobeny tak, aby z nich destička nevypadla. Čtečka skenuje čárový kód na straně každé destičky zajišťující její správný výběr (Michael et al., 2008).

Důležitým prvkem automatizace je i zacházení s kapalinami (Hertzberg et Pope, 2000). Proces pipetování do destiček potřebuje flexibilní systém, který je schopen převádět kapaliny do malých jamek destiček (Carnero, 2006). To nám umožňují dávkovače. Dávkovače rozdělujeme na kontaktní a bezkontaktní (Dunn et Feygin, 2000).

Kontaktní dávkovače jsou nejstarší a plně vyvinuté. Využívají jehly, špičky, peristaltické pumpy nebo piezoeletrické síly. Jehlové dávkovače vyžadují čištění a vyměňování špiček, díky čemuž jsou velmi pomalé (Dunn et Feygin, 2000).

Proto bezkontaktní dávkovače nabývají na důležitosti (Koltay et Zengerle, 2007). Výhody bezkontaktních dávkovačů jsou jejich rychlost, minimální kontaminace, snížení odpařování kapaliny a odstranění potřeby čištění zařízení mezi přenosy různých kapalin. Fungují na mechanismu tvoření kapiček působením vnější síly na pipetovanou kapalinu. Vnější síla může být buď síla akustická, nebo tlaková (Dunn et Feygin, 2000).

Pro vyhodnocení testů potřebuje proces citlivé detektory. K takovým detektorům patří například EnVision, ViewLux, Acumen Explorer (Michael et al., 2008) nebo FLIPR (Hertzberg et Pope, 2000). ViewLux dokáže rychle detekovat luminiscenci, fluorescenci, absorpenci, Försterův rezonanční přenos energie (FRET) a fluorescenční polarizovaný signál. EnVision k tomu všemu dokáže číst destičky ze spodu, což je využíváno například při  $\beta$ -laktamázových reportérových testech. Acumen Explorer je cytometr, který používá laser k detekci fluorescenčních signálů jednotlivých buněk (Michael et al., 2008). Poslední zmíněný detektor, FLIPR, je fluorescenční detektor s vestavěným manipulátorem kapalin, který umožňuje intracelulární mobilizaci vápníku v reálném čase (Hertzberg et Pope, 2000). Doba detekce trvá něco okolo 30 sekund i s transportem destičky vně a dovnitř detektoru (Michael et al., 2008).

### **3.1.3. Testy v HTS**

Cíl automatizace, miniaturizace a zvýšené kapacity klade důraz na vývoj homogenních testovacích formátů a využití vysoce citlivých detekčních metod. Homogenní testy jsou pro HTS ideální, jelikož se vyhýbají filtracím, separacím a promýváním, což bývá časově náročné a těžko se automatizuje (Sundberg, 2000). Testování v HTS se dá rozdělit do dvou kategorií: biochemické testy a buněčné testy (Frank An et Tolliday, 2010).



### 3.1.3.1. Biochemické testy

Biochemické testy jsou testy zaměřeny na určitý cíl. Takové testy zahrnují stanovení enzymových aktivit (kinázy, proteázy, transferázy atd.), vazbu ligand-receptor, ligand-iontový kanál nebo interakce protein-protein (Frank An et Tolliday, 2010). Principy jednotlivých metod shrnuje tabulka 1 (González et al., 1999; Szymański et al., 2011; Spencer, 1998; Du, 2015).

**Tabulka 1:** Principy jednotlivých biochemických testů

Test	Princip
Testy enzymové aktivity	Měření inhibice enzymové aktivity po přidání enzymového inhibitoru elektrochemickými/optickými metodami
Ligand-receptor vazebný test	Měření interakce ligand-protein radioaktivními/optickými metodami
Ligand-iontový kanál vazebný test	Měření proudu/napětí buněčné membrány po navázání ligandu na iontový kanál
Interakce protein-protein	Měření fluorescence malých značených fluorescenčně molekul po navázání na molekuly proteinu

### 3.1.3.2. Buněčné testy

Buněčné testy jsou zavedenou metodou testování ve farmaceutickém průmyslu. Tyto testy umožňují hodnocení potenciálních cílů léčiva charakterizováním jejich efektu v buňce. Dokáží poskytnout informaci o povaze léčiva na specifickém receptoru, iontovém kanálu nebo vnitrobuněčném cíli (Szymański et al., 2011). Buněčné testy se dají rozdělit do tří kategorií: testy druhých posílů, testy reportérových genů a testy buněčné proliferace (Sundberg, 2000). Buňky užívané v těchto testech by měly důvěryhodně napodobovat buněčný systém (Zang et al., 2012).

Primární buňky poskytují reprezentativní odpovědi, ale mají limitovanou životnost a není jednoduché je množit. Lidské nádorové buňky reprezentují původní nádor a jsou široce rozšířené v protirakovinném testování. Někdy ovšem obsahují mutace, což může ovlivnit výsledky experimentálních testů (Zang et al., 2012).

### 3.1.3.2.1. Druží poslové

Intracelulární druzí poslové jsou využíváni buňkou ke spojování extracelulárních stimulů s jejich charakteristickými intracelulárními odpověďmi. Interakce extracelulárního stimulu s receptorem spustí kaskádu událostí, která vede ke změně (většinou zvýšení) koncentrace jiné molekuly v cytosolu (Webb et al., 1996). Testy druhých poslů monitorují vedení signálu, kterému předchází aktivace receptorů na povrchu buňky (Sundberg, 2000). Jedny z nejdůležitějších receptorů jsou tzv. receptory spřažené s G proteinem (GPCR). GPCR jsou největší skupinou farmaceutických cílů léčiv a jsou spojeny s různými fyziologickými poruchami. Testy měřící GPCR se dají rozdělit do 2 kategorií. Buď se přímo měří druzí poslové jako cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát (cAMP), inositol fosfát (InsP) a vápenaté kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nebo se měří pomocí reportérových genů. (Knapuli et al., 2003).

Měření  $\text{Ca}^{2+}$  jako druhého posla se provádí pomocí fluorescenčních barviv. Takovým barvivem je např. fotoprotein aequorin. Je to protein izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, který vytváří bioluminiscenční komplex po navázání na coelenterazin. Když se na tento komplex naváže  $\text{Ca}^{2+}$ , proběhne oxidační reakce a vytváří se apoaequorin, coelenteramid,  $\text{CO}_2$  a světlo s absorpčním maximem při 469 nm (Fichna et al., 2006).

K měření cAMP můžou být využity různé technologie, jako například radioimunoanalýza, enzymoimunoanalýza (EIA) nebo fluorescenční polarizace. Většinou se jedná o kompetitivní eseje, které využívají cAMP-protilátku a monitorují ztrátu signálu přidaného cAMP-konjugátu a cAMP vytvářeného v buňkách (Weber et al., 2004).

### 3.1.3.2.2. Reportérové geny

Testy reportérových genů monitorují buněčné odpovědi na úrovni transkripce/translace (Sundberg, 2000). Technika reportérových genů zahrnuje spojení genu pro enzym nebo zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein – GFP) se sledovaným genem v cílové buněčné linii tak, že aktivace sledovaného genu povede k expresi produktu reportérového genu. Tento produkt se poté detekuje kolorimetricky, fluorimetricky nebo luminiscenčně (Sundberg, 2000). Reportérové geny kódují enzymy jako alkohol dehydrogenázu, alkalickou fosfatázu, světluškovou luciferázu, galaktokinázu,  $\beta$ -galaktosidázu, bakteriální luciferázu nebo *Renilla* luciferázu.

Luminiscenční enzymy reportérových genů fungují dvěma způsoby. Buďto gen přímo produkuje bioluminiscenční produkt (luciferáza), nebo produkuje enzym bez bioluminiscenčních vlastností, ke kterému se poté přidá specifické chemiluminiscenci-zvyšující činidlo např. poly(benzylmethylvinylbenzyl)-chlorid amonný (Bronstein et al., 1994).

### **3.1.3.2.3. Buněčná proliferace**

Testy buněčné proliferace sledují celkový růst buněk jako odpověď na vnější stimul (Sundberg, 2000). Spousta biologických testů vyžaduje měření životaschopnosti a proliferace savčích buněk. Toho se dá docílit několika metodami například počítáním buněk obsahujících/neobsahujících barvivo, měření <sup>51</sup>Cr-značeného proteinu uvolněného po lýzi buňky nebo měření inkorporace radioaktivních nukleotidů [<sup>3</sup>H]thymidinu nebo [<sup>125</sup>I]jododeoxyuridinu (Mosmann, 1983).

Obecně se uvažuje, že indikátor životaschopnosti buněk je aktivita mitochondriálního dýchacího řetězce (Galluzzi et al., 2009). Životaschopnost buněk se dá měřit pomocí barvicích metod. K tomu mohou být použity spektrofotometry skenující vícejamkové destičky. Dokáží měřit velké množství vzorků s vysokou precizností. Ideálně by taková metoda měla pracovat s bezbarvým substrátem, který je v živé buňce metabolizován na barevný produkt, ale v mrtvé buňce už nikoliv. Nejlepšími kandidáty pro tyto účely jsou tetrazoliové soli (Mosmann, 1983). Výhodou těchto kolorimetrických testů nad značením radioizotopy je cena za činidla a vybavení a vyhnutí se problému s nebezpečným radioaktivním odpadem (Roehm et al., 1991).

#### **3.1.3.2.3.1. Testy pomocí tetrazoliových solí**

Tetrazoliové soli jsou dnes jedny z nejpoužívanějších nástrojů k měření metabolické aktivity buněk různých původů od savčích po mikrobiální. Principem těchto testů je redukce žluté tetrazoliové soli pomocí dehydrogenázy na fialový produkt, známý jako formazan (Berridge et al., 2005). Tato redukce probíhá v mitochondriálním dýchacím řetězci (Galluzzi et al., 2009). První prototypní molekula, trifenyl tetrazolium chlorid (TTC), byla syntetizována už před více než sto lety, a od té doby byla modifikována přidáváním nitro, jodo nebo methoxy skupin. Naprostá většina využití tetrazoliových solí zahrnuje testy v mikrotitračních destičkách, které měří proliferaci.

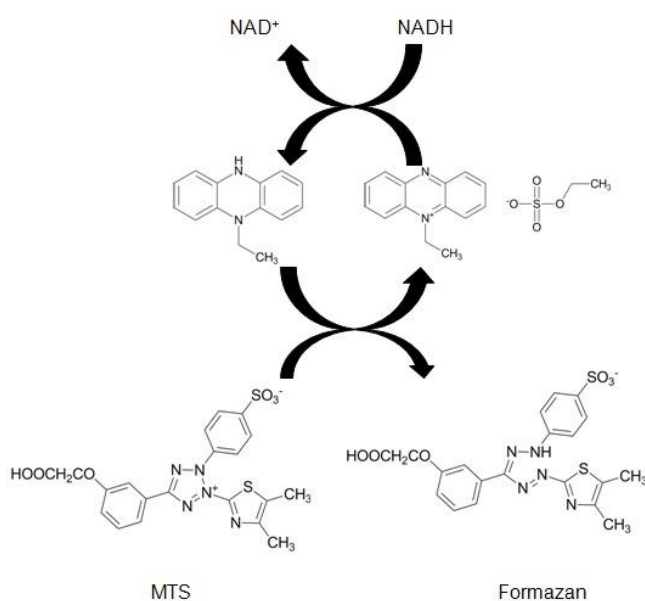
Předpokládá se, že množství redukovaného barevného produktu bude přímo úměrné množství životoschopných buněk (Berridge et al., 2005). Čím déle se buňky inkubují s tetrazoliovou solí, tím více se v nich hromadí formazan. Proto množství naměřeného formazanu nemusí nutně vypovídat o množství životoschopných buněk, ale spíše o dehydrogenázové aktivitě v každé jamce destičky (Griebe et al., 1997).

Tetrazoliové soli dělíme do dvou skupin. První skupinu tvoří MTT a NBT, jejichž formazany jsou nerozpustné ve vodě. Do druhé skupiny patří MTS, XTT nebo WST-1, ze kterých se tvoří ve vodě rozpustné formazany (Berridge et al., 2005).

### 3.1.3.2.3.1.1. MTS

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2(4-sulfonyl)-2H tetrazolium (MTS) je měněn dehydrogenázou v mitochondriích metabolicky aktivních buněk na ve vodě rozpustný barevný formazan. Tento produkt je kvantifikován spektrofotometricky. Maximální absorbance je měřena kolem 490 nm a je přímo úměrná počtu živých buněk v kultuře (Mosmann, 1983). Bioredukce MTS běžně potřebuje přidání elektronového akceptoru, fenazin methosulfátu (PMS) (Goodwin et al., 1995) nebo fenazin ethylsulfátu (PES) (Berridge et al., 2005). Reakce je znázorněna na obrázku 1.

**Obr. 1:** Reakce MTS na formazan za přítomnosti PMS v mitochondriích životoschopných buněk (převzato od Riss et al., 2013).



Hlavní výhodou MTS je fakt, že jeho formazan je rozpustný ve vodě. Díky tomu můžeme okamžitě měřit absorbanci jednotlivých jamek, kde se formazan vytvořil. Tím se MTS zásadně liší od MTT, jehož formazan je ve vodě nerozpustný krystal. Celý proces kvantifikace MTT zahrnuje ještě mezikrok, který obnáší rozpuštění formazanu v SDS přes noc. To zpomaluje celý test.

