

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Nové pyrazolopyrimidinové inhibitory
polymerace tubulinu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval:

Tomáš Maděrka

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lucie Rárová, Ph.D

Studijní program:

B1501 Experimentální biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl moc poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Lucii Rárová, Ph.D za odborné rady, cenné připomínky, poskytnuté materiály a trpělivost. Mé dík patří i Mgr. Ivě Dolečkové za odborné vedení a přátelský přístup při vypracovávání praktické části této bakalářské práce. Dále děkuji všem členům kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi byli vždy ochotni poradit. Jmenovitě pak především doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. a Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. V neposlední řadě chci poděkovat svým rodičům, přátelům a své partnerce za podporu a lásku v každodenním životě.

OBSAH

OBSAH	4
Bibliografické informace	6
Bibliografical information	7
Cíle práce	8
Teoretická část	9
1. Nádorová onemocnění	10
2. Nádorová chemoterapie	10
3. Nádorová cytostatika a purinové inhibitory CDK	11
4. Myoseverin	12
4.1. Deriváty myoseverinu	13
5. Buněčný cyklus	15
5.1. Fáze buněčného cyklu	16
5.2. Kontrolní body a regulační systém buněčného cyklu	17
6. Cytoskelet	18
6.1. Proteinová vlákna cytoskeletu	18
6.1.1. Mikrotubuly	19
6.1.1.1. Dynamická nestabilita mikrotubulů	19
6.1.1.2. Mikrotubuly a mitotické dělicí vřeténko	20
6.1.1.3. Mikrotubulární inhibitory	21
7. Programovaná buněčná smrt	22
7.1. Metody detekce apoptózy	23
7.1.1. Caspázy a caspáza 3	24
8. Histony a histon H3	25
9. Průtoková cytometrie	26
10. Imunofluorescenční značení	26
Praktická část	27
11. Materiál a přístroje	28
11.1. Chemikálie a protilátky	28
11.2. Roztoky	29
11.2.1. Roztoky pro kultivaci buněk	29
11.2.2. Roztoky pro měření rozpustnosti testovaných látek	29
11.2.3. Roztoky pro analýzu buněčného cyklu	29
11.2.4. Roztoky pro detekci aktivního fragmentu caspázy 3	30
11.2.5. Roztoky pro imunofluorescenční značení tubulinu	30
11.2.6. Roztoky pro imunofluorescenční značení fosfohistonu H3	30

11.3. Přístrojové vybavení	31
11.4. Biologický materiál	31
12. Metody	31
12.1. Stanovení životaschopnosti buněk	31
12.2. Měření rozpustnosti testovaných látek	31
12.3. Kultivace buněk	32
12.4. Nasazení a kultivace buněk pro vybrané experimenty	32
12.5. Ovlivnění buněk testovanými látkami pro vybrané experimenty	32
12.6. Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií	32
12.7. Detekce aktivního fragmentu caspázy 3 průtokovou cytometrií	33
12.8. Imunofluorescenční značení α -tubulinu	33
12.9. Imunofluorescenční značení fosfohistonu H3 (Ser10)	34
13. Výsledky	34
13.1. Rozpustnost testovaných látek	34
13.2. Vliv testovaných látek na buněčný cyklus	35
13.3. Detekce aktivního fragmentu caspázy 3	37
13.4. Vliv testovaných látek na mikrotubulární systém	38
13.5. Imunofluorescenční značení fosfohistonu H3 (Ser10)	42
14. Diskuze	44
15. Závěr	46
16. Seznam použitých zkratk	47
17. Seznam použité literatury	48

Bibliografické informace:

Jméno a příjmení autora: Tomáš Maděrka
Název práce: Nové pyrazolopyrimidinové inhibitory polymerace tubulinu.
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D
Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: S přibývajícím počtem smrtelných případů nádorových onemocnění probíhá intenzivní výzkum a hledání nových potencionálních terapeutických cílů a léčiv. Nedávno byla z knihovny 2,6,9-trisubstituovaných purinů identifikována látka myoseverin. Myoseverin inhibuje mikrotubulární systém buňky *in vitro*, interferuje s normálním mitotickým vřeténkem, blokuje buněčný cyklus v mitóze a způsobuje buněčnou apoptózu. Teoretická část této bakalářské práce shrnuje dosavadní poznatky o myoseverinu a zabývá se obecnými procesy v nádorové buňce. Experimentální část se zabývá stanovením biologických účinků čtyř nových derivatů myoseverinu na adherentní buněčnou linii HeLa odvozenou od karcinomu prsu. Jedná se o různé synteticky připravené pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny. Analýza těchto derivatů byla provedena pomocí metod průtokové cytometrie a imunofluorescenční mikroskopie.

Klíčová slova: Myoseverin, pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny, buněčný cyklus, cytoskelet, mikrotubuly, apoptóza, caspáza 3, fosfohiston H3
Počet stran: 55
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographic information:

Autor's name: Tomáš Maděrka
Title: New pyrazolopyrimidine inhibitors of tubuline polymerization.
Type of thesis: Bachelor
Department: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacky University
Supervisor: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D
The year of presentation: 2013

Abstract: With the increasing number of fatal cases of cancer, a research and intensive search for new potential therapeutic targets and drugs is carrying out. Recently, a substance called myoseverin has been identified from the library of 2,6,9-trisubstituted purines. Myoseverin inhibits cell microtubule assembly *in vitro*, interferes with normal mitotic spindle, arrests the cell cycle in mitosis and causes cell apoptosis. The theoretical part of this bachelor thesis summarizes the current knowledge about myoseverin and deals with common processes in tumor cell. The experimental part of bachelor thesis focuses on biological effects of two new derivatives of myoseverin in adherent HeLa cell line derived from breast cancer. These derivates are various synthetically prepared pyrazolo[4,3-d]pyrimidine. Analysis of these derivatives was performed by using flow cytometry and fluorescence microscopy.

Keywords: Myoseverin, pyrazolo[4,3-d]pirimidine, cell cycle, cytoskeleton, microtubules, apoptosis, caspase 3, phospho-histone H3
Number of pages: 55
Number of appendices: 0
Language: Czech

Cíle práce:

- Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
- Seznámit se a prakticky zvládnout analýzu buněčného cyklu na průtokovém cytometru a imunofluorescenční značení vybraných buněčných struktur.
- Testovat účinek nově připravených derivátů myoseverinu na vybrané linie nádorových buněk, komentovat získané výsledky.

Teoretická část

1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou skupinou chorob, které charakterizuje vznik nádorů v lidském organismu. Tyto nádory jsou z počátku pro lidské tělo neškodné. Pokud ale nejsou včas diagnostikovány, léčeny, popřípadě úplně odstraněny, mohou dále růst a metastázovat do dalších tkání těla. V těchto fázích je léčba rakoviny daleko složitější a v mnoha případech neúspěšná.

Vznik rakoviny je definován jako ztráta kontroly proliferace některé populace tělu vlastních buněk. Tyto buňky se začnou nekontrolovatelně dělit a vytvářet nádor. Za normálních podmínek má buňka celou řadu obranných mechanismů (jak bude popsáno v kapitole 5.2. Kontrolní body a regulační systém buněčného cyklu), které tomuto nekontrolovatelnému dělení zabraňují. Pro vznik nádoru je tedy důležitá souhra celé řady vnitřních a vnějších faktorů, které vedou k poškození těchto obranných mechanismů.

Rakovina je jedním z nečastějších onemocnění na světě, které často končí smrtí pacienta. Z tohoto důvodu se velká část světové vědecké společnosti intenzivně zabývá výzkumem tohoto onemocnění a nalezením účinného léku s menšími negativními účinky na organismus. Problémem nádorových onemocnění je jejich vysoká variabilita. Existuje celá řada typů nádorových onemocnění (od retinoblastomu oka až po rakovinu děložního čípku). Mechanismus vzniku jednotlivých typů nádorů je od sebe značně odlišný a proto nelze vytvořit univerzální léčivo, které by bylo účinné na všechny typy rakovin. Zpravidla se musí při hledání nových léčiv přistupovat ke každému typu rakoviny individuálně. Dalším problémem je stejně jako u antibiotik vznik lékové rezistence (Klener et al., 2002). Příkladem může být různá specifita látek cílených na polymeraci tubulinu na různé izotopy β -tubulinu (Kavallaris, 2010).

2. Nádorová chemoterapie

Chemoterapií je označována léčba pacienta s nádorovým onemocněním pomocí cytostatik. Cytostatika jsou látky toxické pro buňku. Při léčbě nádorů se vychází z předpokladu, že tyto látky jsou pro nádorové buňky toxicitější než pro buňky normální. Například principem účinků některých cytostatik je jejich vysoká toxicita pro buňky ve fázi mitózy. Protože se nádorové buňky intenzivně dělí, jsou na tyto cytostatika daleko citlivější než většina ostatních buněk v těle. Výjimku tvoří rychle se dělící tkáně (krevní buňky, pohlavní buňky a buňky střevního epitelu), na která mohou mít cytostatika nežádoucí vedlejší efekt. Tento efekt je většinou reverzibilní a při léčbě se s ním

počítá. Léčba cytostatiky bývá velmi často kombinována s dalšími terapeutickými přístupy - jako je radioterapie nebo chirurgická léčba (Petružálek et Konopásek, 2003).

3. Nádorová cytostatika a purinové inhibitory CDK

V současnosti existuje celá řada cytostatik využívajících se při léčbě různých typů nádorů. Dělí se podle mechanismu účinku a podle způsobu jejich objevení. První cytostatika byla objevena spíše náhodou jako biologicky aktivní látky produktů mikroorganismů, bakterií a rostlin. Jejich mechanismus účinku byl často objasněn až řadu let po jejich objevení. Mezi takto objevená cytostatika patří cytostatická antibiotika a řada rostlinných alkaloidů. Cytostatická antibiotika jsou produkty metabolismu bakterií. Vážou se na molekulu DNA a tím zabraňují replikaci DNA před rozdělením na dvě dceřiné buňky. Vazbou na DNA také znemožňují transkripci genetické informace (Pazdur et. al, 2008). Do této skupiny spadají látky jako daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, epirubicin a bleomycin (Silvestriny et al., 1963; Umenzawa, 1965; Arcamone et al., 1969; Arcamone et al., 1976; Bonfante et al., 1980). Rostlinné alkaloidy poškozují cytosklet a využívají se jako inhibitory polymerace mikrotubulů zabraňujících správné tvorbě mitotického dělicího vřeténka (viz. kapitola 6.1.1.3. Mikrotubulární inhibitory). V klinické praxi se používají alkaloidy z barvínku růžového (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) vinblastin, vincristin, z tisu (*Taxus sp. L.*) paclitaxel, docetaxel a z ocúnu (*Colchicum sp. L.*) kolchicin, jehož použití je značně limitováno z důvodu vysoké cytotoxicity na normální buňky (častěji se tedy používá demekolcin) (Brues et al., 1936; Frei et al., 1961; Costa et al., 1962; Wani et al., 1971; Extra et al., 1991). Dalšími používanými látkami jsou inhibitory topoizomeráz (např. topotecan, etoposid) (Kirchner et al., 1984; Underberg et al., 1990). Topoizomerázy jsou enzymy důležité při replikaci DNA. Uplatňují se při rozmotávání vlákna DNA. Při inhibici topoizomerázy I a topoizomerázy II je mechanismus „rozplétání“ vlákna DNA blokován. Replikace je znemožněna a DNA se rozpadá (Champoux et al., 2001). K nejdéle používaným cytostatikům patří tzv. alkylační cytostatika, která se vážou na molekulu DNA. Mechanismus jejich účinku spočívá v přenosu alkylové skupiny na molekulu DNA. Tyto změny vedou k nemožnosti se buňce rozdělit (Teicher et al., 1981). Do této skupiny látek patří cyklofosamid, melfalan, chlorambucil a řada dalších (Gellhorn et al., 1956; Papac et al., 1958; Cramblett, 1959).

S objevením cyklin-dependetních kináz (CDK) (Nurse et al., 1981; Lee et al., 1987) a jejich nepostradatelné funkce při regulaci buněčného cyklu (viz. kapitola 5.2. Kontrolní body a regulační systém buněčného cyklu) začalo intenzivní hledání látek,

kteře by mohly sloužit jako jejich inhibitory (Veselý et al., 1994; Senderowicz, 1999; Kryštof et Uldrijan, 2010). Jako první látky se selektivním účinkem na inhibici CDK byly objeveny purinové sloučeniny, které ve vazebném místě CDK kompetují s molekulou ATP a tím snižují jejich aktivitu nebo je zcela inhibují (Veselý et al., 1994; De Azevedo et al., 1997; Fisher et al., 2003). Prvními takto objevenými látkami byly inhibitory dimethylaminopurin a isopentenyladenin. Jejich účinnost a specifita však nebyla dostatečně velká (Senderowicz et Sausville, 2000). Dalším výzkumem a testováním se ukázalo, že silnými inhibitory jsou především puriny substituované v pozicích C2-, C6- a N9-. K prvním objeveným látkám tohoto typu patří 6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methyl-purin, triviálně nazvaný olomoucín, u kterého byl popsán inhibiční efekt na CDK1 a CDK2 (Veselý et al., 1994). Další chemickou studií a postupnou modifikací olomoucínu byl připraven 6-(benzylamino)-2-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropyl-purin, triviálně nazvaný roskovitín, který vykazoval oproti olomoucínu přibližně 20x vyšší účinnost na CDK1 a 2 (Havlíček et al., 1997).

Chemické sloučeniny odvozené od purinů nevykazují pouze inhibiční efekt na CDK, ale mohou také například inhibovat polymeraci tubulinu mikrotubulárních vláken a tím inhibovat tvorbu mitotického vřeténka (Legraverend et Grierson, 2006). Tyto nové látky jsou hledány především pomocí chemických knihoven (v tomto případě v knihovně C2-, C6-, N9- trisubstituovaných purinů). Jednou z látek, která splňuje výše popsané vlastnosti, je látka nazývaná se myoseverin.