### **3.1.3.2.3.2. Resazurin**

Životaschopnost buněk může být měřena i za pomoci redoxního indikátoru resazurinu. Resazurin je látka rozpustná ve fyziologických pufrch a může být přidána do rostoucích buněčných kultur v jediném kroku. Resazurin je v buňkách, stejně jako tetrazoliové soli, také redukován. Produktem této reakce je resorufin a dá se měřit fluorescenčně za použití 560nm excitačního a 590nm emisního filtru (Niles et al., 2009).

Resorufin se v buňkách akumuluje s přibývajícím časem. Čas inkubace, postačující k vytvoření adekvátního signálu, se pohybuje kolem 2–4 hodin. Toto číslo se může měnit u různých buněčných linií. Resazurinové testy byly adaptovány na 1536- jamkovou destičku, ale typicky jsou vhodnější pro 384- nebo 96- jamkové destičky (Niles et al., 2009).

Hlavními výhodami resazurinových testů jsou stabilita činidel a jednoduchost použití. Nevýhodou resazurinu je jeho interference s přirozeně redukujícími látkami nebo s fluorescenčními látkami (Niles et al., 2009).

### **3.1.3.2.3.3. Aminopeptidázy**

Eukaryotické buňky obsahují mnohé komponenty s proteolytickou aktivitou, které se snaží zachovat homeostázu. Jedním z takových komponentů je glycyl-fenyl-amino-fluorocoumerin (GF-AFC). Tento membránou propustný proteázový substrát se dá využít v testování životaschopnosti buněk. GF-AFC může být zpracován aminopeptidázami v cytoplazmě buněk. Množství takto vzniklého produktu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk. Signál se poté měří na fluorometru s 380-400nm excitačním filtrem a 505nm emisním filtrem (Niles et al., 2009).

Měření touto metodou je možné, protože proteolytické aktivity se ztrácí během sekund od cytotoxického děje, takže neživotaschopné buňky se nepodílejí na tvorbě fluorescenčního signálu. Běžně se GF-AFC inkubuje v buňkách po 30 minut při 37 °C (Niles et al., 2009).

### 3.1.3.2.3.4. Kvantifikace adenosintrifosfátu (ATP)

ATP kvantifikace je metoda hodnotící životaschopnost buněk, protože zdravé buňky obsahují regulované množství ATP. Nejenže neživotaschopné buňky nemají schopnost syntetizovat ATP, ale obsahují i endogenní ATPázy, které rychle spotřebovávají zbylé ATP. Kvantifikace ATP se provádí pomocí luciferázové reakce generováním luminiscenčního signálu, který je přímo úměrný počtu životaschopných buněk (Niles et al., 2009)

Všechna komerčně vyráběná činidla pro ATP kvantifikaci obsahují luciferázový enzym, luciferázový substrát a lytický pufr. Lyze buněk je nezbytná k získání ATP z buňky. Hlavní výhodou ATP kvantifikace je fakt, že patří k nejrychlejším a nejcitlivějším metodám v HTS pro stanovení životaschopnosti buněk. Navzdory všem výhodám ATP kvantifikace nese i nevýhody. Jelikož ATP-dependentní luciferáza je náchylná k změnám teplot, je zapotřebí vyrovnaná teplota místnosti a minimalizace termálního gradientu vytvořeného různou pozicí jamek na destičce. (Niles et al., 2009).

### 3.1.4. Procento inhibice, IC<sub>50</sub> a Z' faktor

Cílem HTS je odlišit aktivní látky od látek neaktivních. V ideálním HTS testu se aktivní látka chová naprosto odlišně než neaktivní látka. V praxi jsou všechny testy HTS zatíženy statistickou variabilitou. Obecně se v HTS snažíme o maximalizaci detekovaného signálu, minimalizaci variability testů a určení prahové hodnoty pro odlišení aktivních látek od těch méně aktivních nebo neaktivních látek. K selekci aktivních látek využíváme hodnotu procenta inhibice.

Procento inhibice je procentuální množství buněk, které po ovlivnění látkou nebyly životaschopné. Hodnota se měří v primárním testování HTS, kde je použita látka jen v jedné koncentraci. Vzorec pro procento inhibice vypadá následovně:

$$PI = 100 - \frac{A_i - C_-}{C_+ - C_-} \times 100$$

$A_i$  je měření látky,  $C_-$  je průměr negativních kontrol a  $C_+$  je průměr pozitivních kontrol. Je vypočítáno procento inhibice a určí se jeho prahová hodnota, např. 50 %. Látky, které překročily tuto hodnotu se vyhodnotí jako aktivní a ty, které ji nepřekročily, jako neaktivní (Shun et al., 2011).

Aktivní látky pokračují do sekundárního testování, kde jsou buňky ovlivňovány každou aktivní látkou při různých koncentracích. Z naměřených hodnot se vytvoří graf, kde je na vodorovné ose koncentrace látky a na svislé ose procentuální hodnota životaschopnosti buněk. Z křivky se poté odečte hodnota  $IC_{50}$ , která odpovídá koncentraci látky, při níž byla životaschopnost logaritmus buněk rovna 50 % (Shun et al., 2011).

Kvalita celého testu je významný faktor pro každé testování, jak primární, tak sekundární. K hodnocení kvality HTS testu slouží  $Z'$  faktor. Je vypočítán z tohoto vzorce:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{C_+} + 3\sigma_{C_-})}{|C_+ - C_-|}$$

Kde  $C_+$  je průměr pozitivních kontrol,  $C_-$  průměr negativních kontrol,  $\sigma_{C_+}$  standardní odchylka pozitivních kontrol a  $\sigma_{C_-}$  standardní odchylka negativních kontrol.  $Z'$  faktor je parametr kvality testu bez zásahu testovaných látek. Pokud je  $Z'$  faktor nízký, není optimalizována konfigurace testu a test není vhodný pro získání použitelných dat. V HTS musí být  $Z'$  faktor vyšší než 0,5 (Zhang et al., 1999).

## **4. Materiál a Metody**

### **4.1. Materiál**

#### **4.1.1. Použité chemikálie**

**5-bromo-2'-deoxyuridin, BrdU** (125H0932, Sigma-Aldrich, USA)

**5-bromouridin, BrU** (850187, Sigma-Aldrich, USA)

**Aktinomycin D** (Merck & Co. Inc., USA)

**Bovinní sérový albumin** (A 7906, Sigma-Aldrich, USA)

**Destilovaná voda**

**Dublecco's Modified Eagle's Medium** (Sigma-Aldrich, USA)

**Ethanol bezvodý p.a.** (605458, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR)

**Eagle's Minimum Essential Medium** (Sigma-Aldrich, USA)

**Fetální bovinní sérum 10%, FCSI** (PAN-Biotech GmbH, Německo)

**Formaldehyd 35%** (20120625, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR)

**Glycin** (14864, Serva, Německo)

**HCl** (A150273/01, Lachema, ČR)

**Iscove's modified dublecco's Medium** (Sigma-Aldrich, USA)

**KCl** (APO-30076, Sigma-Aldrich, USA)

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (APO-30016, Lach-Ner, s.r.o., ČR)

**L-glutamin** (Sigma-Aldrich, USA)

**McCoy's 5A médium** (Sigma-Aldrich, USA)

**Mitomycin C** (NORDIC Pharma, ČR)

**MTS reakční pudr, G1111**, Promega, USA)

**Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O** (30870, Lach-Ner, s.r.o., ČR)

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O** (Lach-Ner, s.r.o., ČR)

**NaCl** (A131428, mikroChem, Slovensko)

**Nonidet P 40** (NP-40, 74385, Sigma-Aldrich, USA)



**Penicilin a streptomycin** (Sigma-Aldrich, USA)

**Propidium jodid** (PI, SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA)

**RPMI-1640 médium** (Sigma-Aldrich, USA)

**Tris-HCl** (Sigma-Aldrich, USA)

**Triton X-100** (1000009002931, Sigma-Aldrich, USA)

**Tween-20** (37470, Serva, Německo)

#### **4.1.2. Použité roztoky**

##### **10x PBS**

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Poté bylo doplněno na objem 1 l. Bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH. Roztok byl autoklávován a skladován při laboratorní teplotě.

##### **1x PBS**

100 ml 10x PBS bylo smícháno s 900 ml H<sub>2</sub>O. Bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 pomocí 0,1mol/l HCl nebo 0,1mol/l NaOH.

##### **1x PBS + 1% glycinem**

##### **1x PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40**

##### **1x PBS + 1% formaldehyd + 0,05% NP-40**

##### **1x PBS + 1% FbS**

##### **1x PBS + 0,25% Triton X-100**

##### **70% ethanol**

##### **Lyzační pufr**

7,88 g 1M TRIS-HCl bylo rozpuštěno v 40 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,3 pomocí 1 mol/l HCl. Roztok byl doplněn do 50 ml.

18,64 g 5M KCl bylo rozpuštěno v 40 ml destilované vody a doplněno do 50 ml.

1 ml TRIS-HCl, 1 ml KCl a 1 ml TRITON X-100 bylo přidáno do skleněné lahve a bylo destilovanou vodou doplněno do 100 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

### **Roztok MTS**

2 mg/ml 2 g MTS rozpustit v 1 litru 1x PBS. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 6 – 6,5 pomocí 1 mol/l HCl. Litr roztoku byl přefiltrován přes filtr a byl rozdávkován do skleněných lahví po 100 ml a obalen alobalem. Poté byl uchováván při - 80 °C.

### **Roztok PMS**

0,1 g PMS bylo rozpuštěno v 20 ml 1x PBS, rozdávkováno po 1 ml do mikrokumavek a uchováváno při -14 °C.

### **2 mol/l HCl + 0,5 Triton x-100 v H<sub>2</sub>O**

### **Borax (pH 8,5)**

3,82 g 0,1mol/l Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Bylo upraveno pH na hodnotu 8,5 pomocí 1mol/l HCl.

### **PBS/tween/BSA**

1x PBS s 0,5% tween a 0,1% BSA.

### **RNasa 1 pro BrdU analýzu**

10 mg/ml RNase v 1x PBS

### **RNasa 2 pro BrU analýzu**

10 mg/ml RNase v 1x PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40

### **RNasa 3 pro analýzu fosforylace histonu**

0,5 mg/ml RNase v 1x PBS + 1% FbS

### **Roztok Propidium jodid (PI) 1 pro BrdU analýzu**

50µg/ml PI v 1x PBS

### **Roztok PI 2 pro BrU analýzu**

50µg/ml PI v 1x PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40

### **Roztok PI 3 pro analýzu fosforylace histonu**

50µg/ml PI v 1x PBS + 1% FbS

### **4.1.3. Použitá kultivační média**

Všechna média byla připravena i bez antibiotik pro testování přítomnosti mykoplazmat.

#### **Dublecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**

Do 450 ml DMEM-Eagle s L-glutaminem bylo přidáno 50 ml 10% fetálního bovinního séra (FCSI) a 5 ml penicilinu a streptomycinu. Roztok byl přefiltrován přes filtr do skleněné lahve a uchován v lednici.

#### **Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)**

Do 450 ml MEM-Eagle bylo přidáno 50 ml 10% FCSI, 5 ml pyruvátu sodného, 500 µl neesenciálních aminokyselin a 5 ml penicilinu a streptomycinu. Roztok byl přefiltrován přes filtr do skleněné lahve a uchován v lednici.

#### **Iscové médium**

Do 450 ml Iscove's modified dublecco's média bylo přidáno 50 ml 10% FCSI a 5 ml penicilinu a streptomycinu. Roztok byl přefiltrován přes filtr do skleněné lahve a uchován v lednici.

#### **McCoy médium**

Do 450 ml McCoy's 5A média bylo přidáno 50 ml 10% FCSI, 7,5 ml 200mmol/l L-glutaminu a 5 ml penicilinu a streptomycinu. Roztok byl přefiltrován přes filtr do skleněné lahve a uchován v lednici.

#### **RPMI-1640 médium**

Do 450 ml RPMI-1640 média bylo přidáno 50 ml 10% FCSI a 5 ml penicilinu a streptomycinu. Roztok byl přefiltrován přes filtr do skleněné lahve a uchován v lednici.

#### **4.1.4. Přístroje**

Analytické váhy (Scaltech, USA)

Biotek EL406 Washer Dispenser (BioTek Instruments, USA)

Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)

CO<sub>2</sub> Inkubátor HeraCell 150 (ThermoScientific, USA)

Echo 550 (LabCyte, USA)

Echo 555 (LabCyte, USA)

EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)

EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA)

FlowBox HeraSafe (Thermo Scientific, USA)

Industrial Robot (Denso, Japonsko)

Míchačka MR Hei – Tec (Heidolph Instruments GmbH, Německo)

pH metr Ultra Basic (P-LAB, ČR)

PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies, USA)

Průtokový cytometr FACS Calibur (BD, USA)

SteriStore Self-Sterilizing Automated Incubator (HighResBiosolutions, USA)

Světelný mikroskop (Olympus, Japonsko)

Tecan Freedom EVO (Tecan, Švýcarsko)

Temperovaná vodní lázeň (Mettler, Německo)

Tundra Store Automated Low Temperature Freezer (HighResBiosolutions, USA)

Váha pětímístná XA (RadWag, ČR)

Vi-Cell XR (BeckmanCoulter, USA)

Vodní lázeň Sub Aqua 12 plus (Grant, Velká Británie)

Vortex IKA Genius 3 (P-LAB, ČR)

X-Peel Automated Microplate Seal Removal (Brooks Life Science System, USA)

#### 4.1.5. Buněčné linie

BJ (ATCC, USA)

MRC-5 (American Tissue and Cultures Collection- ATCC, USA)

A549 (ATCC, USA)

HCT116 (Horizon, UK)

HCT116 p53 -/- (Horizon, UK)

U2OS (Dr. Martin Mistrík, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)

CCRF CEM (ATCC, USA)

CEM DNR (Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)

K562 (ATCC, USA)

K562-TAX (Laboratoř tkáňových kultur, Ústav molekulární a translační medicíny UP Olomouc, ČR)

**Tab. 2:** Použité buněčné linie, jejich vlastnosti, původ a použité médium ke kultivaci

Název linie	Fenotyp	Původ	Médium	Rezistence
<b>Nenádorové linie</b>				
<b>BJ</b>	Adherentní	Fibroblasty lidské předkožky	EMEM	/
<b>MRC-5</b>	Adherentní	Fibroblasty plicní tkáň	EMEM	/
<b>Nádorové linie</b>				
<b>A549</b>	Adherentní	Karcinom plic	DMEM	/
<b>HCT116</b>	Adherentní	Karcinom tlustého střeva	McCoy	/
<b>HCT116 p53 -/-</b>	Adherentní	Karcinom tlustého střeva	McCoy	/
<b>U2OS</b>	Adherentní	Sarkom kosti	McCoy	/
<b>CCRF CEM</b>	Suspenzní	Akutní lymfoblastická leukémie	RPMI-1640	/
<b>CEM DNR</b>	Suspenzní	Akutní lymfoblastická leukémie	RPMI-1640	Daunorubicin
<b>K562</b>	Suspenzní	Chronická myeloidní leukémie	Iscové médium	/
<b>K562-TAX</b>	Suspenzní	Chronická myeloidní leukémie	Iscové médium	Paclitaxel

## **4.2. Metodika**

### **4.2.1. Pasážování buněčných linií**

Všechny buněčné linie jsou kultivované v plastových kultivačních lahvích. Plastové kultivační lahve jsou uchovávány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Buňky se dělí a spotřebovávají živiny v živném médiu. Po spotřebování živin a zaplnění většiny kultivační lahve buňky umírají. Proto se buněčné linie musí pasážovat.

Adherentní buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem. Obsah lahve byl vylit a vymyt 1x PBS od zbylého média. Byl přidán 1 ml trypsinu a buňky byly inkubovány 3 minuty při 37 °C, aby se odlepily ode dna lahve. Poté bylo do lahve přidáno 10 ml média odpovídající dané buněčné linii. Postupným nasáváním a vypouštěním média pipetou byly buňky spláchnuty ze stěny lahve. Obsah lahve byl přelit do 50ml falkony. Byla spočítána koncentrace a životaschopnost buněk na přístroji Vi-Cell. Poté byl obsah falkony zcentrifugován (1200 rpm, 20 °C, 5 minut). Obsah falkony byl vylit do odpadu a pelet buněk byl resuspendován v živném médiu. Do kultivační lahve bylo napipetováno 10 ml média a z 50ml falkony byl přenesen do kultivační lahve objem, který obsahoval požadované množství buněk.

Suspenní buněčné linie se při pasážování nemusí trypsinizovat, jelikož buňky byly volně rozptýlené v celém objemu média. Obsah kultivační lahve byl ve flow-boxu přelit do 50ml falkony. Byla spočítána koncentrace a životaschopnost buněk na přístroji Vi-Cell. Do kultivační lahve bylo napipetováno 10 ml média a z 50ml falkony byl přenesen do kultivační lahve objem, který obsahoval požadované množství buněk.

### **4.2.2. Testování mykoplazmat**

Buněčné linie byly testovány na přítomnost mykoplazmat. Mykoplazmata jsou prokaryota mající na buněčné linie negativní vliv. V buněčných liniích může měnit míru syntézy nukleových kyselin a proteinů. Zasahuje do buněčného metabolismu, mění morfologii buňky a může způsobovat i chromozomální aberace. Mykoplazmata celkově způsobují degradaci a ztrátu buněčné linie. Experimenty s buněčnými liniemi napadenými mykoplazmaty produkují zkreslené výsledky (Drexler, 2002).

Testovány byly linie inkubované v bezantibiotikovém médiu. Testování bylo provedeno zároveň s pasážováním. U adherentních buněčných linií byla ze dna lahve za pomoci stěrky seškrabána plocha asi 2x2 cm. Médium se seškrábanými buňkami bylo přelito do 50ml falkony. Z falkony byl odebrán 1 ml do kyvety.

Kyveta byla přenesena do přístroje Vi-Cell. Poté byl obsah falkony zcentrifugován (2500 rpm, 20 °C, 5 minut). Obsah falkony byl vylit do odpadu a pelet buněk byl resuspendován v živném médiu. Z tohoto roztoku byl do 15ml falkony odebrán objem, který obsahoval  $0,25 \times 10^6$  buněk. 15ml falkona byla centrifugována (2500 rpm, 20 °C, 7 min). Supernatant byl vylit do odpadu a buněčný pelet byl resuspendován v 50  $\mu$ l lyzačního pufru. Celý objem byl přenesen do mikrozkuhavky. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 0,5  $\mu$ l proteinázy K. Mikrozkuhavka byla inkubována 24 hod při 37 °C a posledních 10 minut při 95 °C. Přítomnost mykoplazmat byla zjištěna polymerázovou řetězovou reakcí.

#### **4.2.3. Příprava buněčných linií**

Buněčné linie byly zpasážovány a byl zjištěn jejich počet v 1 ml buněčné suspenze pomocí přístroje Vi-Cell. Pro experiment bylo pro různé buněčné linie potřeba jiného počtu buněk, kvůli různým buněčným cyklům každé linie. Buněčné suspenze o různé koncentraci byly připraveny do 50ml falkony. Koncentrace pro všechny buněčné linie jsou zaznamenány v tabulce 3. Buněčné linie byly poté napipetovány do 384- jamkových destiček pomocí přístroje MultiDrop. Do 1. a 24. sloupce 384- jamkové destičky bylo napipetováno 30  $\mu$ l čistého média. Do sloupců 2–23 bylo napipetováno 30  $\mu$ l buněčné suspenze. Destičky byly vloženy do inkubátoru SteriStore, kde byly ponechány 24 hod při 37 °C, vlhkosti 95 %, obsahu 5 % CO<sub>2</sub> a 20% obsahu O<sub>2</sub>.

**Tab. 3:** Koncentrace buněk buněčných linií

Název linie	Počet buněk v 50 ml buněčné suspenze	Počet buněk v 1 ml [buněk/ml]	Počet buněk na jamku destičky [buněk/jamka] (30 µl)
MRC5	$3,5 \times 10^6$	$7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
BJ	$3,5 \times 10^6$	$7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
HCT116	$1,35 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$8 \times 10^2$
HCT116 p53-/-	$1,35 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$8 \times 10^2$
U2OS	$1,35 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$8 \times 10^2$
A549	$1,35 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$8 \times 10^2$
K562	$1,35 \times 10^6$	$2,7 \times 10^4$	$8 \times 10^2$
K562-TAX	$0,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$5 \times 10^2$
CCRF-CEM	$2 \times 10^6$	$4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$
CEM-DNR	$0,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$5 \times 10^2$

#### 4.2.4. Příprava látek pro test

##### 4.2.4.1. Primární testování

Látky byly skladovány v 96- jamkových panelech ve vialkách o koncentraci 10 mmol/l v DMSO při  $-20^\circ\text{C}$ . Pomocí pipetovací stanice Tecan bylo 11 µl každé látky přeneseno ze čtyř 96- jamkových destiček do jedné 384- jamkové zdrojové destičky. Takto připravená destička byla poté zapečetěna hliníkovou fólií při  $157^\circ\text{C}$  pomocí přístroje PlateLock a uložena v TundraStore při  $16^\circ\text{C}$  a 20% vlhkosti.

##### 4.2.4.2. Sekundární testování (dose-response, stanovení hodnoty $\text{IC}_{50}$ )

Látky, které měli procento inhibice nad 50 % při 50 µmol/l, byly vybrány do dose-response testování. Každá vybraná látka o koncentraci 10 mmol/l byla přenesena do nové 384- jamkové zdrojové destičky pomocí pipetovací stanice Tecan a naředěna na 2 další koncentrace - 1 mmol/l a 0,1 mmol/l. Do první jamky bylo napipetováno 11 µl a další jamky byly připraveny přenesením 1 µl z jamky předchozí a zředěny 10x. Takto připravená destička byla poté zapečetěna hliníkovou fólií při  $157^\circ\text{C}$  pomocí přístroje PlateLock a uložena v TundraStore při  $16^\circ\text{C}$  a 20% vlhkosti.



#### **4.2.5. Ovlivňování buněk**

V jednotlivých krocích byl pohyb destiček mezi jednotlivými přístroji zabezpečen robotickým ramenem, kontrolovaným softwarem Cellario (HRB).

##### **4.2.5.1. Primární testování**

Po 24 hod inkubaci bylo do 384- jamkové destičky přeneseno 150 nl každé látky ze zdrojové destičky pomocí přístroje Echo 550. Zdrojová destička byla před tím centrifugována (1000 rpm, 2 minuty, laboratorní teplota). Koncentrace látky v každé jamce destičky byla 50  $\mu\text{mol/l}$  a test byl prováděn v triplicátech. Byly provedeny dva biologické experimenty. Do každé destičky byly pipetovány pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontroly sloužily jamky s buňkami ovlivněné aktinomycinem D a mitomycinem C. Aktinomycin D byl uchováván při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a mitomycin C při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jako negativní kontrola byl použit DMSO. Po ovlivnění byly 384- jamkové destičky inkubovány v SteriStore při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosti, 5%  $\text{CO}_2$ , 20%  $\text{O}_2$  po 72 hodin.

##### **4.2.5.2. Sekundární testování (dose-response, stanovení hodnot $\text{IC}_{50}$ )**

Látky, které měly procento inhibice nad 50 % při 50  $\mu\text{mol/l}$ , byly vybrány do dose-response testování. Po 24 hod inkubaci byly do 384- jamkové destičky přeneseny látky ze zdrojové destičky pomocí přístroje Echo 550. Zdrojová destička byla před tím centrifugována (1000 rpm, 2 minuty, laboratorní teplota). Každá látka byla do 384- jamkové destičky pipetována v 7 koncentracích (tabulka 4) a v duplikátech. Byly provedeny tři biologické experimenty. Do destičky byly pipetovány pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontroly sloužily jamky s buňkami ovlivněné aktinomycinem D a mitomycinem C. Aktinomycin D byl uchováván při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a mitomycin C při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jako negativní kontrola byl použit DMSO. Po ovlivnění byly 384- jamkové destičky inkubovány v SteriStore při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95% vlhkosti, 5%  $\text{CO}_2$ , 20%  $\text{O}_2$  po 72 hodin.

**Tab. 4:** Objemy a výsledné koncentrace cytostatik pipetovaných ze zdrojové destičky do 384-jamkové destičky pomocí Echo 550

Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem	Výsledná koncentrace
10	150	50
10	37,5	12,5
10	10	3,125
1	22,5	0,781
1	5	0,195
0,1	15	0,048
0,1	5	0,012

#### 4.2.6. MTS test

Pracovní roztok MTS, skladován v mrazícím boxu při -18 °C, byl vložen do vodní lázně. K 100 ml roztoku MTS byl přidán 1 ml roztoku PMS. Do každé jamky 384-jamkových destiček, uchovávaných v SteriStore, byly napipetovány 4 µl roztoku MTS pomocí pipetovací stanice BioTek. Destičky byly uloženy zpět do SteriStore, kde byly inkubovány 2–4 hodiny. Čas inkubace se liší u různých buněčných linií. Po zabarvení byla změřena absorbance všech jamek při vlnové délce 490 nm pomocí EnVision Multimode Plate Reader a data byla analyzována pomocí programu Dotmatics. Po primárním testování bylo zjištěno procento inhibice každé látky a  $Z'$  faktor a po sekundárním testování byla zjištěna hodnota  $IC_{50}$  a  $Z'$  faktor.

#### 4.2.7. Analýza buněčného cyklu a měření relativní buněčné DNA

Buněčný cyklus byl stanoven pomocí průtokového cytometru. Jednotlivé fáze cyklu se liší obsahem DNA v jádře, který byl detekovatelný po obarvení buňky PI. Rozlišují se G0/G1 fáze, S fáze a G2/M fáze. Při této analýze byla stanovena subG<sub>0</sub> populace, která je spojena s apoptózou.

Do 6-jamkových destiček byly nasazeny buňky CCRF-CEM o koncentraci 250 000 buněk/ml ve 4 ml média. Ve třech opakováních byly buňky vystaveny cytostatikům o koncentraci  $IC_{50}$  nebo  $5xIC_{50}$  po dobu 24 hodin při 37 °C. Po 24 hodinové inkubaci byly buňky přeneseny do cytometrických zkumavek, zcentrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C), promyty 1xPBS, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a fixovány 2 ml 70% ledového ethanolu. Zkumavky byly poté uchovány v mrazícím boxu do dalšího dne při -20 °C.