4. Myoseverin

Myoseverin (9-isopropyl-N2,N6-bis-(4-methoxybenzyl)-9H-purin-2,6-diamin) je trisubstituovaný purin, který byl objeven screeningem knihovny trisubstituovaných purinů především za účelem objevení nových molekul, které by mohly u buněk vyvolávat diferenciaci do specifických buněčných typů, anebo naopak molekul, které by diferenciaci mohly zvrátit nebo vyvolat regenerativní procesy. Bylo zjištěno, že aplikace myoseverinu k myším C2C12 svalovým buňkám způsobuje reverzibilní štěpení mnohjaderných myotubů na jednojaderné fragmenty. Odstranění myoseverinu a přenesení buněk do čerstvého média umožňuje novou syntézu DNA, novou proliferaci buněk a tím i regeneraci svalové tkáně. Biochemické analýzy ukázaly, že myoseverin sám o sobě nemůže zvrátit diferenciací proces. Místo toho ovlivňuje expresi různých růstových faktorů, imunomodulátorů, proteinů uplatňujících se při extracelulární

přestavbě matrix a genů stresových reakcí souvisejících s aktivací drah zapojených do hojení ran a regenerace tkání (Rosania et al., 2000).

Mechanismus účinku myoseverinu byl odhalen až barvením cytoskeletu buněk. Barvení aktinu neodhalilo jasný rozdíl v prostorovém uspořádání mikrofilament, avšak barvení vláken mikrotubulů ukázalo, že myoseverin způsobuje rozklad dlouhých vláken mikrotubulů na krátké kulovité útvary. Další experimenty ukázaly, že se molekula myoseverinu přímo váže na molekulu tubulinu. Přesný mechanismus destabilizace sítě mikrotubulových vláken není znám, ale s největší pravděpodobností souvisí se strukturou myoseverinu. Pro aktivaci depolymerizace mikrotubulů i demontáž myotubů je nezbytná přítomnost methoxy skupin v para pozici obou benzylových kruhů. Zatímco metylace na pozici N6 aktivitu ruší, některé substituce na pozici N9 jsou při polymerizaci mikrotubulů aktivní (isopropyl (myoseverin) > ethyl > methyl) (Rosania et al., 2000).

Myoseverin neinhibuje aktivitu CDK1, což naznačuje odlišný mechanismus účinku od ostatních bioaktivních 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Chang et al., 1999).

Jelikož hrají mikrotubulová vlákna klíčovou roli v celé řadě buněčných procesů a jedním z nich je i buněčné dělení (jak je popsáno v kapitole 6.1.1.2. Mikrotubuly a mitotické dělicí vřeténko), lze objevený účinek myoseverinu na mikrotubulový aparát buňky potenciálně využít při léčbě nádorových onemocnění. Další výhodou myoseverinu je jeho nízká toxicita k normálním nenádorovým buňkám. Tyto ukazatele vedly k celé řadě dalších studií účinku myoseverinu na různé linie nádorových buněk. Bylo zjištěno, že myoseverin blokuje buněčný cyklus na přechodu fází G₂/M. Podrobnější výzkum prokázal, že destabilizace mikrotubulových vláken vede k tvorbě chybně vytvořených často multipolárních dělicích vřetének. Takto deformovaná dělicí vřeténka jsou rozpoznána kontrolním bodem zodpovědným za správné sestavení vřeténka, buněčný cyklus je zastaven a buňka je následně iniciována k provedení apoptózy (Chang et al., 2001).

4.1. Deriváty myoseverinu

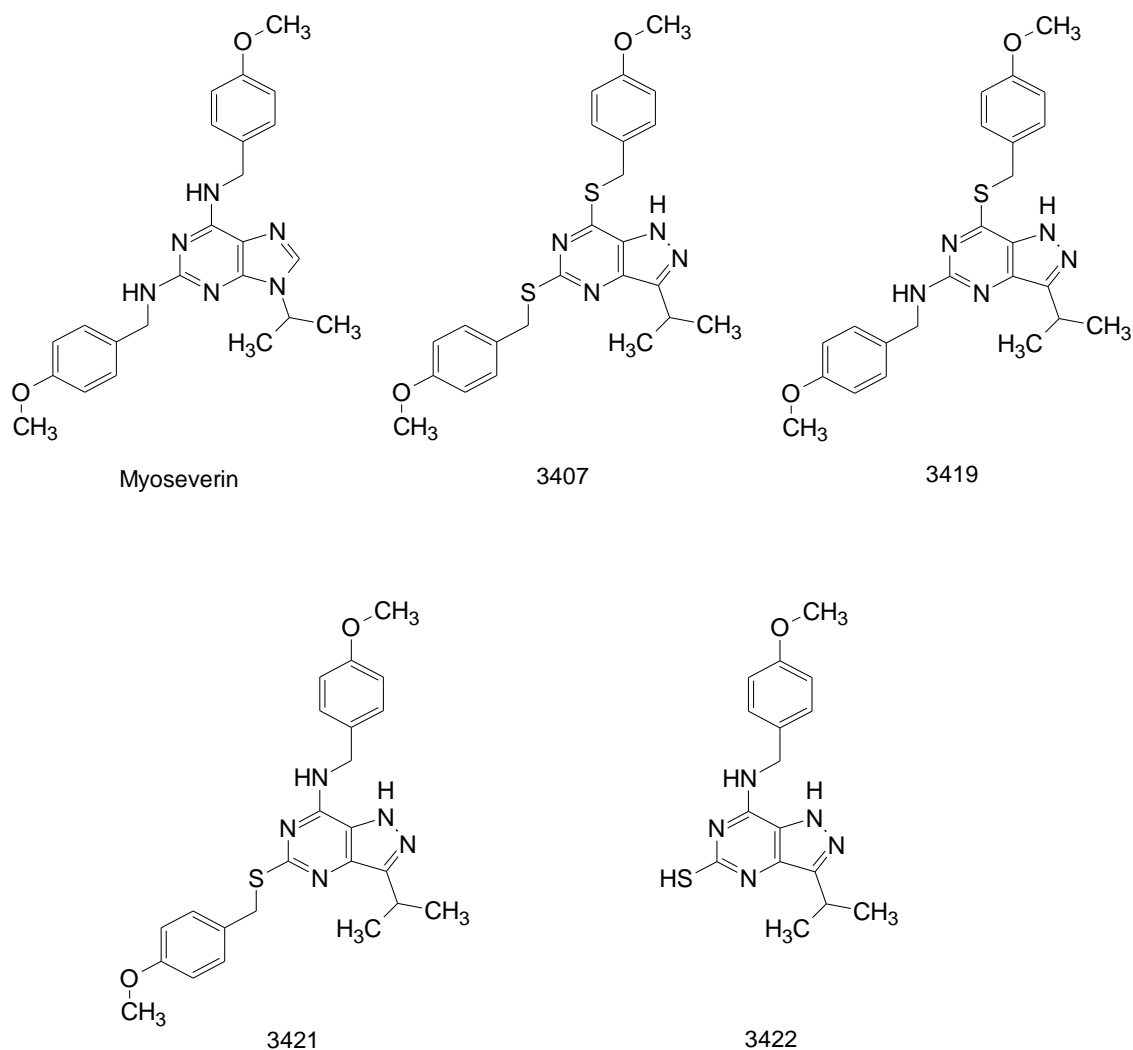
V současné době je velký význam kladen na hledání nových derivátů biologicky aktivních látek. Látky aktivní v základních testech totiž obvykle nemají dokonalé biologické vlastnosti. Často jsou málo účinné, vykazují negativní vedlejší účinky nebo jsou pro klinické použití příliš toxické a tak se stávají spíše výchozí strukturální látkou, od které se odvíjí vývoj nových derivátů s lepšími vlastnostmi.

Jedním z již objevených derivátů myoseverinu s popsáním mechanismem účinku je látka s kódovým označením E2GG (3-isopropyl-5,7-bis[(4-methoxybenzyl)amino]-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin. Jedná se o zástupce pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů, který stejně jako myoseverin brání polymeraci tubulinu. Tím znemožňuje správné sestavení mitotického vřeténka a navozuje zablokování buněčného cyklu s následnou apoptózou. Jeho účinnost je o něco menší než u myoseverinu, nicméně u něj byla zjištěna inhibiční aktivita pro CDK 1, 2 a 7. K buněčným účinkům E2GG tak tedy patří jak přímá inhibice CDK, tak přímá destabilizace mikrotubulárního aparátu buňky. Tato současná dvojitá inhibitorová specifita má zajímavý terapeutický potenciál pro léčbu nádorových onemocnění (Kryštof et al., 2006).

Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na testování účinků nově připravených derivátů myoseverinu (pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů) na nádorové linii HeLa (adherentní buňky odvozené od karcinomu děložního čípku). Jedná se o látky s kódovým označením 3407, 3419, 3421 a 3422. Struktura myoseverinu a testovaných derivátů je zobrazena na Obr. 1. Hodnoty cytotoxicity myoseverinu a testovaných derivátů na vybraných buněčných liniích jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Hodnoty cytotoxicity myoseverinu a testovaných derivátů na vybraných buněčných liniích.

Buněčná linie	IC ₅₀ (μM)				
	Myoseverin	3407	3419	3421	3422
K562	11,8 ± 2,6	>6,25	>12,5	>12,5	>50
MCF7	20,0 ± 4,6	>6,25	>12,5	>12,5	>50
HeLa	5,1 ± 0,5	17,9 ± 0,7	17,5 ± 0,6	22,9 ± 0,6	34,2 ± 3,5
BJ	19,7 ± 0,3	28,0 ± 2,2	34,8 ± 0,3	32,2 ± 0,5	>100



Obr. 1: Chemická struktura myoseverinu a testovaných derivátů.

Kapitoly 5 - 7 této bakalářské práce jsou zaměřeny na obecné pochopení a popsání základních buněčných dějů, buněčných struktur a detekčních metod, kterými se tato bakalářská práce více či méně zabývá.

5. Buněčný cyklus

Buňky jsou základní stavební a funkční jednotkou všech známých žijících organismů. Buňky mnohobuněčných organismů spolu navzájem spolupracují, komunikují a vytvářejí vyšší specializované útvary označované u rostlin jako pletiva a u živočichů jako tkáně. Buňky přijímají signály z vnějšího prostředí, které aktivují kaskády signálních drah uvnitř buňky, které vedou k příslušné buněčné odpovědi (Alberts et al., 2007).

Buněčný cyklus představuje sled po sobě následujících kroků, které zajišťují, aby buňka rostla, zdvojnásobila svoji genetickou informaci a tu následně rozdělila při buněčném dělení do dvou dceřiných buněk. Je nezbytné, aby celý cyklus proběhl správně a přesně. V opačném případě kontrolní a regulační mechanismy buněčného cyklu (především G_1/S a G_2/M kontrolní bod) buněčný cyklus zastaví a zahájí příslušné opravy (např. poškozené DNA). Jestliže je poškození příliš závažné, rozsáhlé a tedy i neopravitelné, iniciují kontrolní body buněčného cyklu buněčnou smrt - apoptózu. Poškození kontrolních mechanismů buněčného cyklu může vést k nekontrolovatelnému buněčnému dělení a k rozvoji nádorových onemocnění (Garrett, 2001).

Znalost mechanismů regulace a kontroly buněčného cyklu hraje zásadní roli při vývoji nových potenciálních nádorových léčiv.

5.1. Fáze buněčného cyklu

Buněčný cyklus se dělí na interfázi a mitózu zakončenou cytokinezí. Mitóza je nejdramatičtější fází buněčného cyklu a to i přesto, že u lidských eukaryotických buněk trvá přibližně jen jednu hodinu a zaujímá tak pouhých 5 % celkového času buněčného cyklu. V mitóze dochází k přesnému rozdělení chromozómů mezi dvě vznikající dceřiné buňky. Interfáze zaujímá 95 % času buněčného cyklu a je rozdělena do dalších tří fází G_1 , S a G_2 (Cooper, 2000).

G_1 fáze je první fází po mitóze. Velmi často bývá označována jako růstová fáze. Metabolismus buňky, který byl při mitóze utlumen, se opět zvyšuje a vytváří důležité proteiny, které se následně uplatňují v dalších fázích buněčného cyklu. Buňka se připravuje na S fázi. V S fázi dochází ke zdvojení genetické informace v procesu zvaném replikace DNA. Následuje G_2 fáze, ve které buňka opět roste a připravuje se na mitózu. Během mitózy dochází k přesnému a rovnoměrnému rozdělení genetické informace do dvou dceřiných buněk (Alberts et al., 2007). Buňka může z G_1 fáze buněčného cyklu reverzibilně přejít do klidové fáze tzv. G_0 bodu, ve kterém zůstává a dále se nedělí z důvodu působení specifických antimitogenních signálů, nebo naopak z nedostatečného působení mitogenních signálů (Garrett, 2001).

5.2. Kontrolní body a regulační systém buněčného cyklu

Regulační systém buněčného cyklu je tvořen souborem proteinů a enzymů odlišných od proteinů a enzymů účastnících se např. replikace DNA a segregace chromozómů. Tento systém využívá několika důležitých kontrolních bodů k zastavení buněčného cyklu. První kontrolní bod se nachází na rozhraní fází G_1/S . V tomto bodě je kontrolována dostatečná velikost buňky, zda jsou okolní podmínky vhodné pro proliferaci a zda není poškozena DNA. V případě, že jedno z výše uvedených kritérií není splněno, dojde k zastavení buněčného cyklu do té doby, než buňka doroste do velikosti vhodné pro proliferaci nebo než reparační mechanismy buňky opraví poškozenou DNA. Další významný kontrolní bod se nachází na rozhraní fází G_2/M . Kontroluje, zdali je buňka opět dostatečně velká a zda je DNA kompletně zreplikována (Alberts et al., 2007). Velmi důležitý je i kontrolní bod na začátku mitózy, který kontroluje správné vytvoření mitotického dělicího vřeténka. V pozdní G_1 fázi se nachází restriční bod R, který rozhoduje o tom, zdali buňka vstoupí do nového buněčného cyklu anebo ne. V případě, že obdrží dostatečné množství růstových signálů (převážně extracelulárního původu), může buňka restričním bodem projít a po zbytek tohoto buněčného cyklu již tyto růstové signály nebude vyžadovat. Pokud však buňka neobdrží příslušné signály, nebude moci restričním bodem projít a místo toho vstoupí do klidové G_0 fáze. Restriční bod se tedy od ostatních kontrolních bodů liší tím, že nekontroluje poškození genomu, nicméně zabraňuje buněčné proliferaci, v případě, že nedostane příslušné růstové signály (Garrett, 2001).