Poté byly zkumavky centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota). Buňky byly promyty PBS, centrifugovány (500 g, 5 min) a resuspendovány v 1 ml citrátového pufru. Buňky byly centrifugovány (500 g, 5 min) a bylo přidáno 500  $\mu$ l PI 1. Buňky byly inkubovány ve vodní lázni 15 min při 37 °C ve tmě. Bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku ribonukleázy A a opět byly buňky inkubovány ve vodní lázni 15 min při 37 °C ve tmě. Vzorky byly uchovány 1 hodinu při 4 °C. Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (argonový laser, excitace při 488 nm) a softwaru CellQuest.

#### **4.2.8. Analýza DNA syntézy**

Princip analýzy syntézy DNA je založen na detekci DNA se zabudovaným 5-bromo-2'-deoxyuridinem (BrdU) uvnitř molekuly. BrdU je pyrimidinový analog, který v molekule DNA nahrazuje thymin. Množství BrdU, které odpovídá množství buněk v S-fázi buněčného cyklu, je vizualizováno pomocí fluorescenčně značené protilátky konjugované s BrdU.

Do 6- jamkových destiček byly nasazeny buňky CCRF-CEM o koncentraci 250 000 buněk/ml ve 4 ml média. Ve třech opakováních byly buňky vystaveny cytostatikům o koncentraci  $IC_{50}$  nebo  $5xIC_{50}$  po dobu 24 hodin při 37 °C. Do každé jamky bylo přidáno 40  $\mu$ l 1mmol/l BrdU a destičky byly inkubovány 30 min. Buňky byly z destiček přeneseny do cytometrických zkumavek, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) promyty 1x PBS, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a nakonec k nim bylo přidáno 2 ml 70% ledového ethanolu. Zkumavky byly uchovány při -20 °C do dalšího dne. Buňky byly centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota), resuspendovány 2 ml 2mol/l HCl/Triton X-100 a promíchány na míchačce. Zkumavky byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Po inkubaci byly zkumavky centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota), bylo k nim přidáno 2 ml roztoku Borax a znovu centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota). Zkumavky byly promyty PBS-T a centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota). Po odsátí PBS-T bylo k buňkám přidáno 200  $\mu$ l primární anti-BrdU protilátky a zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky promyty PBS/Tween20/BSA a centrifugovány (500 g, 5 min, pokojová teplota). Supernatant byl odsát a k buňkám bylo přidáno 200  $\mu$ l Anti-mouse-IgG-FITC. Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po promytí PBS/Tween20/BSA, centrifugaci (500 g, 5 min, pokojová teplota) a odsátí supernatantu, bylo k buňkám přidáno 100  $\mu$ l RNasy 1 a zkumavky byly inkubovány 15 min ve vodní lázni při 37 °C ve tmě. Pak bylo do zkumavek přidáno 400  $\mu$ l PI 1 a ponecháno dalších 15 min ve vodní lázni ve tmě.

Zkumavky byly uloženy do lednice na 30 min při 4 °C. Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (argonový laser, excitace při 488 nm) a softwaru CellQuest.

#### **4.2.9. Analýza RNA syntézy**

Princip analýzy syntézy RNA je založen na detekci RNA se zabudovaným nukleotidem bromouridin (BrU) uvnitř molekuly. Množství BrU, které odpovídá množství RNA, je vizualizováno imunochemicky pomocí fluorescenčně značených anti-BrU protilátek.

Do 6- jamkových destiček byly nasazeny buňky CCRF-CEM o koncentraci 250 000 buněk/ml ve 4 ml média. Ve třech opakováních byly buňky vystaveny cytostatikům o koncentraci  $IC_{50}$  nebo  $5xIC_{50}$  po dobu 24 hodin při 37 °C. Do každé jamky bylo přidáno 40  $\mu$ l 100mmol/l BrU a destičky byly inkubovány 30 min. Buňky byly z destiček přeneseny do cytometrických zkumavek, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C), promyty 1x PBS, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a byly k nim přidány 2 ml PBS s 1% formaldehydem a 0,05% NP-40. Takto připravené buňky byly uchovány při 4 °C do dalšího dne. Následovala centrifugace (500 g, 5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu byly zkumavky promyty 0,5 ml 1xPBS + 1% glycin, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl znovu odsát. K buňkám bylo přidáno 100  $\mu$ l primární Anti-mouse BrdU protilátky a zkumavky byly inkubovány 45 min při laboratorní teplotě. Pak bylo přidáno 0,5 ml 1x PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40 a zkumavky byly centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl odsát a k buňkám bylo přidáno 100  $\mu$ l sekundární Anti-mouse IgG FITC protilátky a zkumavky se inkubovaly při laboratorní teplotě ve tmě po 30 min. Bylo přidáno 0,5 ml 1x PBS + 0,1% BSA + 0,1% NP-40 a zkumavky byly centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C).

Po odsátí supernatantu byl pelet fixován 1 ml 1x PBS + 1% formaldehyd + 0,05% NP-40. Zkumavky byly inkubovány 1 hodinu při 4 °C a poté centrifugovány (500g, 5 min, 4 °C). Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován 0,5 ml 1x PBS + 1% glycin. Zkumavky byly centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl odsát. K buňkám bylo přidáno 100  $\mu$ l RNasy 2 a zkumavky byly inkubovány 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Do zkumavek bylo přidáno 600  $\mu$ l PI 2 a zkumavky byly inkubovány 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (argonový laser, excitace při 488 nm) a softwaru CellQuest.

#### **4.2.10. Detekce fosforylace histonu H3**

Fosforylace histonu H3 se detekuje pomocí průtokového cytometru. Ten zachycuje fluorescenční signál vysílaný vysoce specifickými protilátkami navázanými na serinu 10 H3 histonu. Míra fosforylace histonu ukazuje, kolik buněk vstupuje do M fáze buněčného cyklu.

Do 6- jamkových destiček byly nasazeny buňky CCRF-CEM o koncentraci 250 000 buněk/ml ve 4 ml média. Ve třech opakováních byly buňky vystaveny cytostatikům o koncentraci  $IC_{50}$  nebo  $5xIC_{50}$  po dobu 24 hodin při 37 °C. Buňky byly z destiček přeneseny do cytometrických zkumavek, centrifugovány (500 g, 5 min, 4 °C) a promyty 1x PBS. Po odsátí supernatantu byly buňky fixovány 1 ml 70% ledového ethanolu. Zkumavky byly inkubovány 1 hodinu na ledu. Poté byly zkumavky promyty 1x PBS + 1% FbS, centrifugovány (500 g, 5 min, laboratorní teplota) a supernatant byl odsát. Do zkumavek byl přidán 1 ml vychlazeného PBS + 0,25% Triton X-100. Zkumavky byly inkubovány 15 min na ledu. Po promytí 2 ml PBS + 1% FbS, centrifugaci (500 g, 5 min, laboratorní teplota) a odsátí supernatantu bylo přidáno 100  $\mu$ l primární Anti-phospho-Histone protilátky. Zkumavky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po promytí 2 ml PBS + 1% FbS, centrifugaci (500 g, 5 min, laboratorní teplota) a odsátí supernatantu bylo přidáno 100  $\mu$ l sekundární Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG protilátky. Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po promytí 2 ml PBS + 1% FbS, centrifugaci (500 g, 5 min, laboratorní teplota) a odsátí supernatantu bylo přidáno 600  $\mu$ l PI 3 s RNasy 3. Zkumavky byly inkubovány 30 min ve tmě při 37 °C. Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru FACS Calibur (argonový laser, excitace při 488 nm) a softwaru CellQuest.

## 5. Výsledky

### 5.1. Primární testování

Při prvním testování bylo všech 10 buněčných linií ovlivněno 268 látkami při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  po 72 hodin. Pro každou látku byla vypočítána hodnota procenta inhibice (%I) pomocí programu Dotmatics. Příklad takového vyhodnocení je na obrázku 2. Látka byla vyhodnocena jako aktivní, pokud po MTS testu měla alespoň u jedné buněčné linie %I nad 50. Pokud bylo %I látky u všech buněčných linií menší než 50, látka byla označena jako neaktivní. Hodnoty %I jsou průměrem 6 měření. Celkové rozdělení látek na aktivní a neaktivní je zaznamenáno v tabulce 5.

**Obr. 2:** Příklad zpracování výsledků z primárního testování vyhodnocené v programu Dotmatics pro 11 látek u buněčné linie CEM-DNR.

plate	well	sample id	PI	pass	conc	inc	✓	✗
1 (Plate 1)	B3	LEM00011240	60.027	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	B4	LEM00011240	57.545	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	B5	LEM00011240	52.963	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C3	LEM00011244	100.12	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	C4	LEM00011244	100.12	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	C5	LEM00011244	100.69	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D3	LEM00011245	91.908	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	D4	LEM00011245	91.527	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	D5	LEM00011245	90.572	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E3	LEM00011246	23.182	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	E4	LEM00011246	35.972	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	E5	LEM00011246	35.4	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F3	LEM00011247	30.818	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	F4	LEM00011247	43.8	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	F5	LEM00011247	46.472	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G3	LEM00011248	92.29	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	G4	LEM00011248	92.863	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	G5	LEM00011248	90.381	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H3	LEM00011249	91.336	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	H4	LEM00011249	91.145	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	H5	LEM00011249	91.908	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I3	LEM00011250	97.063	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	I4	LEM00011250	96.681	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	I5	LEM00011250	100.12	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J3	LEM00011251	100.31	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	J4	LEM00011251	100.5	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	J5	LEM00011251	100.88	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K3	LEM00011252	101.26	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	K4	LEM00011252	101.26	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	K5	LEM00011252	100.88	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L3	LEM00011253	9.8181	●	50.0uM	+	✓	✗
1 (Plate 1)	L4	LEM00011253	-1.4454	●	50.0uM	+		
1 (Plate 1)	L5	LEM00011253	21.845	●	50.0uM	+		

Distribuce aktivních a neaktivních látek pro jednotlivé buněčné linie je zaznamenána v tabulce 5. Nejvíce látek bylo vyhodnoceno jako aktivní u linií CCRF-CEM a CEM-DNR, nejméně pak u A549, BJ a MRC-5.

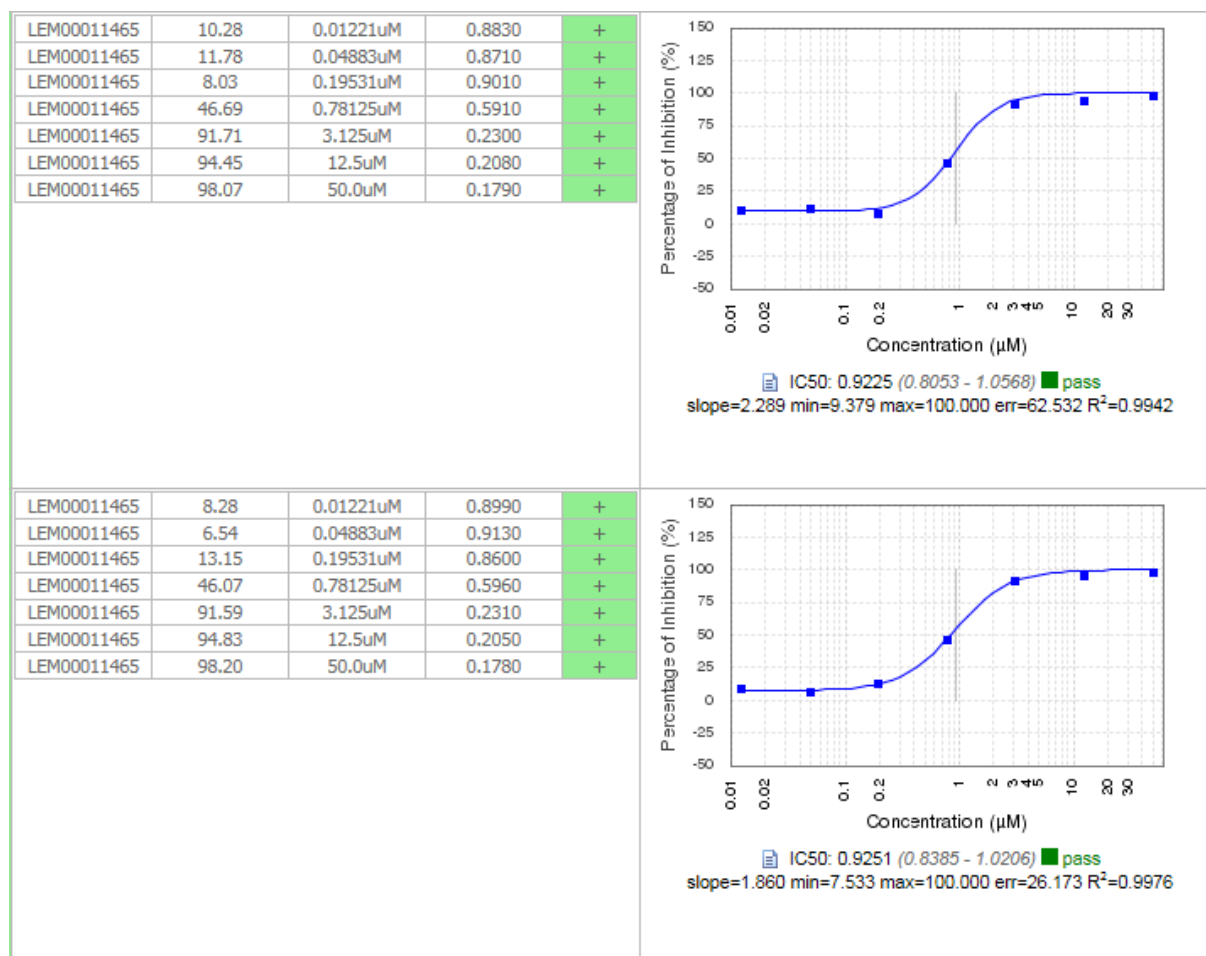
**Tab. 5:** Počet aktivních a neaktivních látek u všech testovaných buněčných linií při primárním testování.

Buněčné linie	Aktivní	Neaktivní
A549	64	204
BJ	52	216
CCRF-CEM	149	119
CEM-DNR	130	138
HCT116	103	165
HCT116p53-/-	105	163
K562	122	146
K562-TAX	121	147
MRC-5	64	204
U2OS	92	176
<b>Aktivita všech testovaných látek</b>	<b>170</b>	<b>98</b>

## 5.2. Sekundární testování

V sekundárním testování byla měřena hodnota  $IC_{50}$  pro každou buněčnou linii u aktivních látek z primárního testování. Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  byly průměrem 6 měření. Obrázek 3 je příkladem vyhodnocení sekundárního testování. Podle hodnot  $IC_{50}$  u každé buněčné linie byly látky rozděleny do 4 skupin-  $<1 \mu\text{mol/l}$  (velmi aktivní),  $1-10 \mu\text{mol/l}$  (aktivní),  $10-50 \mu\text{mol/l}$  (látky se slabou cytotoxickou aktivitou) a  $>50 \mu\text{mol/l}$  (neaktivní). Do skupiny neaktivních látek byly zařazeny i látky, které vyšly v primárním testování jako neaktivní. Výsledky jsou uvedené v tabulce 6 a obrázku 4.

**Obr. 3:** Příklad zpracování výsledků sekundárního testování vyhodnocené v programu Dotmatics pro látku LEM 11 465 u buněčné linie CCRF-CEM.

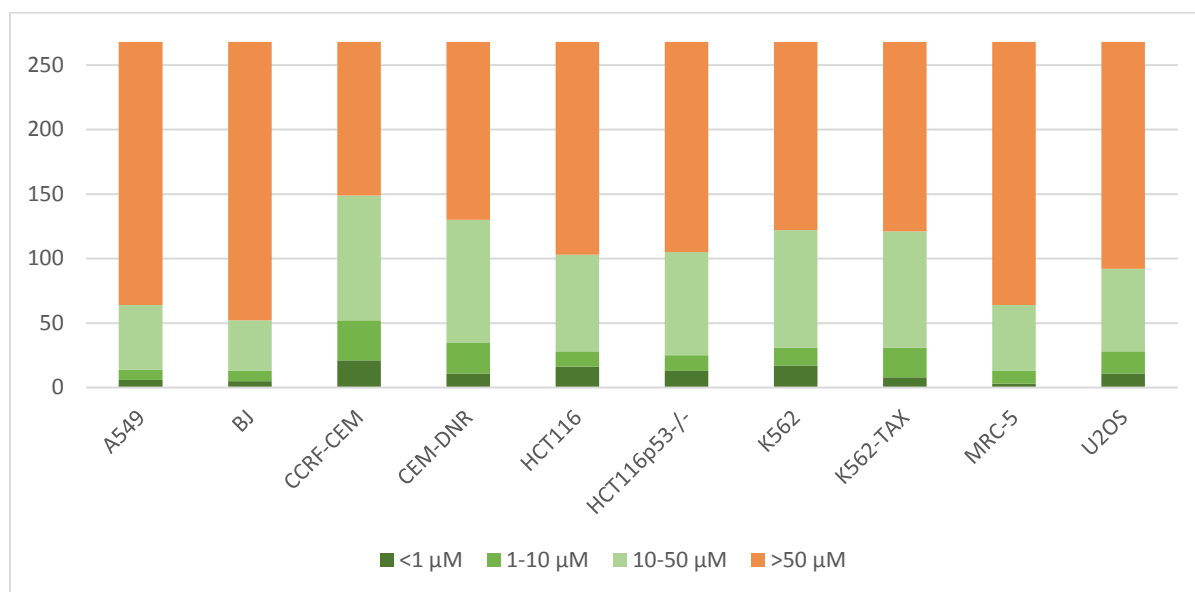


**Tab. 6:** Rozdělení látek podle IC<sub>50</sub> pro každou testovanou buněčnou linii do 4 skupin.

Buněčné linie	IC <sub>50</sub>			
	<1 µmol/l	1-10 µmol/l	10-50 µmol/l	>50 µmol/l
A549	6	8	50	204
BJ	5	8	39	216
CCRF-CEM	21	31	97	119
CEM-DNR	11	24	95	138
HCT116	16	12	75	165
HCT116p53-/-	13	12	80	163
K562	17	14	91	146
K562-TAX	8	23	90	147
MRC-5	3	10	51	204
U2OS	11	17	64	176



**Obr. 4:** Znárodnění počtu látek podle hodnot  $IC_{50}$  u testovaných buněčných linií



Suspenní linie CCRF-CEM byla nejcitlivější k působení látek. Více než polovina látek se u ní ukázala jako aktivní. Všechny látky, které mají  $IC_{50}$  pod 10  $\mu$ mol/l pro tuto linii postupují do dalšího testování, tj. analýza buněčného cyklu. V mém případě to je 52 látek, tj. 19 % z 268 látek, viz tabulka 6. Ze skupiny 52 aktivních látek byly v mém případě vybrány 3 látky (LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473) s různou chemickou strukturou na analýzu buněčného cyklu. Hodnoty  $IC_{50}$  pro všechny buněčné linie u těchto látek jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tab. 7:** Hodnoty  $IC_{50}$  3 látek pro všechny testované buněčné linie získané pomocí MTS testu vybrané pro další analýzy.

Buněčné linie	$IC_{50}$ [ $\mu$ mol/l]		
	LEM 11 372	LEM 11 465	LEM 11 473
A549	30,61	1,76	0,72
BJ	29,04	3,41	>50
CCRF-CEM	<b>4,58</b>	<b>0,7</b>	<b>0,09</b>
CEM-DNR	>50	2,25	0,08
HCT116	23,96	0,5	0,15
HCT116p53-/-	22,15	0,47	0,51
K562	27,56	0,88	0,03
K562-TAX	>50	3,59	0,1
MRC-5	27,8	>50	0,36
U2OS	24,65	0,61	>50

### 5.3. Analýza buněčného cyklu

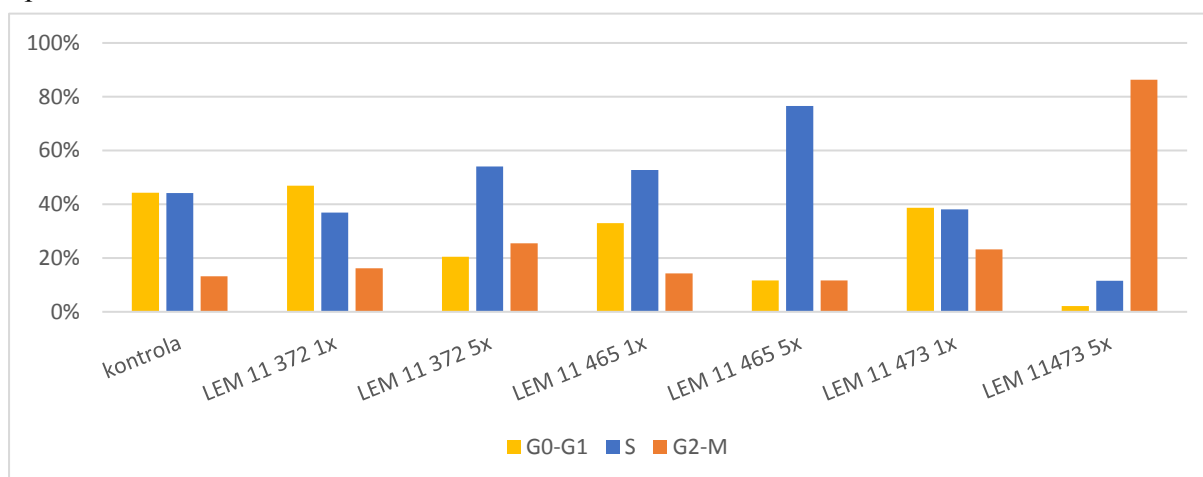
Analýza buněčného cyklu byla provedena se 3 látkami: LEM 11 372, LEM 11 465 a LEM 11 473 na buněčné linii CCRF-CEM. Buněčná linie byla těmito látkami ovlivňována 24 hodin v koncentracích 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub> (později jen jako 1x a 5x). Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a výsledky jsou reprezentativním vzorkem jednoho opakování (obrázek 6), hodnoty jsou vyobrazené v tabulce 8 a obrázku 5.

V porovnání s kontrolou došlo ke snížení počtu buněk v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi u látek LEM 11 372 (5x), LEM 11 465 (1x i 5x) a LEM 11 473 (5x). Zvýšení počtu buněk v S fázi došlo u látek LEM 372 (5x) a LEM 11 465 (1x i 5x). Ke snížení počtu buněk v S fázi došlo u látek LEM 11 372 (1x) a LEM 11 473 (1x i 5x). Nárůst počtu buněk v G<sub>2</sub>/M fázi byl zaznamenán u látek LEM 11 372 (5x) a LEM 11 473 (1x i 5x).

**Tab. 8:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

Látky	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> [%]	S [%]	G <sub>2</sub> /M [%]
Kontrola	44,28 ± 3,53	44,21 ± 1,43	13,18 ± 0,89
LEM 11 372 1x	46,91 ± 1,71	36,89 ± 1,48	16,20 ± 2,12
LEM 11 372 5x	20,45 ± 5,11	54,09 ± 4,99	25,45 ± 1,32
LEM 11 465 1x	32,97 ± 0,61	52,77 ± 1,56	14,27 ± 0,94
LEM 11 465 5x	11,71 ± 2,27	76,61 ± 2,81	11,67 ± 0,77
LEM 11 473 1x	38,65 ± 1,55	38,10 ± 1,82	23,25 ± 3,21
LEM 11 473 5x	2,20 ± 0,40	11,53 ± 8,18	86,27 ± 7,78

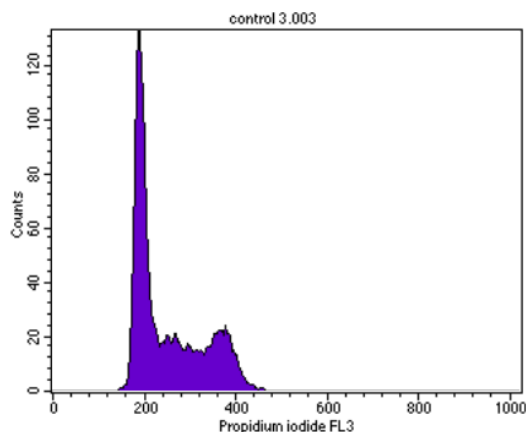
**Obr. 5:** Změny v počtu buněk linie CCRF-CEM v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub> v porovnání s kontrolou. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.



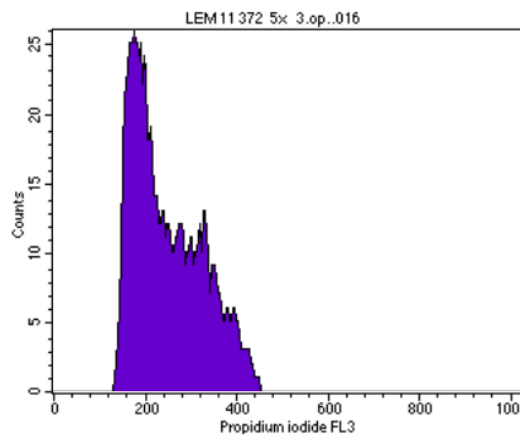
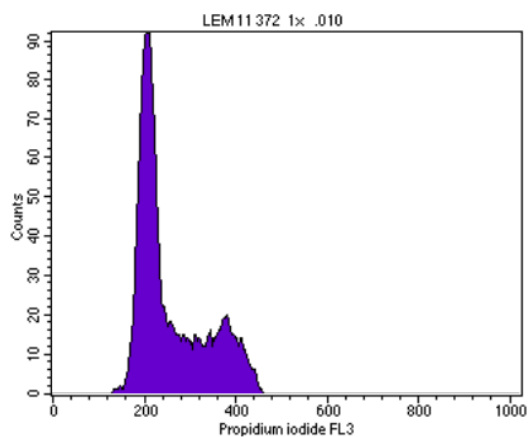
**Obr. 6:** Histogramy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM v různých fázích buněčného cyklu po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>.

a)

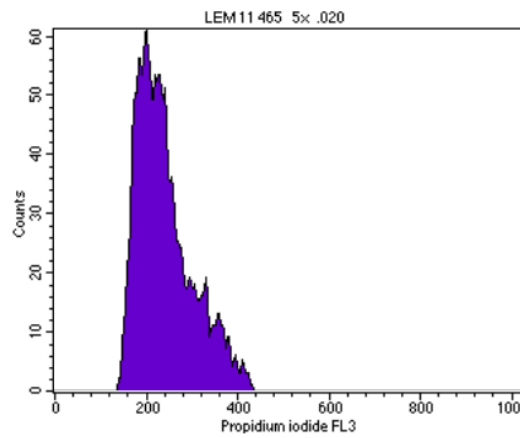
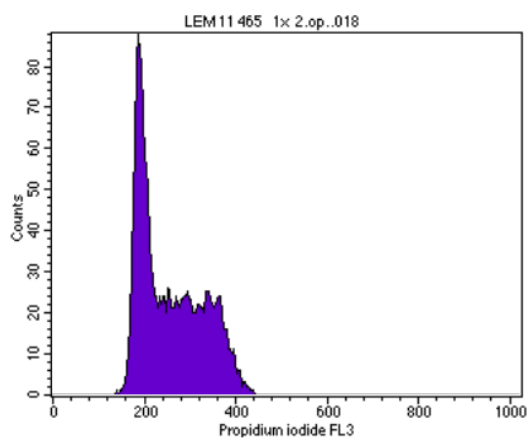
- a) Kontrola
- b) LEM 11 372 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- c) LEM 11 465 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- d) LEM 11 473 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)