Hlavní složkou regulačního systému buněčného cyklu jsou tzv. cyklin-dependentní proteinkinázy (CDK) patřící do rodiny serin/threonin kináz. Tyto kinázy jsou přítomny v buňce po celý buněčný cyklus. Aktivovány jsou ale pouze v určitých fázích. Pro enzymovou aktivaci a regulaci CDK je nezbytná jejich fosforylace, defosforylace a především přítomnost další skupiny proteinů, označovaných jako cykliny. Na rozdíl od CDK nemají cykliny enzymovou aktivitu a jejich koncentrace se v průběhu buněčného cyklu cyklicky mění. Sestavený aktivovaný komplex cyklin-CDK katalyzuje fosforylaci klíčových proteinů, které iniciují průchod buňky jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Alberts et al., 2007). Například retinoblastomový protein pRb, který je produktem tumorového supresorového genu RB1, je klíčový protein v regulaci G_1 fáze a má 16 potencionálních míst fosforylace. Jestliže je gen RB1 mutován, nebo protein pRb nesprávně fosforylován může dojít k chybné regulaci buněčného cyklu a rozvoji nádorového onemocnění (Garrett, 2001).

K tomu, aby se buněčný cyklus mohl zastavit v příslušných kontrolních bodech, slouží tzv. cyklin-dependentní inhibiční proteiny. Tyto proteiny inhibují enzymovou

aktivitu CDK (Malumbres et Barbacid, 2009). Jako příklad lze uvést inhibiční protein p21. Poškození DNA vede ke zvýšení koncentrace a aktivity regulačního proteinu p53, který stimuluje transkripci genu kódující protein p21. Ten se váže na komplex S-fázového cyklinu s CDK a inaktivuje ho. Buněčný cyklus se zastaví v G₁ fázi, dokud není DNA opravena (Alberts et al., 2007). V současné době je v klinickém testování celá řada syntetických inhibitorů CDK (např. Flavopiridol). Inhibitory CDKs tedy představují jednu z dalších možností, kudy se ubírat v boji s nádorovými onemocněními (Senderowicz, 1999).

6. Cytoskelet

Cytoskelet je síť proteinových vláken uložených v cytoplazmě a vyplňujících celou buňku. Jedná se o vysoce dynamickou strukturu, která je pro život buňky nezbytná. Buňce umožňuje především udržovat stabilní tvar, ale současně se může reorganizovat a přizpůsobit se působení vnějších sil. Cytoskelet je zodpovědný za buněčný transport a pohyb. Zajišťuje pohyb organel z jednoho místa na druhé, rozdělení chromozómů při mitóze, nebo zaškrcení živočišných buněk při cytokinezi (Fletcher et Mullins, 2010).

6.1. Proteinová vlákna cytoskeletu

Cytoskelet se skládá ze tří typů proteinových vláken: mikrotubulů, mikrofilament a intermediálních filament.

Intermediální filamenta jsou provazcovitá vlákna vytvořená stočením mnoha dlouhých fibrilárních proteinových podjednotek s centrální tyčovitou částí a globulární hlavičkou na aminovém i karboxylovém konci. Jejich průměr se pohybuje okolo 10 nm. Jedná se o nejpevnější a nejodolnější vlákna ze všech tří typů cytoskeletárních vláken. V buňce tvoří jadernou laminu a nachází se především kolem jádra a v místech buněčných spojů. Chrání buňku před mechanickým stresem (Alberts et al., 2007).

Mikrofilamenta také označovaná jako aktinová filamenta jsou šroubovitě polymery proteinu aktinu vytvářející provazce o průměru 7 nm. Tyto vlákna jsou tvořena řetězcem globulárních molekul aktinu, které všechny směřují stejným směrem a vytváří tak plus a minus konec. Na plus konci vlákno roste nebo se rozpadá rychleji než na minus konci. Mikrofilamenta jsou tenká a velmi pružná. V buňce se nachází pod cytoplazmatickou membránou a umožňují buňce pohyb po pevném podkladu a

fagocytaci větších částic. Významně se také uplatňují při cytokinezi a svalovém stahu (Alberts et al., 2007).

Pro tuto bakalářskou práci jsou však nejdůležitější mikrotubulová vlákna, a proto jim je věnována celá samostatná podkapitola.

6.1.1. Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou duté útvary o průměru 25 nm složené z dimerních globulárních α - a β -tubulinových podjednotek spojených nekovalentními vazbami (Howard et Hyman, 2007). Tubulinové podjednotky formují stěnu cylindrického mikrotubulu, který se skládá ze 13 paralelních protofilament (řetězců střídajících se α - a β -tubulinů) (Alberts et al., 2007). Mikrotubuly jsou vysoce dynamické polární útvary s plusovým koncem (β -tubulinem) na jedné straně mikrotubulu a minusovým koncem (α -tubulinem) na druhém. Na plusovém konci mikrotubuly přirůstají, naopak na minusovém se rozpadají (Walker et al., 1988). V *in vitro* experimentech vede dodání čistého tubulinu k růstu na obou koncích, plusový konec ale roste rychleji než minusový. Mikrotubuly jsou v živočišné buňce tvořeny v centrozomech v tzv. γ -tubulinových prstencích. Centrozomy jsou drobné struktury v blízkosti jádra, odkud se mikrotubuly rozbíhají ke krajům buňky (Alberts et al., 2007). Mikrotubulová vlákna jsou asociována s celou řadou proteinů. Nejdůležitějšími z nich jsou tzv. molekulové motory (kineziny a dyneiny), které se pohybují podél mikrotubulů a uplatňují se při vnitrobuněčném transportu (Howard et Hyman, 2007). Kineziny se pohybují směrem k plus konci mikrotubulu a dyneiny naopak směrem k minus konci (Alberts et al., 2007).

Mikrotubuly mají také klíčovou roli při mitóze, jak bude popsáno v kapitole 6.1.1.2. Mikrotubuly a mitotické dělicí vřeténko.

6.1.1.1. Dynamická nestabilita mikrotubulů

Mikrotubuly se prodlužují přikládáním nových podjednotek tubulinu k plus konci mikrotubulového vlákna směrem od organizačního centra. Růst mikrotubulu se však může náhle zastavit a mikrotubul se začne zkracovat zpátky směrem k organizačnímu centru. Zkrácení může být úplné, nebo jen částečné, po kterém může dojít opět k náhlému růstu (Alberts et al., 2007). Mikrotubuly tedy mohou dynamicky přepínat mezi fází růstu a fází zkracování. Tento proces se označuje jako dynamická nestabilita mikrotubulů (Karp et Gerald, 2005).

Každý volný tubulinový dimer (sestavující z α - a β -tubulinových podjednotek) obsahuje dvě vazebná místa pro molekuly guanosintrifosfátu (GTP) (Weisenberg, 1972). Zatímco GTP vázané na α -tubulinovou podjednotku je stabilní a má strukturní funkci, GTP vázané na β -tubulinovou podjednotku může být hydrolyzováno na GDP krátce poté, co byl navázán na plusový konec rostoucího mikrotubulu. Tubulinové podjednotky nesoucí GDP mají odlišnou konformaci a vazby mezi nimi jsou slabší než u tubulinových podjednotek s pevně navázaným GTP (Alberts et al., 2007). Při rychlé polymeraci jsou tubulinové molekuly přidávány na konec mikrotubulu rychleji, než je hydrolyzováno GTP, které nesou. Konec mikrotubulu je tvořen pouze GTP-tubulinovými podjednotkami, které se mezi sebou pevně vážou a vytváří tzv. GTP-čepičku. Mikrotubul roste a nemůže depolymerovat. Jestliže je růst mikrotubulu pomalý, může dojít k hydrolyze GTP na GDP dříve než se navážou nové tubulinové podjednotky nesoucí GTP. Podjednotky s navázaným GDP jsou jen slabě vázány a uvolňují se z vlákna mikrotubulu do cytosolu buňky. Tubulinové vlákno se zkracuje (Mitchison et Kirschner, 1972). V cytosolu je jejich navázaný GDP nahrazen za GTP, a tím se stávají součástí nových zásob volných molekul tubulinu schopných vazby s koncem dalšího rostoucího mikrotubulu (Alberts et al., 2007). Proces změny polymerace mikrotubulu v jeho depolymeraci je označován, jako mikrotubulová katastrofa. V průběhu depolymerace se mohou na konec vlákna vázat tubulinové podjednotky s navázaným GTP, a tím vytvořit novou GTP-čepičku, která zabraňuje další depolymeraci mikrotubulu. Tento proces se nazývá záchrana mikrotubulu (Mitchison et Kirschner, 1972).

6.1.1.2. Mikrotubuly a mitotické dělicí vřeténko

Mitotické dělicí vřeténko představuje velmi důležitou buněčnou komponentu, která je zodpovědná za správné a přesné rozdělení chromozómů do dceřiných buněk během buněčného dělení. Mitotické vřeténko je tvořeno ze stovek různých asociovaných proteinů. Hlavní stavební složku však představují mikrotubulová vlákna (Walczak et Heald, 2008).

Ke konci S fáze dochází k duplikaci a rozpojení centrozomu za vzniku dvou dceřiných centrozomů, které se zvětšují do konce G_2 fáze a zůstávají pospolu až do profáze, kdy se rozcházejí k protilehlým stranám buňky a dávají tak vzniknout pólům mitotického vřeténka. Na začátku mitózy dochází k rozpadu stávajících dlouhých mikrotubulů a vytvoření nových, kratších s daleko větší dynamickou nestabilitou (20x oproti interfázním mikrotubulům) (Alberts et al., 2007).

Správně sestavené mitotické vřeténko je tvořeno třemi typy mikrotubulárních vláken. Prvními z nich jsou tzv. astrální mikrotubuly. Jedná se o mikrotubulová vlákna vyběhající z pólů vřeténka do všech stran cytoplazmy. Jsou volně zakončena nebo jsou zakotvena do vnitřní strany plazmatické membrány. Mají především ukotvovací funkci. Druhým typem jsou tzv. polární mikrotubuly. Tyto mikrotubuly se v ekvatoriální rovině buňky spojují pomocí specifických proteinů s mikrotubuly druhého pólu a udržují tak tvar mitotického vřeténka. Poslední typem jsou kinetochorové mikrotubuly. Tato vlákna se vážou pomocí proteinových komplexů kinetochorů na kondenzované chromozómy v oblasti jejich centromer. Jsou zodpovědné za rozchod chromozómů při anafázi (Alberts et al., 2007).

Všechny typy mikrotubulových vláken jsou orientovány minus koncem k pólům mitotického vřeténka. Plus konce směřují do prostoru buňky. Nejsou-li chromozómy správně uchyceny, nebo pokud dojde k chybnému sestavení mitotického vřeténka (za správné poskládání mikrotubulů zodpovídá rodina proteinů nazývaná se kineziny, především pak kinezin-5 a -4), dojde k zastavení buněčného cyklu vlivem kontrolního bodu vřeténka. V případě, že nebyl nalezen žádný problém, může buňka pokračovat v mitóze. V anafázi se oddělují sesterské chromatidy a ty jsou pomocí kinetochorových vláken přitahovány k opačným pólům buňky. Polární mikrotubuly se prodlužují polymerací na plus koncích. Astrální mikrotubuly se ukotvují v plazmatické membráně. Tyto procesy vedou k oddálení pólů vřeténka a napomáhají segregaci chromozómů. Oddálené póly vřeténka se v dceřiných buňkách stávají základem pro nové centrozomy (Alberts et al., 2007).

6.1.1.3. Mikrotubulární inhibitory

Mikrotubulární inhibitory jsou látky, které se váží na molekuly volného tubulinu, nebo přímo na vytvořená mikrotubulová vlákna. Mikrotubulární inhibitory spadají do skupiny látek nazývaných se látky antimitotické. Tyto látky ovlivňují správnou funkci mitotického dělicího vřeténka, které je nezbytné pro úspěšné rozdělení buňky při mitóze (Jordan et Wilson, 2005).

Antimitotické látky, které cílí na mikrotubuly, lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu představují látky stabilizující mikrotubuly. Sem spadají látky jako paclitaxel, docetaxel, laulimalid, epothylony a celá řada dalších. Například paclitaxel se úspěšně používá při léčbě karcinomu prsu, prostaty, plic a Kaposiho sarkomu u pacientů s HIV (Saville et al., 1995). Vyšší terapeutické koncentrace paclitaxelu zabraňují oddělení mikrotubulů od centrozomů chromozómů, a tím zastavují buněčné dělení (Ganguly et

al., 2010). Bylo zjištěno, že se paclitaxel váže na β -tubulinovou podjednotku mikrotubulu. Druhou skupinu představují látky destabilizující mikrotubuly. Do této skupiny patří nocodazol, vinblastin, vincristin, kolchicin, kolcemid, combretastatin a celá řada dalších látek, které se již v klinické praxi úspěšně používají k léčbě rakoviny. Například vinblastin je látka využívaná v léčbě karcinomu prsu, hlavy, krku, varlat a Hodgkinova lymfomu. Získává se z rostliny barvínek růžový (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don), ve které vzniká spojením dvou alkaloidů catharanthinu a vindolinu (Esyanti et al., 2008). U vinblastinu, stejně jako u kolcemidu a nokodazolu, byly popsány dva účinky na živočišné buňky (Jordan et Leslie, 2004). Při velmi nízkých koncentracích potlačují dynamiku mikrotubulů, ve vyšších koncentracích způsobují destabilizaci mikrotubulů, což má za následek chybné vytvoření aparátu dělicího vřeténka a následné zastavení buněčného cyklu (Yang et al., 2010).

Vzhledem k tomu, že se mikrotubuly v buňce kromě tvorby mitotického vřeténka uplatňují i při řadě dalších funkcí, stávají se i normální nedělicí se buňky terčem těchto látek. Tyto látky často vykazují nedostatečnou selektivitu k nádorovým buňkám projevující se celou řadou vedlejších účinků. Cílem současného výzkumu je nalézt takové látky, které by vykazovaly co nejvyšší specifičnost k nádorovým buňkám a zároveň co nejmenší cytotoxicitu pro nenádorové buňky lidského organismu.

7. Programovaná buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza, je vysoce regulovaný proces probíhající v buňkách mnohobuněčných organismů vedoucí k morfologickým změnám a následné destrukci a rozpadu buňky na apoptotická tělíška (Saikumar et al., 1999). Tyto morfologické změny zahrnují zmenšení a kondenzaci buňky, odbourání cytoskeletu, rozpad jaderné membrány a fragmentaci jaderné DNA. Povrch buňky je pozměněn a rozpoznán makrofágy, což vede k okamžité fagocytaci apoptotické buňky. Na rozdíl od buněčné nekrózy, která je formou traumatické buněčné smrti v důsledku akutního buněčného poškození vedoucího zpravidla k nebezpečné zánětlivé reakci, je apoptóza proces pro organismus vesměs pozitivní bez zánětlivé reakce (Alberts et al., 2007). Pomocí apoptózy organismus udržuje rovnováhu mezi produkcí nových buněk a odstraňováním buněk starých, nepotřebných nebo poškozených. Zajišťuje tak homeostázu vnitřního prostředí organismu. Apoptóza se také významně uplatňuje při formování organismu během embryonálního vývoje (např. tvorba prstů ruky a nohy). Snížená aktivita buněčné apoptózy nebo její úplná inhibice vede k nadměrné produkci buněk, která může vyústit až k rozvoji nádorového onemocnění nebo různých typů

autoimunitních onemocnění. Naopak zvýšená aktivace buněčné apoptózy vede k nadměrné destrukci buněk, což může vést k rozvoji chorob spojených s jejich deficiencí (Thompson, 1995). Jedná se například o Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, diabetes mellitus typu I, srdeční ischemii, akutní infarkt myokardu nebo roztroušenou sklerózu (Saikumar et al., 1999).

Výše zmíněná role apoptózy v řadě onemocnění vede v současnosti k jejímu intenzivnímu zkoumání a hledání nových léčiv, která by cílila právě na molekulární dráhy apoptózy.

7.1. Metody detekce apoptózy

Nejjednodušší a zároveň jednou z nejlevnějších metod detekce apoptózy je pozorování morfologických změn (např. kondenzace chromatinu) a apoptotických tělísek pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Nevýhodou této metody je identifikace apoptotických buněk až ve velmi pozdní fázi apoptózy (Sládek et al., 2001).

Dalšími využívanými metodami detekce apoptózy jsou pozorování permeabilizace plazmatické membrány a sledování změn mitochondriálního membránového potenciálu. K pozorování permeabilizace plazmatické membrány lze použít například zelené fluorescenční barvivo Yo-pro, které se přes mírně permeabilizovanou membránu apoptotických buněk a silně poškozenou membránu nekrotických buněk dostává do nitra buňky a váže se na DNA. Pro odlišení apoptotických buněk od nekrotických se využívá barvení propidium jodidem. Neporušené membrány normálních buněk jsou pro Yo-pro neprostupné (Idziorek et al., 1995). Pro sledování změn mitochondriálního membránového potenciálu se používá tetramethylrhodamin ethyl ester (TMRE). Jedná se o molekulu, která se kumuluje v mitochondriích zdravých buněk. Případný pokles nebo úplná ztráta membránového potenciálu lze změřit jako pokles signálu fluorescence, který lze detekovat pomocí průtokového cytometru nebo fluorescenčním mikroskopem (O'Reilly et al., 2004).

Další možností detekce apoptózy je metoda založená na translokaci fosfatidylserinu využívající fluorescenčně značený protein Annexin-V. Tento protein se s velmi vysokou afinitou váže na fosfatidylserin, který je u apoptotických buněk translokován z nitra buňky na jejich povrch. Problém nastává u nekrotických buněk, kdy se v důsledku poškozené plazmatické membrány Annexin-V váže i na fosfatidylserin uvnitř buňky a poskytuje tak falešně pozitivní výsledek. Pro odlišení raných apoptotických buněk od nekrotických buněk se používá barvení pomocí PI.

Detekce se provádí opět pomocí průtokového cytometru nebo fluorescenčním mikroskopem (Vermes et al., 1995).

Jednou z nejspolehlivějších metod detekce apoptózy je fragmentace DNA při které je DNA štěpena na malé části o velikost 200 bp, které jsou z buňky extrahovány a detekovány elektronovým mikroskopem nebo gelovou elektroforézou s následným barvením ethidium bromidem (Wyllie, 1980).

Ke stanovení apoptózy buněk se také využívá různých metod detekce caspáz. Neboť se jedná o jeden z hlavních experimentů této bakalářské práce, bude caspázám věnována samostatná podkapitola.

7.1.1. Caspázy a caspáza 3

Protein caspáza 3 je členem rodiny proteinů označovaných jako caspázy (angl. cysteine-dependent aspartate-directed proteases). Jedná se o skupinu cysteinproteáz s cysteinem v aktivním místě štěpící peptidovou vazbu specificky za aspartátem. Uplatňují se v signální kaskádě procesů apoptózy a nekrózy (Alnemri et al., 1996). U člověka je známo celkem dvanáct caspáz, z nichž sedm se uplatňuje při apoptóze. Jedná se o caspázy iniciační (CASP 2, 8, 9 a 10), které jsou na začátku aktivační kaskády a caspázy efektorové (CASP 3, 6 a 7), které jsou na konci aktivační kaskády a provádějí aktivaci samotné apoptózy. Zbylé caspázy se uplatňují při regulaci buněčného cyklu a zánětlivé odpovědi (Alberts et al., 2007).

Caspázy jsou exprimovány v neaktivní formě označované jako procaspázy. Jedná se o dimery složené z α , β podjednotky a z připojené sekvence aminokyselin nazvané protodoména. Hlavní schopností caspáz je, že jedna caspáza je schopna aktivovat caspázu druhou, a tím vytvořit komplexní aktivační kaskádu vedoucí až k indukci buněčné apoptózy. Aktivační kaskáda caspáz může být aktivována dvěma složitými cestami. Vnější aktivace využívající Fas receptorů na povrchu buňky a vnitřní aktivace související s uvolněním cytochromu c z mitochondrií do cytosolu a aktivaci proteinu Apaf-1 (Alberts et al., 2007).

Caspáza 3 kódovaná genem CASP 3 patří mezi nejlépe prostudované lidské caspázy. Jedná se o jednu z hlavních výkonných efektorových caspáz mající zásadní význam při apoptóze. Podílí se na kondenzaci chromatinu a fragmentaci jaderné DNA (Porter, 1999). Caspáza 3 je u apoptotických buněk aktivována jak vnější, tak vnitřní aktivační dráhou (Salvesen, 2002). Detekce aktivní caspázy 3 se využívá jako apoptotického markeru. Aktivaci caspázy 3 v buňce lze zjistit několika metodami. Například pomocí fluorimetrického stanovení její aktivity založeného na hydrolýze

peptidového substrátu značeného 7-amido-4-trifluoromethylkumarinem, nebo pomocí fluorescenční mikroskopie či průtokové cytometrie (Gurtu, 1997).

V této bakalářské práci byla pro stanovení aktivity caspázy 3 použita metoda detekce aktivního fragmentu caspázy 3 pomocí králičí monoklonální protilátky proti štěpnému fragmentu caspázy 3 značené Alexa Fluor 488 (viz. kapitola metody 12.7.).

8. Histony a histon H3

Histony jsou malé ve vodě rozpustné bílkoviny obsahující velký počet kladně nabitých aminokyselin, především arginin a lysin. Tento celkový kladný náboj jim umožňuje vytvářet reverzibilní komplexy s DNA označované jako nukleozómy (Reeve et al., 2004). Existuje pět hlavních skupin histonů H1, H2A, H2B, H3 a H4. Histony podléhají různým posttranslačním modifikacím, které mění jejich vzájemné interakce s DNA a jadernými proteiny. Jedná se např. o acetylaci, metylaci a fosforylaci (Strahl, 2000).

Histon H3 je tvořen z globulární domény a N-terminálního konce. Jedná se o nejvíce postranslačně modifikovaný histon ze všech. Fosforylace histonu H3 na N-terminálním konci je nezbytná pro kondenzaci a formování chromozómů během mitózy (Goto et al., 1999). Dlouhou dobu se předpokládalo, že na kondenzaci chromozómů během mitózy se podílí i fosforylace histonu H1 (Bradbury, 1992), ale další výzkumy ukázaly, že tomu tak není (Shen et al., 1995). Pomocí specifické polyklonální protilátky proti histonu H3 fosforylovanému na serinu 10 bylo u rostlin a obratlovců prokázáno, že kondenzace chromozómů během mitózy je doprovázena právě fosforylací histonu H3 na serinu 10 (De la Barre et al., 2000). Fosforylace histonu H3 je u savčích buněk poprvé detekována v pozdní G₂ fázi a to na pericentrickém heterochromatinu. Jak mitóza probíhá, šíří se přes celé chromozómy. Fosforylace je dokončena v pozdní profázi a udržována v metafázi. Defosforylace histonu H3 začíná v anafázi a končí na začátku telofáze (Van Hooser et al., 1998).

Detekce histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 se využívá jako mitotického markeru. V této bakalářské práci byla pro stanovení fosforylovaného histonu H3 (Ser10) v buňkách použita králičí polyklonální primární protilátka anti-pH3 (Ser10) a kozí sekundární protilátka proti králičí IgG značená Alexa Fluor 488 (viz. kapitola metody 12.9.).

9. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda umožňující diferenciaci populací buněk a zjištění přesných počtů buněk obsažených ve vzorku na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností při průchodu laserovým paprskem. Analýza se provádí na přístroji nazývaném se průtokový cytometr. Každá buňka ve vzorku je ozařována laserovým paprskem. Při dopadu laserového paprsku na buňku dochází k jeho lomu a rozptylu. Přímý rozptyl je úměrný velikosti buňky. Boční rozptyl poskytuje informaci o vnitřní struktuře a buněčné granularitě. Průtoková cytometrie může být také využita i pro detekci fluorescence buněk. Buněčné struktury, které mají být analyzovány, jsou nabarveny fluorescenčními barvivy (tzv. fluorochromy). Při ozáření takto nabarvené buňky, dochází k absorpci světla o vlnové délce úměrné dopadajícímu laserovému paprsku a následné emisi světla, které je zachyceno detektory spojenými s filtry propouštějící pouze světlo určité vlnové délky. Průtoková cytometrie může být využívána i pro speciální analýzy jako jsou multiparametrové analýzy a buněčné třídění (Ormerod, 1994).

V této bakalářské práci byla metoda průtokové cytometrie použita pro analýzu buněčného cyklu (viz. kapitola metody 12.6.) a k detekci aktivního fragmentu caspázy 3 (viz. kapitola metody 12.7.).

10. Imunofluorescenční značení:

Imunofluorescenční značení je technika založená na použití fluorescenčně značených protilátek. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších technik v experimentální biologii. Rozlišuje se přímé a nepřímé značení. U přímého značení se primární protilátka konjugovaná s fluorochromem váže přímo na zájmový antigen. U sekundárního značení se primární protilátka váže na zájmový antigen. Následuje vazba sekundární protilátky konjugované s fluorochromem na imunoglobuliny organismu, z něhož pochází výše zmíněná primární protilátka. Nepřímé značení je citlivější než značení přímé, nicméně je ale časově náročnější. Analýza se provádí zpravidla na fluorescenčním mikroskopu a vždy se zafixovanými vzorky (King et al., 2006).

V této bakalářské práci byla technika imunofluorescenčního značení použita pro vizualizaci tubulinu (viz. kapitola metody 12.8.) a k detekci fosfohistonu H3 (Ser10) (viz. kapitola metody 12.9.).

Praktická část

11. Materiál a přístroje

11.1. Chemikálie a protilátky

4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)(Sigma-Aldrich), aceton (Fischer Scientific), calcein AM roztok (Molecular probes), chlorid draselný (Fischer Scientific), chlorid sodný (Fischer Scientific), β -cyklodextrin (MP Biomedicals), dimethylsulfoxid (DMSO)(Sigma-Aldrich), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lachema), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Invitrogen), ethanol (Fischer Scientific), fetální sérum (FS)(Invitrogen), hovězí sérový albumin (BSA)(Sigma Aldrich), hydroxid sodný (Lachema), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA)(Sigma-Aldrich), kyselina chlorovodíková (MP Biomedicals), L-glutamin roztok (Sigma-Aldrich), methanol (Fischer Scientific), mowiol (Calbiochem), penicilin streptomycin roztok (Sigma-Aldrich), propidium jodid (Sigma-Aldrich), ribonukleasa A (RNAsa)(Sigma-Aldrich), trypsin (Sigma-Aldrich), Tween 20 (MP Biomedicals).

Králičí monoklonální protilátka proti štěpnému fragmentu caspázy 3 značená Alexa Fluor 488 (Beckman Coulter), myší monoklonální primární protilátka anti- α tubulin klon DM1A (Sigma-Aldrich), kozí sekundární protilátka proti myším IgG značená fluoresceinem (GAM-FITC)(Jackson ImmunoResearch Laboratory), králičí polyklonální primární protilátka anti-pH3 (Ser10)(Millipore), kozí sekundární protilátka proti králičí IgG značená Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

Všechny protilátky byly rozpuštěny v roztoku 5% nízkotučného mléka a 0,1% Tweenu 20 v PBS.

Testované látky s kódovým označením 3417, 3419, 3421, 3422 a myoseverin byly připraveny v Izotopové laboratoři (Ústav experimentální botaniky AV ČR) a rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mM.

11.2. Roztoky

11.2.1. Roztoky pro kultivaci buněk

Standardní kultivační médium DMEM 10%

Složení: Dulbecco's Modified Eagle Medium, 100 IU/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 10% (v/v) fetální sérum, 0,25 mg/ml glutamin

Pro přípravu 500 ml 10% DMEM bylo sterilně přidáno k 440 ml DMEM média 50 ml fetálního séra, 5 ml penicilinu/streptomycinu a 5 ml glutaminu.

0,5% EGTA (w/v), pH 7,2

Složení: EGTA, PBS

Pro přípravu 500 ml EGTA bylo rozpuštěno 2,5 g EGTA v 500 ml PBS. Hodnota pH byla upravena na 7,2. Následně byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr.