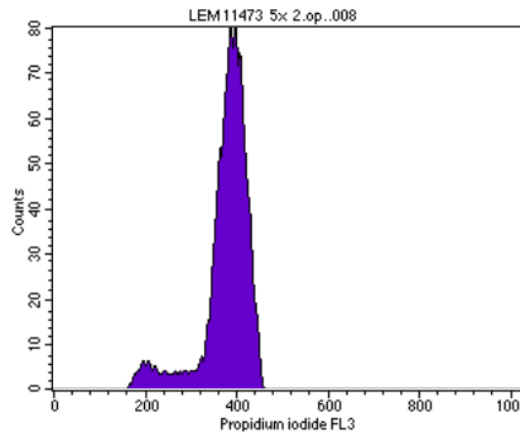
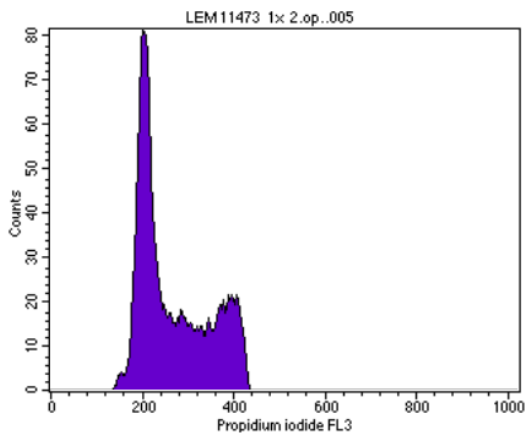
b)



c)



d)



## 5.4. Analýza apoptózy

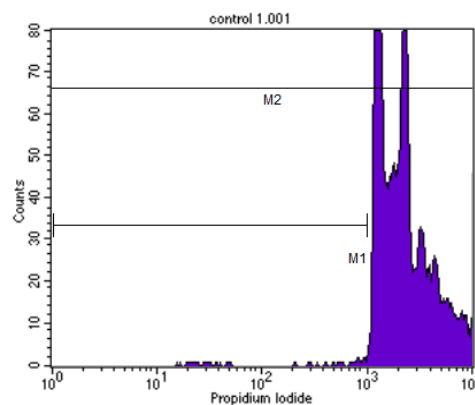
U buněk byla také analyzována subG<sub>1</sub> populace po 24 hodinovém působení stejných látek, jako u analýzy buněčného cyklu. V porovnání s kontrolou narostl počet buněk v subG<sub>1</sub> populaci u látek LEM 11 372 (5x) a LEM 11 473 (5x). Po ovlivnění ostatními látkami buňky nevykazovaly výrazný nárůst subG<sub>1</sub> populace. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a obrázek 7 je reprezentativním vzorkem jednoho opakování. Hodnoty jsou uvedené v tabulce 9.

**Tab. 9:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM v subG<sub>1</sub> po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

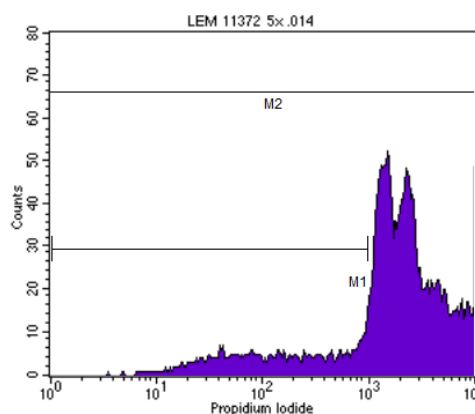
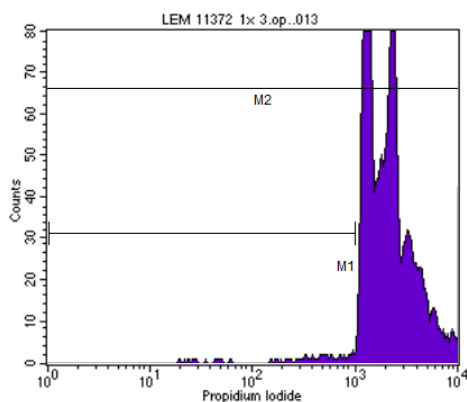
Látky	subG <sub>1</sub> [%]	± SD
<b>Kontrola</b>	1,92	0,14
<b>LEM 11 372 1x</b>	3,92	0,69
<b>LEM 11 372 5x</b>	24,09	1,33
<b>LEM 11 465 1x</b>	2,75	0,39
<b>LEM 11 465 5x</b>	4,60	1,06
<b>LEM 11 473 1x</b>	4,75	0,18
<b>LEM 11 473 5x</b>	12,64	0,56

**Obr. 7:** Histogramy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM v subG<sub>1</sub> po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>.

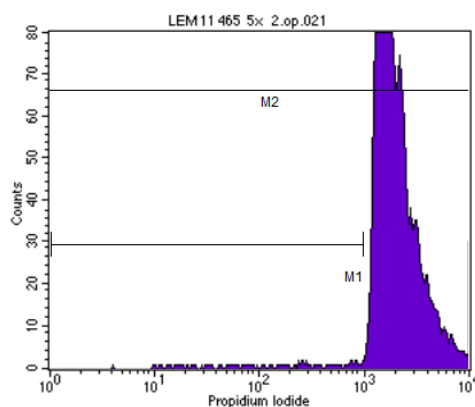
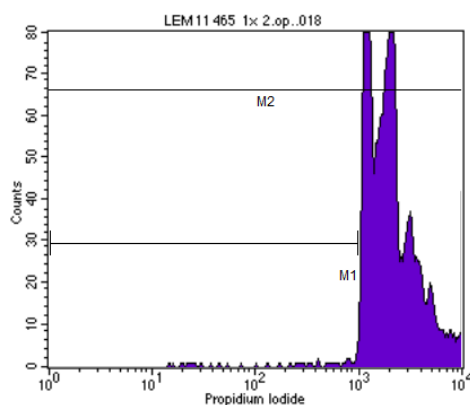
- a) Kontrola  
 b) LEM 11 372 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)  
 c) LEM 11 465 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)  
 d) LEM 11 473 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)



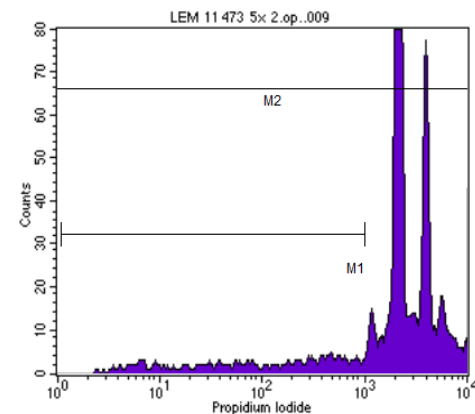
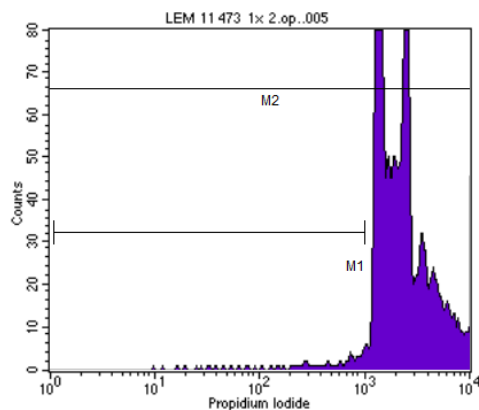
b)



c)



d)



## 5.5. Analýza syntézy DNA

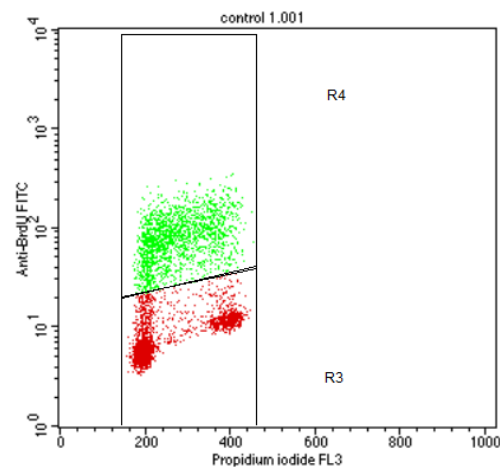
V porovnání s kontrolou byl zaznamenaný výrazný pokles intenzity DNA syntézy ve vzorcích ovlivněných koncentrací 5x IC<sub>50</sub> látek LEM 11 372 a LEM 11 473. U ostatních látek se buňky výrazně nelišily od kontroly. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a obrázek 8 je reprezentativním vzorkem jednoho opakování. Hodnoty jsou uvedené v tabulce 10.

**Tab. 10:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM syntetizujících DNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

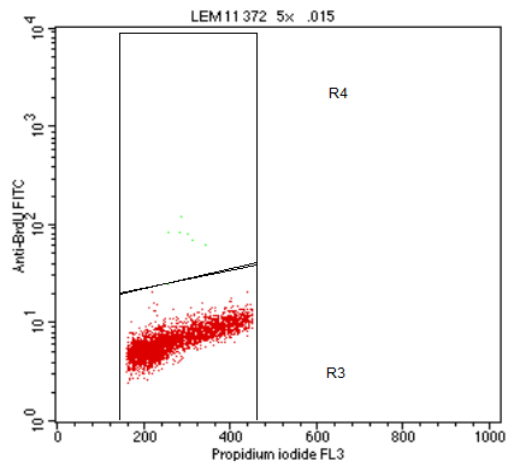
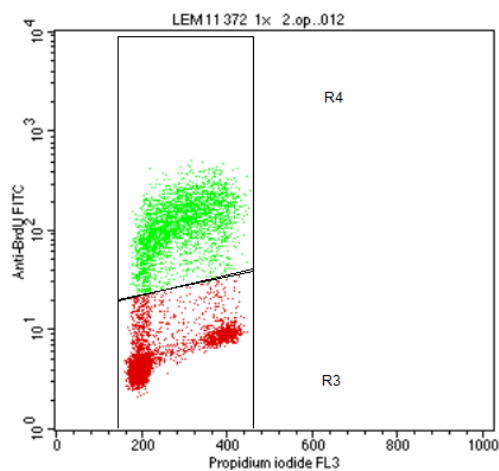
Látky	Syntéza DNA [%]	± SD
<b>Kontrola</b>	38,24	4,64
<b>LEM 11 372 1x</b>	40,79	0,88
<b>LEM 11 372 5x</b>	0,21	0,02
<b>LEM 11 465 1x</b>	41,45	6,69
<b>LEM 11 465 5x</b>	39,49	8,45
<b>LEM 11 473 1x</b>	32,50	8,95
<b>LEM 11 473 5x</b>	6,30	0,41

**Obr. 8:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM syntetizující DNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>.

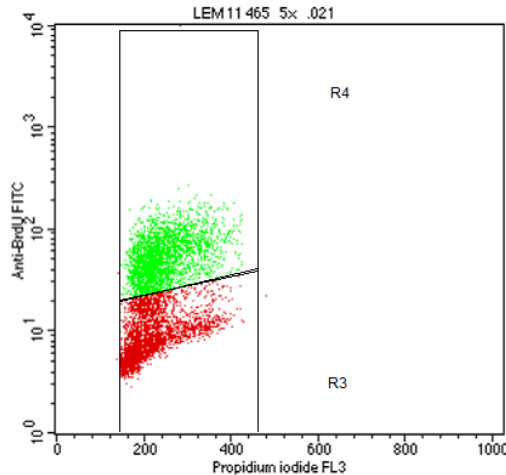
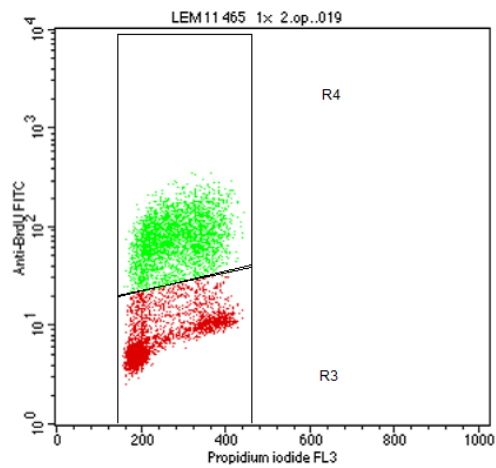
- a) Kontrola
- b) LEM 11 372 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- c) LEM 11 465 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- d) LEM 11 473 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)



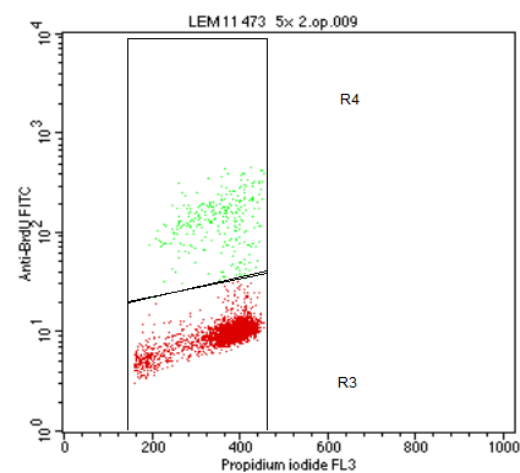
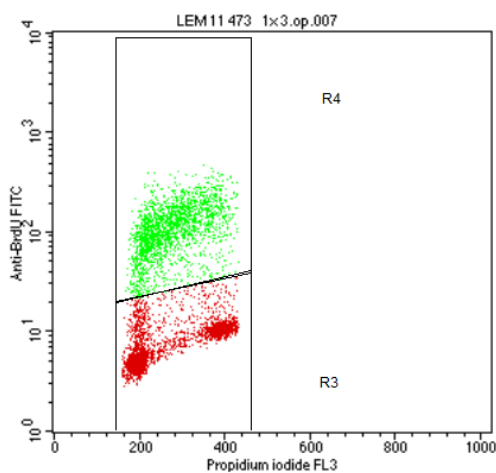
b)



c)



d)



## 5.6. Analýza syntézy RNA

V porovnání s kontrolou počet buněk schopných syntetizovat RNA klesl po 24 hodinovém ovlivnění látkou LEM 11 372 (5x), LEM 11 465 (1x i 5x) a LEM 473 (5x). U látek LEM 11 372 (1x) a LEM 11 473 (1x) došlo ke zvýšení počtu buněk syntetizujících RNA. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a obrázek 9 je reprezentativním vzorkem jednoho opakování. Hodnoty jsou uvedené v tabulce 11.