Trypsin/EGTA

Složení: 0,1% trypsin; 0,25% EGTA

Pro přípravu 500 ml Trypsin/EGTA bylo 20 ml zásobního trypsinu (25 g/l) sterilně smícháno s 230 ml sterilní destilované vody. Ke 250 ml vzniklého roztoku bylo přidáno 250 ml 0,5% EGTA pH = 7,2.

11.2.2. Roztoky pro měření rozpustnosti testovaných látek

5 mM a 0,1 mM kyselina chlorovodíková, 5 mM hydroxid sodný, 0,5 mM β-cyklodextrin.

11.2.3. Roztoky pro analýzu buněčného cyklu

PBS

Složení: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 mM KH₂PO₄

Pro přípravu 1l PBS bylo smícháno 2,31 g Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 0,2 g KCl a rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 7,4. Následně byl roztok doplněn destilovanou vodou do objemu 1l.

Roztok propidium jodidu

0,1 mg/ml, destilovaná voda

Roztok RNAsy
10 mg/ml, destilovaná voda

70% ethanol

11.2.4. Roztoky pro detekci aktivního fragmentu caspázy 3

Desetkrát ředěný roztok králičí monoklonální protilátky anti-cleaved casp3-AF488 v 0,5% BSA/PBS, 0,5% BSA/PBS, ledově vychlazený 90% methanol.

11.2.5. Roztoky pro imunofluorescenční značení tubulinu

PBS-T

Složení: PBS, Tween 20

Pro přípravu 500 ml PBS-T bylo smícháno 500 μ l Tweenu 20 s 500 ml PBS.

methanol/aceton 1:1 (v/v)

Složení: methanol, aceton

Pro přípravu 50 ml fixační směsi bylo 25 ml methanolu smícháno s 25 ml acetonu.

Roztok myší monoklonální primární protilátky anti- α tubulin klon DM1A byl připraven naředěním zásobního roztoku anti- α tubulinu 10 μ g/ml 1 : 4 do média DMEM s 10% fetálním sérem (konečná koncentrace 2 μ g/ml).

Roztok kozí sekundární protilátky GAM-FITC byl připraven naředěním (100x) zásobního roztoku GAM-FITC 0,68 mg/ml do média DMEM s 10% fetálním sérem (konečná koncentrace 6,8 μ g/ml).

Roztok DAPI byl připraven naředěním (2000x) zásobního roztoku DAPI 10 mg/ml do destilované vody (konečná koncentrace 5 μ g/ml).

11.2.6. Roztoky pro imunofluorescenční značení fosfohistonu H3

Roztok králičí polyklonální primární protilátky anti-pH3 (Ser10) byl připraven naředěním zásobního roztoku anti-pH3 (Ser10) (200x) do 0,5% BSA/PBS.

Roztok kozí sekundární protilátky proti králičí IgG značenou Alexa Fluor 488 byl připraven naředěním zásobního roztoku (1000x) do 0,5% BSA/PBS.

11.3. Přístrojové vybavení

Flowbox s vertikálním prouděním vzduchu Gelaire TC 48 (Gelaire, Flow Laboratories, AUS), světelný mikroskop CK2 (Olympus, JPN), spektrofotometr UV 1800 (Schimadzu Scientific Instruments, USA), průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC – MPL (Beckman Coulter, USA), centrifuga BR4i s vyměnitelnými rotory (Jouan, FRA), vakuová pumpa KNF (Laboport, USA), vortex Heidolph Reax Top (Heidolph, DEU), CO₂ inkubátor (Sanyo, JPN), fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus, JPN) vybavený digitální kamerou Cool Snap (Photometrics, GB).

11.4. Biologický materiál

Adherentní buněčná linie HeLa odvozená od karcinomu děložního čípku, suspenzní buněčná linie K562 odvozená od chronické myeloidní leukémie a adherentní buněčná linie MCF7 odvozená od lidského karcinomu prsu byly zakoupeny u firmy European Collection of Cell Cultures (GB). Lidské BJ fibroblasty byly zakoupeny u firmy American Type culture Collection (USA).

12. Metody

12.1. Stanovení životaschopnosti buněk

Testy životaschopnosti buněk byly provedeny pomocí calcein AM roztoku. Fluorescence živých buněk byla měřena při 485/538 nm (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent Plate Reader (Thermo Labsystems) (Kryštof et al., 2006).

12.2. Měření rozpustnosti testovaných látek

Na spektrofotometru byla změřena absorbance (v rozsahu vlnových délek 230 – 450 nm) testovaných látek o koncentraci 100, 50 a 10 μ M rozpuštěných v příslušných rozpouštědlech (ředění 1000x). Jako blank byl použit do objemu 2 ml tisíckrát zředěný roztok DMSO v testovaném rozpouštědle. Změřená spektra absorbancí byla zpracována a vyhodnocena v programu UV Probe (Shimadzu).

12.3. Kultivace buněk

Buňky linie HeLa byly kultivovány v CO₂ inkubátoru v kultivačních lahvích ve standardním kultivačním médiu DMEM s 10% fetálním sérem, penicilinem a streptomycinem při teplotě 37 °C a obsahu CO₂ 5 %. Byly pasážovány třikrát týdně za použití standardní trypsinizační procedury (adherentní buňky).

12.4. Nasazení a kultivace buněk pro vybrané experimenty

Buňky linie HeLa byly v kultivační nádobě ztrypsinizovány a spláchnuty médiem do 10ml sterilní plastové zkumavky, stočeny na centrifuze (1000 rpm, 5 min.) Supernatant byl odsát a pelet buněk rozpuštěn kultivačním médiem DMEM na objem 10 ml. Následně byly buňky spočítány v Bürkerově počítací komůrce a naředěny DMEM na požadovanou koncentraci (80 000 buněk/ml). Pro analýzu buněčného cyklu na průtokovém cytometru a pro detekci aktivního fragmentu caspázy 3 průtokovou cytometrií byly naředěné buňky odměřeny po 5 ml do sterilních plastových Petriho misek o průměru 60 mm a kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C a obsahu CO₂ 5 %. Pro imunofluorescenční značení α -tubulinu a imunofluorescenční značení fosfohistonu H3 byly naředěné buňky odměřeny po 2,5 ml do sterilních plastových šestijamkových panelů s vloženým sterilním skleněným krycím sklíčkem v každé jamce a také kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C a obsahu CO₂ 5 %.

12.5. Ovlivnění buněk testovanými látkami pro vybrané experimenty

Po 24 hodinové kultivaci bylo buňkám vyměněno kultivační médium DMEM s rozpuštěnými testovanými látkami o koncentracích 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M myoseverin, 10 a 20 μ M látky 3417, 3419, 3421 a 3422. Takto ošetřené buňky byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C a obsahu CO₂ 5 % v CO₂ inkubátoru.

12.6. Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Přibližně 1×10^6 kultivovaných otrávených buněk linie HeLa bylo sklizeno do 10ml plastové zkumavky, 2x promyty roztokem PBS a zafixováno vychlazeným 70% ethanolem. Po 30 minutách na ledu byly buňky zcentrifugovány (1000g, 5 minut, 4 °C), promyty roztokem PBS a opět stočeny na centrifuze (1000g, 5 minut, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 1 ml PBS, následně bylo přidáno 20 μ l roztoku RNAsy (konečná koncentrace 0,2 mg/ml) a 10 μ l roztoku propidium jodidu (konečná koncentrace 10

µg/ml). Po třiceti minutové inkubaci ve tmě při 4 °C byl obsah zkumavky přepipetován do vialek pro průtokový cytometr, vložen do podavače a analyzován pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta™ SC. Fluorescence DNA nabarvené propidium jodidem byla měřena při 536/617 (ex/em). Buněčný cyklus byl analyzován pomocí programu Multicycle AV for Windows (Phoenix Flow Systems, USA).

12.7. Detekce aktivního fragmentu caspázy 3 průtokovou cytometrií

Postup sklizení je stejný jako u 12.6. Buňky byly zafixovány vychlazeným 90% methanolem. Následovalo blokování nespecifických vazeb protilátky resuspendováním peletu v 1 ml 0,5% BSA/PBS. Poté byly buňky opět stočeny na centrifuze (1000g, 5 minut, 4 °C) a pelet resuspendován ve 100 µl desetkrát naředěného roztoku králičí monoklonální protilátky proti štěpnému fragmentu caspázy 3 značené Alexa Fluor 488 v 0,5% BSA/PBS. Buňky se nechaly inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě ve tmě. Po inkubaci byl k buňkám napipetován 1 ml 0,5% BSA/PBS a buňky byly zcentrifugovány (1000 g, 10 min, 4 °C). DNA byla nabarvena propidium jodidem. Pelet byl resuspendován v 1 ml roztoku obsahující stokrát zředěný PI a padesátkrát zředěnou RNAsu A v 0,5% BSA/PBS. Po třiceti minutové inkubaci ve tmě při 4 °C byl vzorek analyzován pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta™ SC. Fluorescence DNA nabarvené propidium jodidem byla měřena při 536/617 (ex/em) a fluorescence pro Alexa Fluor při 499/519 (ex/em).

12.8. Imunofluorescenční značení α-tubulinu

Buňky kultivované na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech byly promyty 2 ml PBS (5 minut), následně zcentrifugovány (1000 rpm, 230 sekund, 25 °C), a opět promyty 2 ml PBS (5 minut). Následovala fixace vychlazenou směsí methanol:aceton v poměru 1:1. Po 10 minutách v -20 °C byla fixační směs odsáta a buňky rehydratovány přidávkem 2 ml PBS na 10 minut. Dalším krokem bylo blokování pomocí 2,5 ml média DMEM s 10% fetálním sérem na 30 minut. Poté proběhla inkubace s myší primární protilátkou anti-α tubulinu klon DM1A (koncentrace 2 µg/ml) 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly buňky třikrát promyty ve 2 ml PBS, 2 ml PBS-T, 2 ml PBS a inkubovány s kozí sekundární protilátkou GAM-FITC (koncentrace 6,8 µg/ml) 1 hodinu při laboratorní teplotě ve tmě. Poté byly buňky promyty ve 2 ml PBS, 2 ml PBS-T a 2 ml PBS, inkubovány 10 minut v 1 ml roztoku DAPI (koncentrace 5 µg/ml) a opět promyty ve 2 ml PBS, 2 ml PBS-T a 2 ml PBS. V posledním kroku byl vytvořen trvalý preparát nanesením 5 µl mowiolu na podložní

sklíčko, přiklopením krycího sklíčka s buňkami na spodní straně a necháním zatuhnoutí do druhého dne při 4 °C ve tmě. K pořízení fotografií byl použit fluorescenční mikroskop BX50 vybavený digitální kamerou Cool Snap a programy DP controller a DP manager (Olympus).

12.9. Imunofluorescenční značení fosfohistonu H3 (Ser10)

Postup imunofluorescenčního značení fosfohistonu H3 (Ser10) byl téměř totožný s postupem imunofluorescenčního značení tubulinu. Rozdíl byl pouze v použitých protilátkách. Byla použita králičí polyklonální primární protilátka anti-pH3 (Ser10) a kozí sekundární protilátka proti králičí IgG značená Alexa Fluor 488. Pro pořízení fotografií byl opět použit fluorescenční mikroskop BX50 vybavený digitální kamerou Cool Snap a programy DP controller a DP manager.

13. Výsledky

13.1. Rozpustnost testovaných látek

Rozpustnost látek byla měřena jako hodnota absorbance při 450 nm roztoků testovaných látek v příslušném rozpouštědle. Byly testovány látky s kódovým označením 3407, 3419, 3421 i 3422, a to v koncentracích 10, 50 a 100 µM. Jako možná vhodná rozpouštědla byla testována dest. H₂O, 5 mM HCl, 5 mM NaOH a 0,5 mM β-cyklodextrin. Látka je zcela rozpuštěna, je-li hodnota absorbance při 450 nm rovna 0. Za prakticky zcela rozpuštěnou látku jsou brány hodnoty absorbance menší nebo rovny 0,1. Naměřené hodnoty absorbance u testovaných látek jsou uvedeny v Tab. 2.

Z testovaných rozpouštědel se jako nejvhodnější ukázala 5 mM HCl, u které se většina hodnot naměřené absorbance pohybovala pod hodnotou 0,1. Látka 3407 překračovala již při koncentraci 50 µM požadovanou hodnotu absorbance čtyř až pětinasobně, a to u všech testovaných rozpouštědel. Proto byla tato látka po konzultaci s vedoucím bakalářské práce z dalších experimentů vynechána. Jako finální rozpouštědlo látek 3419, 3421 a 3422 byla zvolena 0,1 mM HCl, u které byl ještě proveden kontrolní test rozpustnosti na látce 3419 o koncentraci 100 µM, a to ve třech opakováních. Tyto hodnoty naměřené absorbance jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 2: Hodnoty absorbance při 450 nm roztoků testovaných látek v příslušném rozpouštědle.

Látka	Koncentrace [μM]	Rozpouštědlo			
		dest. H_2O	5 mM HCl	5 mM NaOH	0,5 mM β -cyklodextrin
3407	10	0,015	0,066	0,019	0,028
	50	0,452	0,514	0,372	0,369
	100	1,278	0,982	0,823	0,947
3419	10	0,026	0,003	0,016	0,029
	50	0,319	0,017	0,244	0,280
	100	0,587	0,220	0,672	0,811
3421	10	0,016	0,003	0,008	0,013
	50	0,145	0,052	0,159	0,162
	100	0,897	0,309	0,398	0,684
3422	10	0,000	0,001	0,000	0,000
	50	0,012	0,006	0,007	0,008
	100	0,082	0,058	0,034	0,119

Tab. 3: Hodnoty absorbance při 450 nm látky 3419 o koncentraci 100 μM rozpuštěné v 0,1 mM HCl.