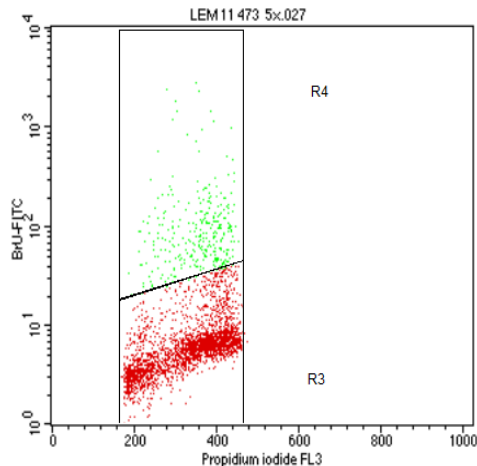
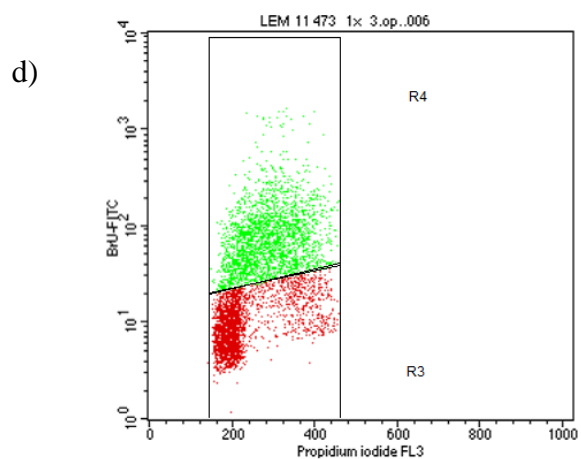
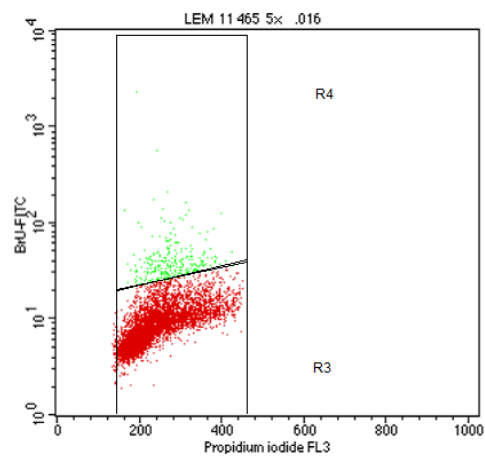
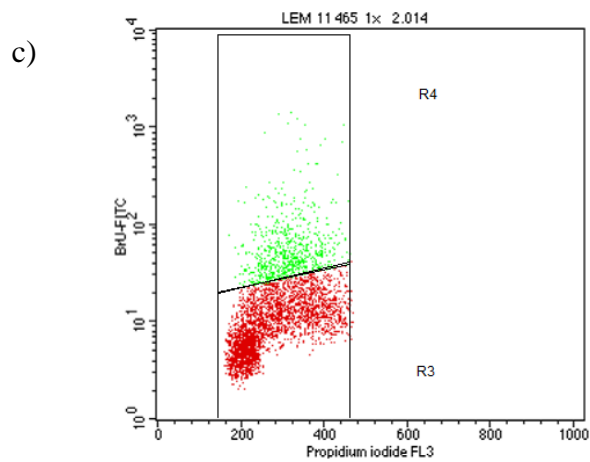
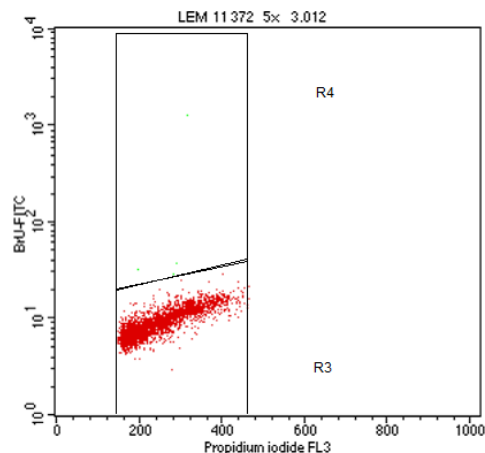
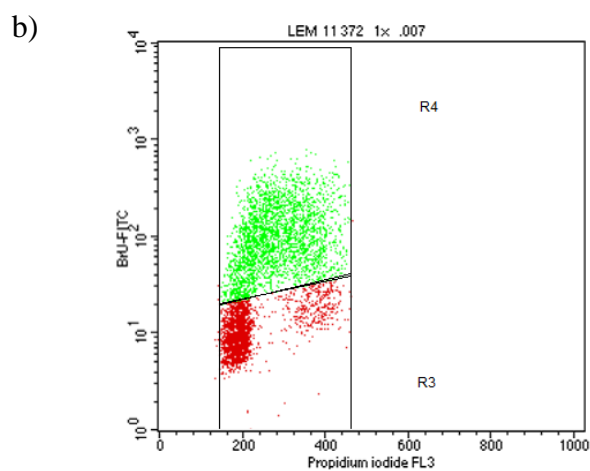
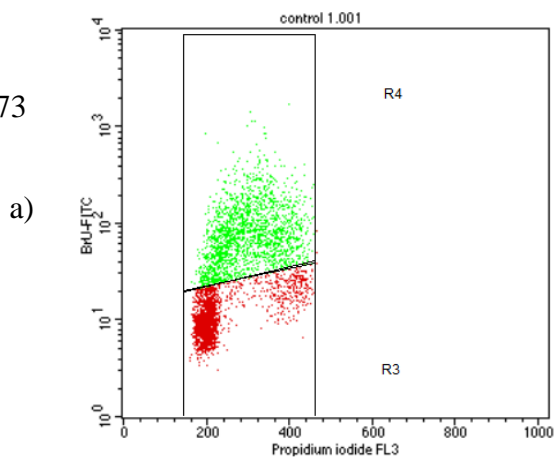
**Tab. 11:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM syntetizujících RNA působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

Látky	Syntéza RNA [%]	± SD
<b>Kontrola</b>	38,24	4,64
<b>LEM 11 372 1x</b>	55,97	4,55
<b>LEM 11 372 5x</b>	0,22	0,07
<b>LEM 11 465 1x</b>	16,43	2,07
<b>LEM 11 465 5x</b>	5,80	2,67
<b>LEM 11 473 1x</b>	45,33	4,83
<b>LEM 11 473 5x</b>	11,19	0,49



**Obr. 9:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM syntetizující RNA po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>.

- a) Kontrola
- b) LEM 11 372 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- c) LEM 11 465 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- d) LEM 11 473 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)



## 5.7. Analýza fosforylace histonu H3

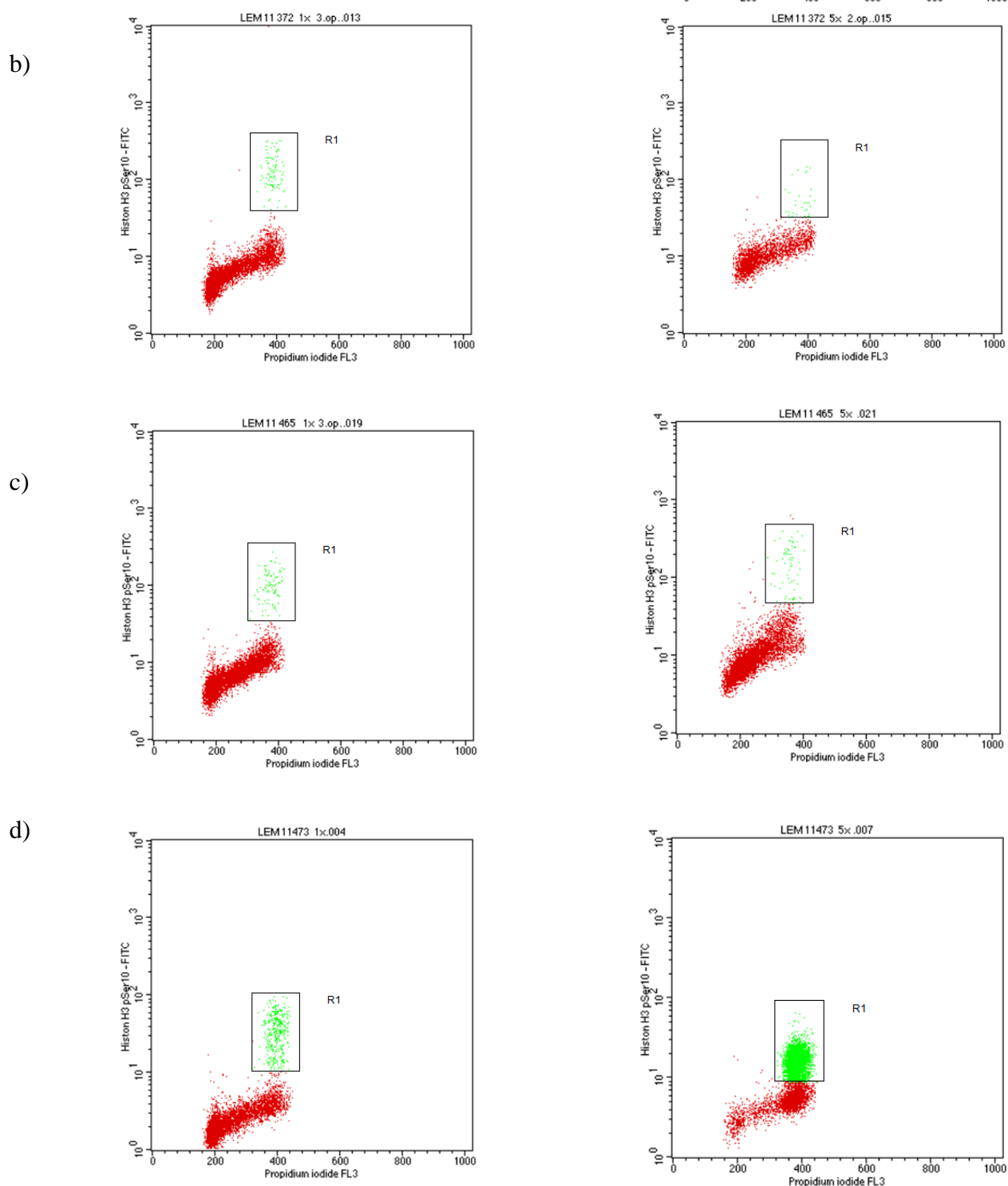
V porovnání s kontrolou byla zaznamenána zvýšená hladina fosforylovaného histonu H3 na Ser10 jen u látky LEM 473. V koncentraci 1x došlo k mírnému zvýšení a při koncentraci 5x došlo k velkému zvýšení. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a obrázek 10 je reprezentativním vzorkem jednoho opakování. Hodnoty jsou uvedené v tabulce 12.

**Tab. 12:** Procentuální zastoupení buněk linie CCRF-CEM, u kterých byla detekována fosforylace histonu H3<sup>Ser10</sup> po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>. Zaznamenané hodnoty jsou průměrem hodnot ze tří nezávislých opakování.

Látky	pH3 <sup>Ser10</sup> [%]	± SD
<b>Kontrola</b>	1,45	0,19
<b>LEM 11 372 1x</b>	1,23	0,18
<b>LEM 11 372 5x</b>	1,28	0,05
<b>LEM 11 465 1x</b>	1,37	0,05
<b>LEM 11 465 5x</b>	1,11	0,14
<b>LEM 11 473 1x</b>	6,10	0,19
<b>LEM 11 473 5x</b>	53,14	4,27

**Obr. 10:** Bodové grafy ukazující počty buněk linie CCRF-CEM pozitivně Anti-H3<sup>pSer10</sup> – FITC značených po 24 hodinovém působení látek LEM 11 372, LEM 11 465, LEM 11 473 v koncentraci 1x IC<sub>50</sub> a 5x IC<sub>50</sub>.