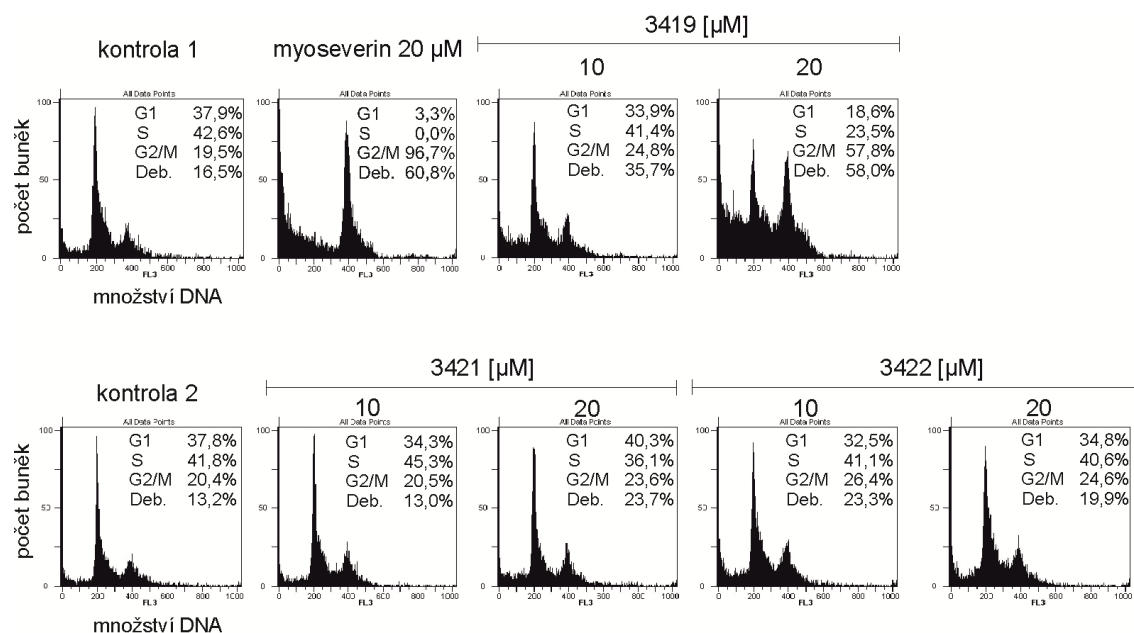
Látka	Koncentrace [μM]	Rozpouštědlo	Měření	Absorbance při 450 nm
3419	100	0,1 mM HCl	1	0,134
			2	0,133
			3	0,128

13.2. Vliv testovaných látek na buněčný cyklus

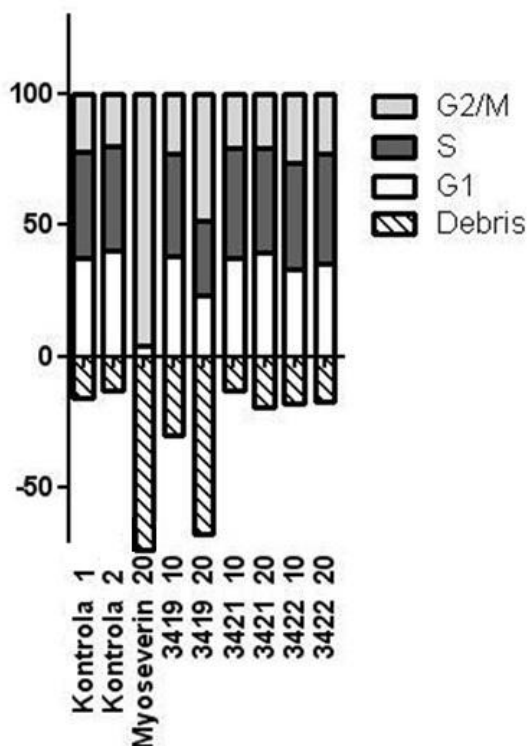
Zjištění vlivu testovaných látek na buněčný cyklus ovlivněných buněk je hlavní experiment celé bakalářské práce. Buňky linie Hela byly ovlivněny myoseverinem o koncentraci 20 μM a látkami 3419, 3421 a 3422 o koncentracích 10 a 20 μM . Látka 3407 již v tomto experimentu nebyla testována kvůli velmi nízké rozpustnosti. Kontrolní buňky nebyly ovlivněny žádnou látkou. Po 24 hod. inkubaci byla celková DNA

zafixovaných buněk nabarvena pomocí PI, který se interkaluje do DNA. PI je fluorescenční barvivo, které po ozáření světlem o vlnové délce 536 nm emituje záření o vlnové délce 617 nm. Na základě rozdílného obsahu DNA během buněčného cyklu (v S fázi dochází k replikaci DNA a k postupnému zvyšování jejího množství až na dvojnásobek) byla na průtokovém cytometru detekována rozdílná intenzita signálu PI. Data získaná z průtokového cytometru byla vyhodnocena pomocí programu Multicycle AV for Windows. Ze získaných údajů byly vytvořeny histogramy (viz. Obr. 2) udávající procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu v závislosti na koncentraci látky, kterou byly ovlivněny.

Z naměřených dat vyplývá, že u buněk ovlivněných myoseverinem došlo k výraznému nárůstu počtu buněk v G_2/M fázi buněčného cyklu a prudkému poklesu buněk v G_1 fázi. Z testovaných derivátů myoseverinu pouze látka 3419 o koncentraci 20 μM vykazovala podobný účinek na buněčný cyklus jako myoseverin (tedy výrazný nárůst počtu buněk v G_2/M fázi a pokles v G_1 fázi). Látky 3421, 3422 o koncentracích 10 μM a 20 μM a výše zmíněná látka 3419 o koncentraci 10 μM na buněčný cyklus vliv neměly. Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo přibližně stejné jako u kontrolních buněk. Po konzultaci s vedoucím bakalářské práce byly látky 3421 a 3422 z dalších experimentů vynechány. Analýza vlivu testovaných látek na buněčný cyklus byla provedena ve třech opakováních. Kvantifikace výsledků je uvedena na Obr. 3.



Obr. 2: Zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu HeLa buněk ovlivněných testovanými látkami.



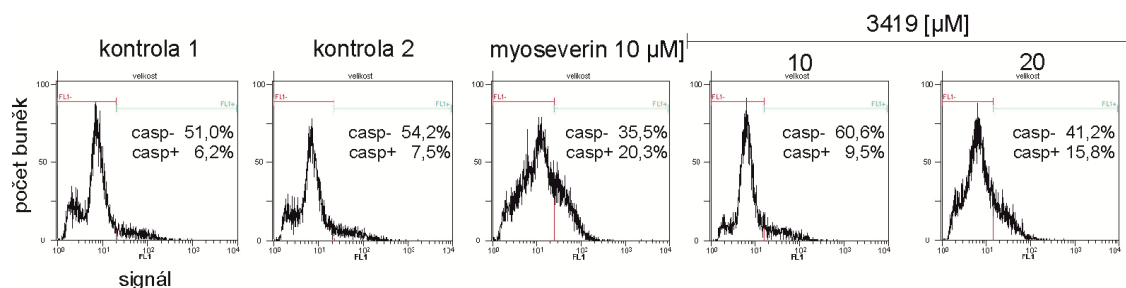
Obr. 3: Kvantifikace analýzy buněčného cyklu HeLa buněk ovlivněných testovanými látkami.

13.3. Detekce aktivního fragmentu caspázy 3

Cílem tohoto experimentu bylo prokázat, že látky způsobující G₂/M blok buněčného cyklu indukují buněčnou apoptózu. Caspáza 3 je důležitá cysteinproteáza uplatňující se v signální kaskádě procesu apoptózy (viz. kapitola 7.1.1. Caspázy a caspáza 3). Její detekce se využívá jako apoptotického markeru.

Buňky linie Hela byly ovlivněny myoseverinem o koncentraci 10 μM a látkou 3419 o koncentraci 10 a 20 μM. Látky 3407, 3421 a 3422 v tomto experimentu nebyly testovány. Po 24 hod. inkubaci byl aktivní fragment caspázy 3 označen pomocí králičí monoklonální protilátky proti štěpnému fragmentu caspázy 3 značené Alexa Fluor 488. Na průtokovém cytometru byla detekována rozdílná intenzita signálu Alexa Fluor 488. Data získaná z průtokového cytometru byla vyhodnocena a ze získaných údajů byly vytvořeny histogramy (viz. Obr. 4) udávající procentuální zastoupení buněk s casp+ a casp-signálem.

U HeLa buněk ovlivněných 10 μM myoseverinem došlo k nárůstu počtu casp+ buněk o více jak 12 %. Podobný účinek vykazovala i látka 3419, nicméně až při dvojnásobné koncentraci (20 μM) vůči myoseverinu.



Obr. 4: Procentuální zastoupení HeLa buněk s casp+ a casp- signálem.

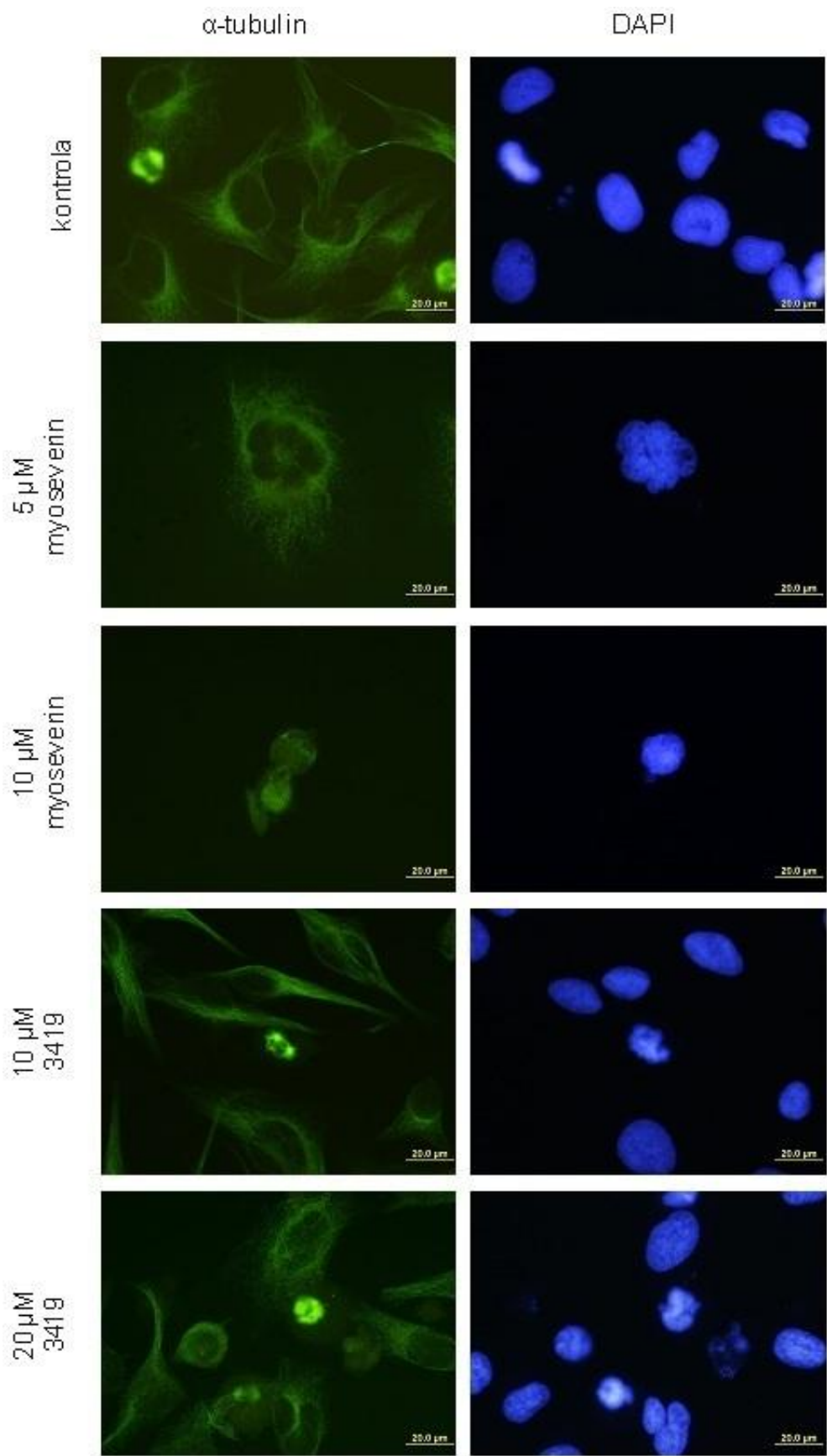
13.4. Vliv testovaných látek na mikrotubulární systém

Mikrotubuly zastávají v buňce velmi důležité a nezastupitelné funkce (viz. kapitoly 6.1.1. Mikrotubuly a 6.1.1.2. Mikrotubuly a mitotické dělicí vřeténko). Cílem tohoto experimentu bylo zjištění, zdali testované látky ovlivňují rozložení a polymeraci mikrotubulů v buňce. K vizualizaci mikrotubulů byla použita metoda imunofluorescenčního značení.