- a) Kontrola
- b) LEM 11 372 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- c) LEM 11 465 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)
- d) LEM 11 473 IC<sub>50</sub> (vlevo), 5x IC<sub>50</sub> (vpravo)



## 6. Diskuze

Ve farmaceutickém výzkumu představuje HTS první fázi vývoje nových léčiv. Je to proces testování velkého počtu chemikálií proti různým buněčným cílům. Všeobecně testy cytotoxicity nepřinášejí informace o mechanismu účinku látky, ale spíše nám pomáhají tříditi látky, které na cíle v buňce mají nějaký vliv (Fox et al., 2006). Takové látky pokračují do dalších testů, které přesně určí mechanismus účinku látky v buňce a poté mohou být použity jako kandidáti v klinickém výzkumu (Frearson et Collie, 2009).

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat cytotoxické účinky nově syntetizovaných látek u 10 nádorových i nenádorových linií ve formátu HTS.

Při primárním testování byly buňky ovlivněny látkou pouze při jedné koncentraci. Na základě zjištěného procenta inhibice (PI) byly látky rozděleny do dvou skupin: aktivní a neaktivní. Z celkového počtu 268 testovaných látek bylo vyselektováno 170 aktivních látek, pro které se v sekundárním testování stanovila hodnota  $IC_{50}$ .

Z hodnot  $IC_{50}$  byly znatelné různé trendy. Některé buněčné linie byly vůči látkám citlivější než ostatní. Nejvíce látek s nízkými hodnotami  $IC_{50}$  se objevilo u suspenzní linie CCRF-CEM, izolované od pacienta s lymfoblastickou leukémií, a u jejího klonu, rezistentního na daunorubicin, semiadherentní linie CEM-DNR. Nejméně takových látek bylo pak u nenádorových linií BJ (fibroblast lidské předkožky), MRC-5 (fibroblast plicní tkáně) (Xia et al., 2008) a překvapivě i u nádorové linie A549 odvozené od karcinomu plic.

Na základě hodnot  $IC_{50}$  získaných ze sekundárního testování se určují látky (hity), které postupují na další analýzy. Z testovaných 268 látek bylo 149 látek u CCRF-CEM vyhodnoceno jako aktivní. 52 látek mělo hodnotu  $IC_{50}$  nižší než  $10 \mu\text{mol/l}$ . U těchto látek se dělá analýza buněčného cyklu. Jako příklad byly z této skupiny vybrány 3 látky s různou chemickou strukturou: LEM 11 372, LEM 11 465 a LEM 11 473. U linie CCRF-CEM jsem sledoval účinek těchto látek na buněčný cyklus, syntézu DNA a RNA a fosforylaci histonu H3.

Látka LEM 11 372 měla u většiny testovaných linií pouze mírný cytotoxický účinek, v rezistentních liniích se dokonce projevovala jako neúčinná. V buňkách CCRF-CEM indukovala apoptózu. Pozorovali jsme mírné zvýšení populace buněk v S fázi a současně výraznou inhibici DNA a RNA syntézy.

Cytotoxické testy odhalily silný cytotoxický účinek látky LEM 11 465. Na základě struktury látky (jde o nukleosidový analog) a výsledků analýzy buněčného cyklu (výrazná akumulace buněk v S fázi a redukce RNA syntézy), můžeme tuto látku efektem přirovnat k Actinomycinu D, který se váže na DNA a inhibuje transkripci a syntézu DNA (Hurwitz, 1962).

Látka LEM 11 473 měla silné cytotoxické účinky u nádorových linií při porovnání s nenádorovými. Analýza buněčného cyklu odhalila mírné zvýšení počtu buněk v apoptóze, velké zvýšení počtu buněk v G2 fázi a také zvýšený počet buněk s fosforylovaným histonem H3. Podobně ovlivňují buněčný cyklus mitotické inhibitory jako paclitaxel, kolchicin nebo vinkristin (Horwitz, 1994).

Tyto výsledky ukazují, že různé látky působí na buňky odlišně. Díky nim můžeme říct, že látky LEM 11 372, LEM 11 465 a LEM 11 473 ovlivňují buňky linie CCRF-CEM změnami v buněčném cyklu, spuštěním apoptózy nebo zásahy do syntézy nukleových kyselin.

Po identifikaci aktivních látek se tyto látky dostávají do další fáze objevování léčiv. Důležité pro zjištění biologické aktivity látky je studium vztahu struktury a účinku. Tyto vztahy objevují spojitost mezi biologickou aktivitou látky a její třidimenzionální strukturou. Zkoumání vztahů struktury a účinku zahrnuje syntézu různých variant aktivní látky. K látce jsou přidávány nebo odebírány funkční skupiny, což vede ke změnám účinku dané látky a tím se lépe identifikují důležité funkční skupiny. Změny ve funkčních skupinách mohou posílit afinitu k receptoru nebo také redukovat vedlejší nežádoucí efekty látky. Tyto poznatky jsou využívány pro zlepšení vlastností daného léčiva.

## 7. Závěr

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo otestovat nově syntetizované látky pomocí vysokokapacitního skríningu a vyselektovat látky s budoucím potenciálem v léčbě nádorových onemocnění. V primárním testování bylo otestováno 268 látek, z čehož 170 látek bylo aktivních. V sekundárním testování byla u těchto aktivních látek stanovena hodnota  $IC_{50}$  pro každou z deseti použitých buněčných linií. Hodnoty  $IC_{50}$  ukázaly, že některé buněčné linie jsou citlivější než jiné. Nejcitlivější vůči testovaným látkám byly nádorové linie CCRF-CEM a CEM-DNR. Nejméně citlivé byly nenádorové linie BJ a MRC-5 a nádorová linie A549.

Na základě hodnot  $IC_{50}$  byly vybrány 3 látky, se kterými byl otestován buněčný cyklus na linii CCRF-CEM. Všechny tři látky měly na buňky odlišný účinek. Látka LEM 11 372 indukovala apoptózu, látka LEM 11 465 blokovala transkripci a látka LEM 11 473 nedovolovala buňkám dokončit mitózu. Přesný mechanismus jejich působení by odhalilo až další testování.

## 8. Literatura

Alt, K. (1909). Behandlungsversuche mit Arsenophenylglyzin bei Paralytikern. Muenchener Medizinische Wochenschrift, 56, 1457-9.

An, W. F., & Tolliday, N. (2010): Cell-based assays for high-throughput screening. *Molecular biotechnology*, 45(2), 180-186.

Benedek, T. G. (1978). The 'Tuskegee Study' of syphilis: analysis of moral versus methodologic aspects. *Journal of Chronic Diseases*, 31(1), 35-50.

Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., & Kricka, L. J. (1994): Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry*, 219(2), 169-181.

Carnero, Amancio (2006): High throughput screening in drug discovery. *Clinical and Translational Oncology*, 8.7, 482-490.

Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75-90.

Du, Y. (2015): Fluorescence Polarization Assay to Quantify Protein-Protein Interactions in an HTS Format. *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, 529-544.

Duetz, W. A. (2007): Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation. *TRENDS in Microbiology*, 15(10).

Dunn, D. A., & Feygin, I. (2000): Challenges and solutions to ultra-high-throughput screening assay miniaturization: submicroliter fluid handling. *Drug discovery today*, 5, S84-S91.

Ehrlich, P., & Bertheim, A. (1912). Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 45(1), 756-766.

Frearson, J. A., & Collie, I. T. (2009): HTS and hit finding in academia—from chemical genomics to drug discovery. *Drug discovery today*, 14(23), 1150-1158.

Fichna, J., Gach, K., Piestrzeniewicz, M., Burgeon, E., Poels, J., Broeck, J. V., & Janecka, A. (2006): Functional characterization of opioid receptor ligands by aequorin luminescence-based calcium assay. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1150-1154.

Fox, S., Farr-Jones, S., Sopchak, L., Boggs, A., Nicely, H. W., Khoury, R., & Biro, M. (2006). High-throughput screening: update on practices and success. *Journal of biomolecular screening*, 11(7), 864-869.

Griebe, T., Schaule, G., & Wuertz, S. (1997): Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(2), 118-122.

Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazzet-Jones D. P., Allis, C. D. (1997): Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348-360.

Hertzberg, R. P., & Pope, A. J. (2000): High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current opinion in chemical biology*, 4(4), 445-451.

- Hoelder, S., Clarke, P. A., & Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Molecular oncology*, 6(2), 155-176.
- Hong, J., & Edel, J. B. (2009): Micro-and nanofluidic systems for high-throughput biological screening. *Drug discovery today*, 14(3), 134-146.
- Horwitz, S. B. (1993). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*, 5, S3-6.
- Hurwitz, J., Furth, J. J., Malamy, M., & Alexander, M. (1962). The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis, III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(7), 1222-1230.
- Inglese, J., Auld D. S., Jadhav A., Johnson R. L., Simeonov A., Yasgar A., Zheng W., Austin Ch. P. (2006): Quantitative high-throughput screening: a titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103.31, 11473-11478.
- International HapMap Consortium (2005): A haplotype map of the human genome. *Nature* 437.7063 1299-1320.
- Kensy, F., Zimmermann, H. F., Knabben, I., Anderlei, T., Trauthwein, H., Dingerdissen, U., & Büchs, J. (2005): Oxygen transfer phenomena in 48- well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *Biotechnology and bioengineering*, 89(6), 698-708.
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J., & Roth, B. L. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of cell science*, 116(24), 4867-4869.
- Kunapuli, P., Ransom, R., Murphy, K. L., Pettibone, D., Kerby, J., Grimwood, S., Zuck P., Hodder P, Lacson R, Hoffman I, Inglese J., Strulovici B. (2003): Development of an intact cell reporter gene  $\beta$ -lactamase assay for G protein-coupled receptors for high-throughput screening. *Analytical biochemistry*, 314(1), 16-29.
- Koltay, P., & Zengerle, R. (2007): Non-contact nanoliter & picoliter liquid dispensing. In *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2007. TRANSDUCERS 2007. International* (pp. 165-170). IEEE.
- Macarron, Ricardo (2006): Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug discovery today* 11.7, 277-279.
- Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*, 2, 143–148. Alberts, Alfred W. (1988): Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American journal of cardiology*, 62.15, J10-J15.
- Mayr, Lorenz M., and Dejan Bojanic (2009): Novel trends in high-throughput screening. *Current opinion in pharmacology* 9.5, 580-588.
- Michael, S., Auld, D., Klumpp, C., Jadhav, A., Zheng, W., Thorne, N., Christopher P., Inglese J. & Simeonov, A. (2008): A robotic platform for quantitative high-throughput screening. *Assay and drug development technologies*, 6(5), 637-657.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.



- Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2009): In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr Chem Genomics*, 3(33), e41.
- Nunez, R. (2001): DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current issues in molecular biology*, 3, 67-70.
- Oldenburg, K. R., Zhang, J. H., Chen, T., Maffia III, A., Blom, K. F., Combs, A. P., & Chung, T. D. (1998): Assay miniaturization for ultra-high throughput screening of combinatorial and discrete compound libraries: a 9600-well (0.2 microliter) assay system. *Journal of Biomolecular Screening*, 3(1), 55-62.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L., & Storts, D. (2013): *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., & Glasebrook, A. L. (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods*, 142(2), 257-265.
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008): A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2415-2420.
- Shun, Tong Ying, John S. Lazo, Elizabeth R. Sharlow a Paul A. Johnston (2011): Identifying Actives from HTS Data Sets. *Journal of Biomolecular Screening*. 16(1), 1-14
- Silvestri, L. S., Taraporewala, Z. F., & Patton, J. T. (2004): Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of virology*, 78(14), 7763-7774.
- Smith, A. (2002): Screening for drug discovery: the leading question. *Nature*, 418(6896), 453-459.
- Spencer, R. W. (1998): High-throughput screening of historic collections: Observations on file size, biological targets, and file diversity. *Biotechnology and bioengineering*, 61(1), 61-67.
- Sundberg, S. A. (2000): High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution-and cell-based approaches. *Current opinion in biotechnology*, 11(1), 47-53.
- Szymański, P., Markowicz, M., & Mikiciuk-Olasik, E. (2011): Adaptation of high-throughput screening in drug discovery—toxicological screening tests. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 427-452.
- Webb, A. A., McAinsh, M. R., Taylor, J. E., & Hetherington, A. M. (1996): Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants.
- Weber, M., Ferrer, M., Zheng, W., Inglese, J., Strulovici, B., & Kunapuli, P. (2004): A 1536-well cAMP assay for Gs-and Gi-coupled receptors using enzyme fragmentation complementation. *Assay and drug development technologies*, 2(1), 39-49.
- White, David JG (1982): *Cyclosporin A: Proceedings of an International Conference on Cyclosporin A*, Cambridge, September 1981. North Holland.
- Wölcke, Julian, and Dirk Ullmann (2001): Miniaturized HTS technologies—uHTS. *Drug discovery today* 6.12, 637-646.

Xia, M., Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M. H., Jadhav A., Smith C. S., Inglese J., Portier Ch. J., Austin Ch. P. & Tice, R. R. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental health perspectives*, 116(3), 284.

Zang, R., Li, D., Tang, I. C., Wang, J., & Yang, S. T. (2012): Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1(1), 31-51.

Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999): A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of biomolecular screening*, 4(2), 67-73.