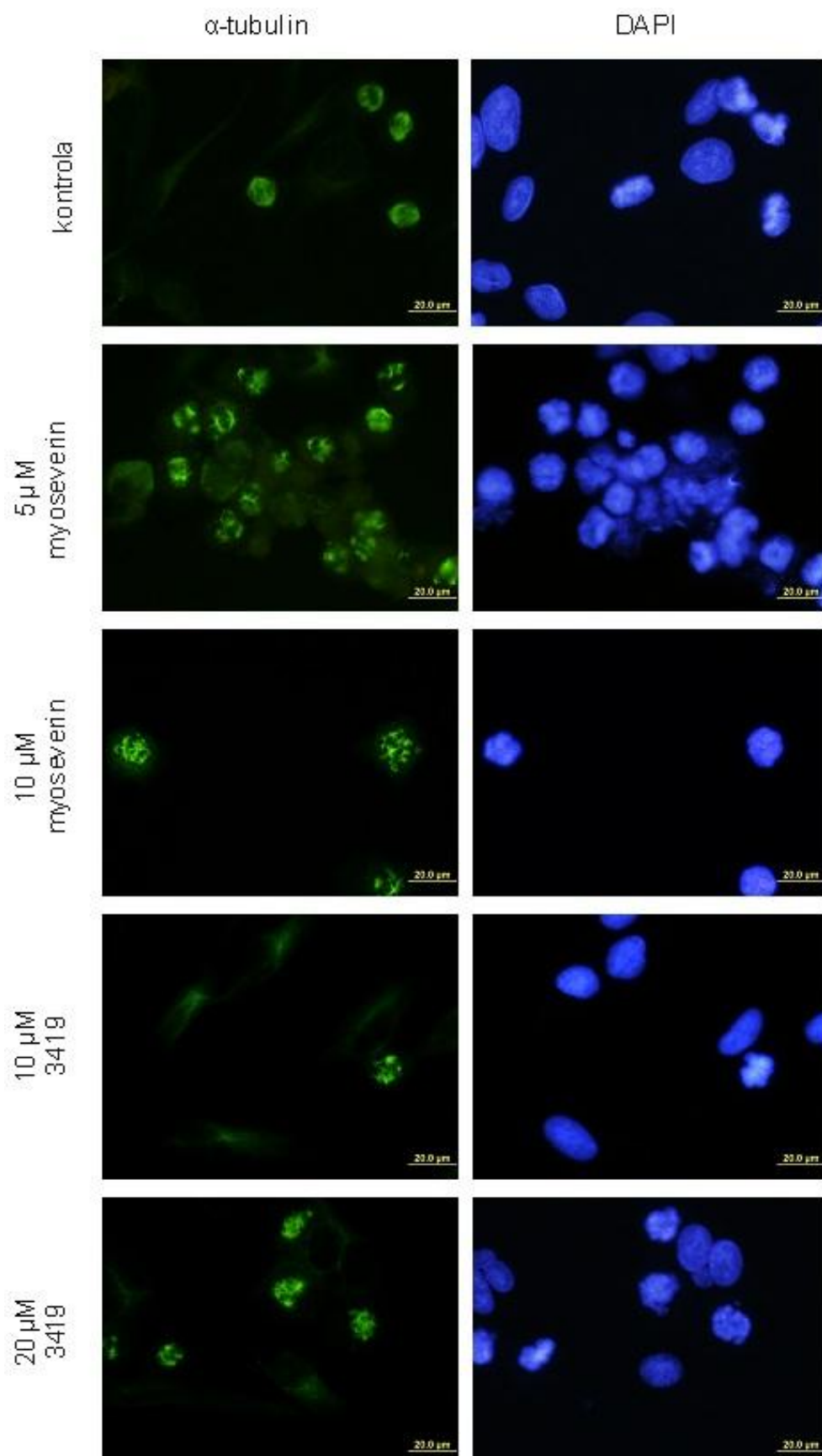
Buňky linie Hela byly ovlivněny myoseverinem o koncentraci 5 a 10 μM a látkou 3419 o koncentraci 10 a 20 μM . Látky 3407, 3421 a 3422 nebyly v tomto experimentu testovány. Po 24 hod. inkubaci byly mikrotubuly inkubovány s myší primární protilátkou anti- α tubulinu klon DM1A a poté s kozí sekundární protilátkou GAM-FITC. Jádra byla nabarvena pomocí DAPI. Mikrotubulární systém a jádra byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem BX50 vybaveným digitální kamerou Cool Snap. Fotografie byly pořízeny a zpracovány pomocí programů DP controller a DP manager. Vizualizace mikrotubulárních vláken v ovlivněných buňkách je na Obr. 5. Na Obr. 6 jsou vizualizovaná mitotická vřeténka.

U kontrolních buněk na Obr. 5 lze pozorovat zeleně nabarvená kompaktní dlouhá vlákna mikrotubulů rozprostírající kolem jádra buňky a zasahující až k cytoplazmatické membráně. U buněk ovlivněných myoseverinem o koncentraci 5 μM , lze pozorovat destabilizaci systému mikrotubulů a tvorbu drobných kulovitých útvarů. Jedná se o rozpadlé fragmenty mikrotubulových vláken. U 10 μM myoseverinu je proces destabilizace mikrotubulů ještě průkaznější. Podobný účinek lze pozorovat i u buněk ovlivněných látkou 3419. Destabilizace mikrotubulů je však průkazná až při

koncentraci 20 μM . Na Obr. 6 lze u buněk ovlivněných myoseverinem pozorovat ve srovnání s kontrolou nárůst počtu buněk v mitóze. Tyto mitotické buňky obsahují multipolární dělicí vřeténka. Celkový počet buněk se s rostoucí koncentrací myoseverinu snižuje. Podobné účinky na HeLa buňky lze pozorovat i u látky 3419 a to už při koncentraci 10 μM .



Obr. 5: Vizualizace mikrotubulárního systému v buňkách HeLa ovlivněných testovanými látkami.



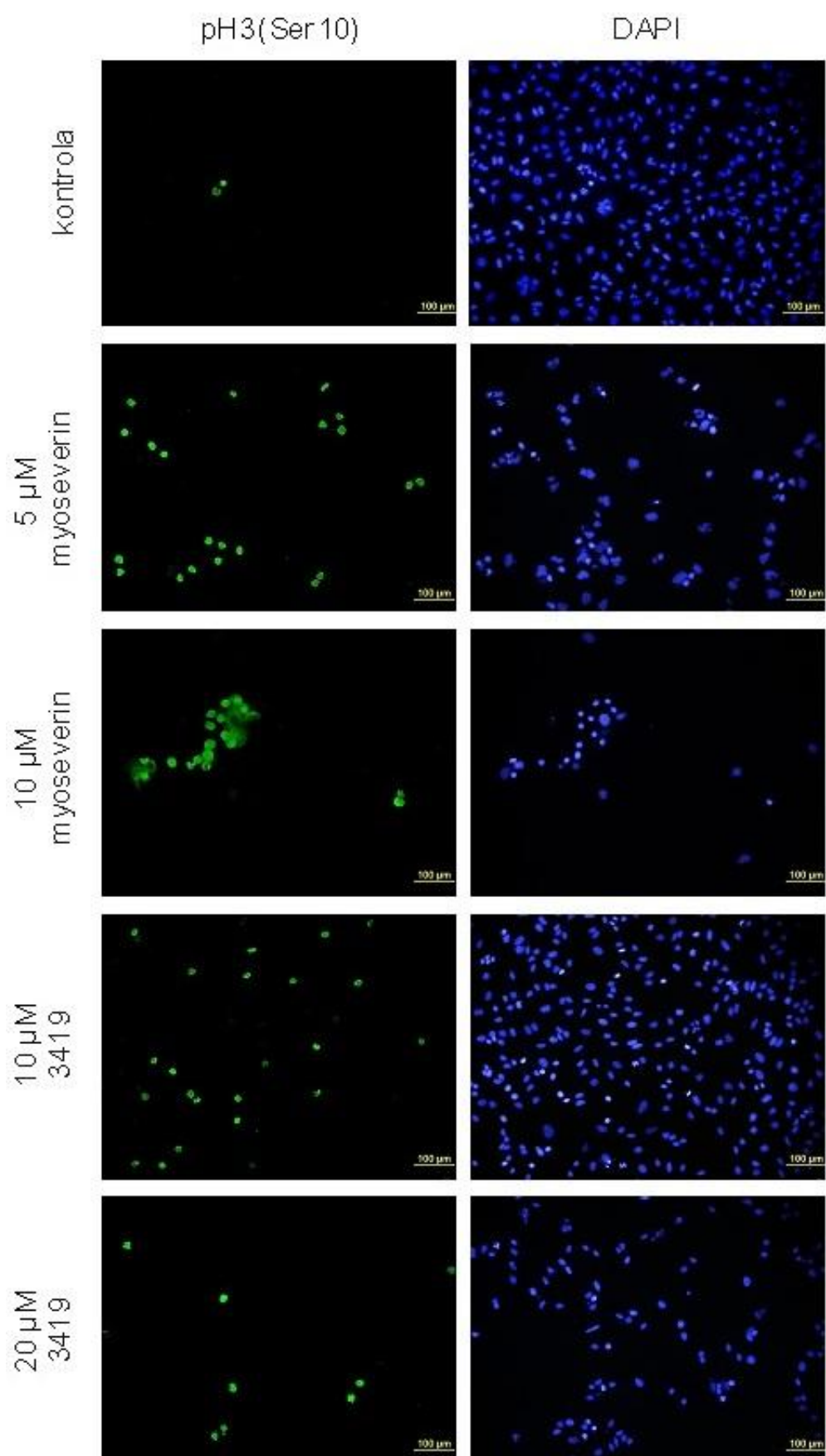
Obr. 6: Vizualizace mitotických vřetének v buňkách HeLa ovlivněných testovanými látkami.

13.5. Imunofluorescenční značení fosfohistonu H3 (Ser10):

K rozlišení, zdali u buněk ovlivněných testovanými látkami dochází k bloku buněčného cyklu v G₂ fázi anebo až během mitózy, byl do bakalářské práce zařazen experiment detekující fosforylovaný histon H3 na Ser10. Histon H3 je protein vytvářející reverzibilní komplexy s DNA (viz. kapitola 8. Histony a histon H3). Jeho fosforylace je nezbytná pro kondenzaci chromatinu na počátku mitózy, a proto je detekce jeho fosforylace často využívána jako mitotického markeru. K vizualizaci fosfohistonu H3 (Ser10) v této bakalářské práci byla opět použita metoda imunofluorescenčního značení.

Stejně jako u testování vlivu látek na mikrotubulární systém HeLa buněk byly i v tomto experimentu HeLa buňky ovlivněny myoseverinem o koncentraci 5 a 10 μM a látkou 3419 o koncentraci 10 a 20 μM. Po 24 hod. inkubaci byly buňky inkubovány s polyklonální primární protilátkou anti-pH3 (Ser10) a poté s kozí sekundární protilátkou proti králičí IgG značenou Alexa Fluor 488. Pozorování fluorescenčním mikroskopem a pořízení snímků bylo provedeno stejně jako v bodu 13.4. Vizualizace buněk s fosforylovaným histonem H3 je na Obr. 7.

Výsledek experimentu ukazuje, že u buněk ovlivněných myoseverinem došlo vůči kontrole k razantnímu nárůstu počtu buněk s fosforylovaným histonem H3 (Ser 10). U kontroly lze pozorovat pouze dvě pozitivní buňky. Zvyšující se koncentrace myoseverinu také způsobuje úbytek celkového počtu buněk. K nárůstu buněk s fosforylovaným histonem H3 došlo i u buněk ovlivněných látkou 3419 a to už při koncentraci 10 μM. Stejně jako u myoseverinu způsobuje zvyšující se koncentrace látky 3419 úbytek celkového počtu buněk.



Obr. 7: Vizualizace HeLa buněk s fosforylovaným histonem H3 (Ser 10).

14. Diskuze

Cílem praktické části bakalářské práce bylo otestovat účinek nově připravených derivátů myoseverinu na nádorové linii adherentních buněk HeLa odvozených od karcinomu děložního čípku. Jednalo se o pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny s různými substituenty v pozicích C5 a C7 (viz. Obr.1). Látky měly kódové označení 3407, 3419, 3421, 3422 a byly připraveny v Izotopové laboratoři Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Prvním úkolem praktické části bakalářské práce bylo zjistit vhodné rozpouštědlo, ve kterém by mohly být testované látky rozpuštěny a přidány k HeLa buňkám. Metodou měření absorbance při 450 nm roztoků rozpuštěných látek v příslušném rozpouštědle se jako nejvhodnější rozpouštědlo ukázala 5 mM HCl. Po konzultaci s vedoucím bakalářské práce byla jako finální rozpouštědlo zvolena 0,1 mM HCl a to i přes to, že hodnoty absorbance byly mírně vyšší než hraniční hodnota 0,1 (viz. Tab. 3). Látka 3407 nebyla rozpustná v žádném z testovaných rozpouštědel, a proto v dalších experimentech již nebyla použita. Její testování zde bylo ukončeno.

Mechanismus působení myoseverinu na buněčný cyklus nádorových buněk je již relativně dobře popsán a prostudován. Myoseverin se váže na tubulinové podjednotky a způsobuje tak destabilizaci mikrotubulárního systému buňky, což mimo jiné vede i k tvorbě poškozených multipolárních dělicích vřetének. Takto chybně sestavená dělicí vřeténka jsou rozpoznána kontrolním bodem buněčného cyklu dohlížejícího na správnou funkci vřeténka a buňka je nasměrována k provedení apoptózy (Rosania et al., 2000; Chang et al., 2001; Kryštof et al., 2006).

Hlavním bodem při stanovování biologických a biochemických účinků testovaných pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů bylo určení, zda testované látky mají podobný vliv na buněčný cyklus HeLa buněk jako myoseverin. U myoseverinu o koncentraci 20 μ M byl po 24 hodinové inkubaci podle očekávání pozorován markantní G₂/M blok (97,7 %). Podobný účinek byl popsán i v jiných studiích (Rosania et al., 2000). Po 12 hodinové inkubaci vykazovalo 62,5 % HeLa buněk ošetřených 10 μ M myoseverinem výrazný G₂/M blok (Kryštof et al., 2006). Z testovaných látek pouze látka 3419 o koncentraci 20 μ M způsobila po 24 hodinové inkubaci pokles počtu buněk v G₁ fázi a akumulaci buněk v G₂/M fázi (57,8%). U koncentrace 10 μ M byl nárůst počtu buněk v G₂/M vůči kontrole minimální. Z výsledku je patrné, že má látka 3419 při stejné koncentraci (20 μ M) jako myoseverin zhruba poloviční účinnost. Látky 3421 a 3422 neměly na buněčný cyklus HeLa buněk žádný vliv, a proto zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu odpovídalo kontrole. Z tohoto důvodu a po konzultaci s vedoucím bakalářské práce již tyto látky v dalších experimentech nebyly

použity. Analýza vlivu testovaných látek na buněčný cyklus byla provedena ve třech opakováních, aby se předešlo náhodné chybě. Všechna měření potvrdila, že jediným derivátem myoseverinu, který má vliv na buněčný cyklus HeLa buněk, je látka 3419 způsobující G_2/M blok. Neúčinnost ostatních připravených derivátů lze vysvětlit jejich odlišnou strukturou. Neúčinná látka 3422 postrádá methoxybenzyl vázaný přes amino skupinu na pozici C5. Místo toho je zde navázán pouze atom síry. Předchozí studie jiných derivátů myoseverinu prokázaly, že pro inhibici polymerace mikrotubulů a tedy i zablokování ovlivněných buněk v G_2/M fázi je nutná přítomnost obou methoxybenzylů (Rosania et al. 2000). Účinnost látky 3419 a neúčinnost látky 3421 bude nejspíše souviset s odlišným připojením methoxybenzylových skupin na pozicích C5 a C7 (viz. Obr. 1). Pro objasnění, jaké konkrétní molekulární mechanismy způsobily u buněk ovlivněných látkou 3419 zablokování v G_2/M fázi, by bylo třeba provést řadu dalších experimentů.

Myoseverin u ovlivněných buněk navozuje apoptózu. Předpokládalo se, že tomu tak bude i u látky 3419. Byl proveden experiment detekce aktivního fragmentu caspázy 3, který slouží k identifikaci apoptotických buněk. U myoseverinu bylo potvrzeno, že u buněk způsobuje apoptózu. Při koncentraci 10 μM byl počet apoptotických buněk o více jak 12 % větší než u kontroly. Podobný výsledek byl zjištěn i u látky 3419 o koncentraci 20 μM . Počet apoptotických buněk se vůči kontrole zvýšil o více než 8 %.

Z analýzy vlivu látky 3419 na buněčný cyklus bylo zjištěno, že stejně jako myoseverin způsobuje tato látka významný G_2/M blok. Pro odlišení, zda k bloku dochází v pozdní G_2 fázi nebo až v mitóze, byla provedena imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H3 (Ser10). Z výsledku bylo patrné, že látka 3419 stejně jako myoseverin blokuje buněčný cyklus až v mitóze.

Všechny provedené experimenty nasvědčovaly tomu, že látka 3419 má stejný mechanismus účinku jako myoseverin, tedy že se váže na tubulinové podjednotky a destabilizuje mikrotubulární systém buňky. K potvrzení tohoto předpokladu bylo provedeno imunofluorescenční barvení α -tubulinu. Výsledky potvrdily, že myoseverin, a to už při koncentraci 5 μM , způsobuje destabilizaci mikrotubulů a tvorbu multipolárních dělicích vřetének. U látky 3419 byly pozorovány stejné výsledky, tedy destabilizace mikrotubulů a tvorba multipolárních dělicích vřetének, nicméně až při vyšších koncentracích (10 a 20 μM).

15. Závěr

V současnosti probíhá intenzivní výzkum a syntéza látek, které by se uplatnily v boji s nádorovými onemocněními. Jednou ze skupin takových látek jsou i 2,6,9-trisubstituované puriny. Relativně nedávno objeveným 2,6,9-trisubstituovaným purinem je látka nazvaná myoseverin. Myoseverin spadá do skupiny látek označovaných jako mitotické jedy, které narušují proces dělení buněk. Mechanismus účinku myoseverinu na nádorové buňky je již delší dobu znám a dobře popsán v několika studiích.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit účinek nově připravených derivátů myoseverinu na nádorovou buněčnou linii HeLa. Z předložených derivátů bylo několika různými experimenty zjištěno, že pouze látka s kódovým označením 3419 má stejný vliv na HeLa buňky (adherentní buňky odvozené od karcinomu děložního čípku) jako myoseverin. Stejně jako myoseverin způsobuje výrazný G₂/M blok buněčného cyklu. Další experimenty prokázaly, že látka 3419 způsobuje destabilizaci mikrotubulárního systému buňky a tvorbu multipolárních dělicích vřetének. Takto chybně sestavená dělicí vřeténka jsou rozpoznána kontrolním bodem buněčného cyklu, který spustí apoptózu.

Látka 3419 však pravděpodobně nemá budoucí potenciální uplatnění v léčbě nádorových onemocnění ani využití pro další výzkum, neboť její účinnost vůči myoseverinu byla na nádorové buňky HeLa poloviční.

Knihovna 2,6,9-trisubstituovaných purinů nicméně představuje obrovský zdroj jiných látek, které mohou mít lepší biologické vlastnosti než v současnosti používané léky proti rakovině.

16. Seznam použitých zkratek

ATP	Adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CASP	Caspáza
CDK	Cyclin-dependent kinase (cyklin-dependentní kináza)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid (ethylenglykoltetraoctová kyselina) enzymu)
FS	Fetální sérum
GAM-FITC	Kozí sekundární protilátka proti myší IgG značená fluoresceinem
GDP	Guanosine diphosphate (guanosindifosfát)
GTP	Guanosine triphosphate (guanosintrifosfát)
HIV	Human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
IC50	50% inhibitory concentration (koncentrace způsobující inhibici 50 % buněk)
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PBS-T	Phosphate Buffered Saline s Tweenem 20 (fosfátový pufr s Tweenem 20)
PI	Propidium ioide (propidium jodid)
TMRE	tetramethylrhodamin ethyl ester

17. Seznam použité literatury

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007): Molecular Biology of the Cell, 5th edition. Garland Science, 513-591.

Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996): Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. Cell press, 87 (2): 171.

Arcamone F., Bernardi L., Giardino P., Patelli B., Marco A., Casazza A.M., Pratesi G., Reggiani P. (1976): Synthesis and antitumor activity of 4-demethoxydaunorubicin, 4-demethoxy-7,9-diepidaunorubicin, and their beta anomers. Cancer Treatment Reports, 60 (7): 829-834.

Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C. (1969): Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesius*. Biotechnology and Bioengineering, 11 (6): 1101-1110.

Bonfante V., Bonadonna G., Villani F., Martini A. (1980): Preliminary clinical experience with 4-epidoxorubicin in advanced human neoplasia. Recent results in cancer research, 74: 192-199.

Bradbury E.M. (1992): Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. Bioessays, 14 (1): 9-16.

Brues A.M., Cohen A. (1936): Effects of colchicine and related substances on cell division. Biochemical Journal, 30 (8): 1363-1368.

Champoux J.J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annual Review of Biochemistry, 70: 369-413.

Cooper G.M. (2000): The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition. American Society for Microbiology, 238-276.

Costa G., Hreshchyshyn M.M., Holland J.F. (1962): Initial clinical studies with vincristine. Cancer Chemotherapy Reports, 24: 39-44.

Cramblett H.G. (1959): Experiences with cyclophosphamide in treatment of childhood tumors. *Antibiotics Annual*, 7: 966-969.

De Azevedo W.F., Leclerc S., Meijer L., Havlíček L., Strnad M., Kim S.H. (1997): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry*, 243: 518-526.

De la Barre A. E., Gerson V., Gout S., Creaven M., Allis C.D., Dimitrov S. (2000): Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *EMBO Journal*, 19 (3): 379-91.

Esyanti R.R., Wulansari A., Pandiangan D. (2008): The influence of immobilization on cell growth and catharanthine production in the cell aggregate culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Proceeding of 2nd International Conference on Mathematics and Natural Sciences (ICMNS)*, 172-177.

Extra J.M., Rousseau F., Culine S., Giacchetti S., Madelaine I., Marty M. (1991): New cytotoxic drugs in clinical development. *Nouvelle revue française d'hématologie*, 33 (6): 451-456.

Fischer P.M., Endicott J., Meijer L. (2003): Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Progress in Cell Cycle Research*, 5: 235-248.

Fletcher D.A., Mullins R.D. (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463 (7280): 485-492.

Frei E., Franzino A., Shnider B.I., Costa G., Colsky J., Brindley C.O., Hosley H., Holland J.F., Gold G.L., Jonsson U. (1961): Clinical studies of vinblastine. *Cancer Chemotherapy Reports*, 12: 125-129.

Ganguly A., Yang H., Cabral F. (2010): Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity. *Molecular cancer therapeutics*, 9 (11): 2914-2923.

Gellhorn A., Hyman G.A., Ulzmann J.E. (1956): Chlorambucil in treatment of chronic lymphocytic leukemia and certain lymphomas. *The Journal of the American Medical Association*, 162 (3): 178-183.

- Garret M.D. (2001): Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81: 515-522.
- Gerald K. (2005): *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons, 355.
- Goto H., Tomono Y., Ajiro K., Kosako H., Fujita M., Sakurai M., Okawa K., Iwamatsu A., Okigaki T., Takahashi T., Inagaki M. (1999): Identification of a Novel Phosphorylation Site on Histone H3 Coupled with Mitotic Chromosome Condensation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 25543-25549.
- Gurtu V., Kain S.R., Zhang G.H. (1997): Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry*, 251: 98-102.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40: 408-412.
- Howard J., Hyman A.A. (2007): Microtubule polymerases and depolymerases. *Current Opinion in Cell Biology*, 19 (1): 31-35.
- Humke E.W., Ni J., Dixit V.M. (1998): ERICE, a novel FLICE-activatable caspase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (25): 15702-15707.
- Chang Y.T., Gray N.S., Rosania G.R., Sutherlin D.P., Kwon S., Norman T.C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P.G. (1999): Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chemistry and Biology*, 6 (6): 361-375.
- Chang Y.T., Wignall S.M., Rosania G.R., Gray N.S., Hanson S.R., Su A.I., Merlie J. Jr., Moon H.S., Sangankar S.B., Perez O., Heald R., Schultz P.G. (2001): Synthesis and biological evaluation of myoseverin derivatives: microtubule assembly inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(26): 4497-4500.
- Idziorek T., Estaquier J., De Bels F., Ameisen J.C. (1995): YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods*, 185: 249-258.

Jordan M.A., Wilson L. (2004): Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4 (4): 253-265.

Kavallaris M. (2010): Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*, 10: 194-204.

King R.C., Stansfield W.D., Mulligan P.K (2006): *A Dictionary of Genetics*, 7th edition. Oxford University Press, 378-415.

Kirchner H.H., Engert A., Diehl V. (1984): Experimental chemotherapy of heterotransplanted Hodgkin- and non-Hodgkin-lymphoma cell lines in nude mice. *Behring Institute Mitteilungen*, (74): 329-336.

Klener P., Abrahámová J., Petruželka L, Žaloudík J., Mališ J., Matějovský Z., Fait V. (2002): *Klinická onkologie*. Galén/Karolinum Praha, 56-85.

Kryštof V., Uldrijan S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets*, 11: 291-302.

Kryštof V., Moravcová D., Paprskářová M., Barbier P., Peyrot V., Hlobilková A., Havlíček L., Strnad M. (2006): Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-d]pyrimidine analogues of myoseverin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (12): 1405-1411.

Lee M.G., Nurse P. (1987): Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327: 31-35.

Legraverend M., Grierson D.S. (2006): The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 3987-4006.

Malumbres M, Barbacid M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews*, 9: 153-166.

Mitchison T., Kirschner M. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312: 237-242.

Nurse P., Bissett Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292: 558-560.

O'Reilly C.M., Fogarty K.E., Drummond R.M., Tuft R.A., Walsh J.V.Jr. (2004): Spontaneous mitochondrial depolarizations are independent of SR Ca²⁺ release. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286: 1139-1151.

Ormerod M.G. (1994): *Flow Cytometry: A Practical Approach*, 2nd edition. IRL Press at Oxford University Press, 68-114.

Papac R., Galton D.A., Till M., Wiltshaw E. (1958): Preliminary clinical trial of p-di-2-chloroethyl-amino-L-phenylalanine (CB 3025, melphalan) and of di-2-chloroethyl methanesulfonate (CB 1506). *Annals of New York Academy of Science*, 68 (3): 1126-1127.

Pazdur R., Wagman L.D, Camphausen K.A., Hoskins W.J (2008): *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology*. UBM Medica, online edition, 154-179.

Petružálek L., Konopásek B. (2003): *Klinická onkologie*. Praha Karolínium, 274.

Porter A.G., Janicke R.U. (1999): Emerging role of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6: 99-104.

Reeve J.N., Bailey K.A., Li W.T., Marc F., Sandman K., Soares D.J. (2004): Archaeal histones: structures, stability and DNA binding. *Biochem Society Transactions*, 32: 227-230.

Rosania G.R., Chang Y.T., Perez O., Sutherlin D., Dong H., Lockhart D.J., Schultz P. G. (2000): Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects. *Nature Biotechnology*, 18 (3): 304-308.

Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. (1999): Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. *The American Journal of Medicine*, 107 (5): 489-506.

Salvesen G.S. (2002): Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differentiation*, 9 (1): 3-5.

Saville M.W., Lietzau J., Pluda J.M., Wilson W.H., Humphrey R.W., Feigel E., Steinberg S.M., Broder S., Yarchoan R., Odom J. (1995): Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel. *The Lancet*, 346: 26-28.

Senderowicz A.M. (1999): Flavopiridol: The First Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor in Human Clinical Trials. *Investigational New Drugs*, 17: 313-320.

Senderowicz A.M., Sausville E.A. (2000): Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 376-387.

Shen X., Yu L., Weir J.W, Gorovsky M.A. (1995): Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*, 82 (1): 47-56.

Silvestriny R., Gaetani M. (1963): Action of daunomycin on the nuclei metabolism of Ehrlich ascites tumor. *Tumori, Journal of Experimental and Clinical Oncology*, 49: 389-97.

Sládek Z., Ryšánek D., Faldyna M. (2001): Light Microscopic and Flow Cytometric Detection of Apoptosis and Necrosis of Neutrophils in the Mammary Gland of the Virgin Heifer. *Acta Veterinaria Brno*, 70: 149-155.

Strahl B.D, Allis C.D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403: 41-5.

Teicher B.A., Lazo J.S., Sartorelli A.C. (1981): Classification of Antineoplastic Agents by their Selective Toxicities toward Oxygenated and Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Research*, 41 (1): 73-81.

Thompson C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-62.

Umezawa H. (1965): Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5: 1079-1085.

Underberg W.J., Goossen R.M., Smith B.R., Beijnen J.H. (1990): Equilibrium kinetics of the new experimental anti-tumour compound SK&F 104864-A in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8: 681-683.

Van Hooser A., Goodrich D.W., Allis C.D., Brinkley B.R., Mancini M.A. (1998): Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science*, 111 (23): 3497-3506.

Vermes I., Haanen C., Steffensnacken H., Reutelingsperger C. (1995): A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin-V. *Journal of Immunological Methods*, 184: 39-51.

Veselý J., Havlicek L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S. (1994): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal Biochemistry*, 224 (2): 771-786.

Walczak C.E., Heald R. (2008): Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function. *International Review of Cytology*, 265: 111-158.

Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D. (1988): Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology*, 107 (4): 1437-1448.

Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P., McPhail A.T. (1971): Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93 (9): 2325-2327.

Weisenberg R.C. (1972): Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science*, 177: 1104-1105.

Wyllie A.H. (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284: 555-556.

Yang H., Ganguly A., Cabral F. (2010): Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlate with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (42): 32242-32250.