

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Cytostatický efekt nostatinu A a jeho přírodních  
analogů na buněčnou linii HeLa**

Diplomová práce

**Kateřina Vicková**

Školitel: RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2017

Vicková, K., 2017: Cytostatický efekt nostatinu A a jeho přírodních analogů na buněčnou linii HeLa. [The cytostatic effect of the nostatin A and its naturally occurred structural analogues against HeLa cell line. Mgr. Thesis, in Czech.] – 65 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Cyanobacterial secondary metabolites are a rich source of bioactive compounds with potential utilization in pharmacology. The aim of this study was to evaluate the effect of the novel compound nostatin A isolated from the cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*. Project was focused on the extraction, purification and characterization of the cytostatic effect caused by this novel compound and its naturally occurred structural analogues. The cytostatic activity of nostatin A and its analogs was evaluated in HeLa cell line. Experiments based on microscopy, flow cytometry and HPLC-HRMS techniques were performed in order to clarify the cytostatic effect of nostatin A in HeLa cells and its mechanism of the action.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 13. 12. 2017.

.....

Kateřina Vicková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mém školiteli Pavlu Hrouzkovi za jeho odborný dohled a nakažlivý optimismus, který si zachoval i ve chvílích, kdy se tak úplně nedařilo. Dále pak Kateřině Voráčové, která mi byla vždy nápomocná ve věcech týkajících se buněčných experimentů. Velký dík patří vůbec všem lidem z laboratoře řasové biotechnologie za vytváření příjemného pracovního kolektivu.

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Přírodní látky v léčbě nádorových onemocnění .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Mechanismy působení přírodních látek vůči nádorovým buňkám .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Buněčný cyklus .....	5
1.2.2 Mitochondrie .....	7
<b>1.3 Sinice jako zdroj nových látek k léčbě nádorových onemocnění .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Apratoxiny.....	11
1.3.2 Cryptofyciny.....	13
1.3.3 Dolastatiny .....	14
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materiály a metody .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Chemikálie .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Izolace NosA a jeho přírodních analogů, teplotní stabilita NosA .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Kultivace sinicové biomasy.....	19
3.2.2 Příprava surového extraktu ze sinicové biomasy .....	19
3.2.3 Vlastní izolace NosA a jeho přírodních analogů.....	19
3.2.4 Analýzy prováděné pomocí HPLC-HRMS .....	20
3.2.5 Teplotní stabilita NosA .....	20
<b>3.3 Experimenty na buněčných liniích .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Kultivace buněk in vitro, příprava buněk na experiment .....	21
3.3.2 MTT test.....	21
3.3.3 Časoběrná mikroskopie .....	22
3.3.4 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie .....	22
3.3.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu .....	23
3.3.6 Distribuce NosA v médiu/ buňkách .....	24
3.3.7 Odmývací a trypsinizační experimenty .....	24
3.3.8 Experimenty s RO-3306.....	24
3.3.9 Měření množství ATP v čase .....	25
3.3.10 Fluorescenční barvení mitochondrií.....	25
3.3.11 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A.....	26
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Izolace NosA a jeho přírodních analogů .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku .....	27
4.1.2 Gelová chromatografie .....	29
4.1.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	30

4.2 Teplotní stabilita NosA .....	33
4.3 Stanovení IC <sub>50</sub> NosA a jeho přírodních analogů.....	34
4.4 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA .....	38
4.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu .....	39
4.6 Distribuce NosA v kultivačním médiu/buňkách.....	41
4.7 Odmývací a trypsinizační experimenty .....	42
4.8 Experimenty s RO-3306.....	45
4.9 Měření množství ATP v čase .....	46
4.10 Fluorescenční barvení mitochondrií.....	47
4. 11 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A .....	48
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>51</b>
5.1 Izolace a struktura NosA a jeho analogů .....	51
5.2 Teplotní stabilita NosA .....	52
5.3 IC <sub>50</sub> NosA a jeho přírodních analogů .....	52
5.4 Analýza buněčného cyklu .....	53
5.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu .....	54
5.6 Distribuce NosA v médiu/ buňkách .....	54
5.7 Odmývací a trypsinizační experimenty .....	55
5.8 Experimenty s RO-3306.....	55
5.9 Fluorescenční barvení mitochondrií.....	56
5.10 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A .....	57
<b>6. Závěr .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Použitá literatura.....</b>	<b>59</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Přírodní látky v léčbě nádorových onemocnění

Nádorové bujení je příčinou různorodé skupiny rakovinných onemocnění, jejichž společným znakem je nekontrolované dělení určité populace buněk. V případě maligního nádoru mají nádorové buňky navíc schopnost prorůst do okolní tkáně a metastazovat z primárního ložiska do jiných orgánů. V Evropě a Spojených státech amerických představují nádorová onemocnění, hned po kardiovaskulárních chorobách, nejčastější příčinu úmrtí. Mezi nejběžnější typy nádorů v Evropě patří kolorektální karcinom, karcinom prsu, karcinom prostaty a karcinom plic (American Cancer Society, 2016).

Přes významné pokroky v léčbě jsou nádorová onemocnění stále spojena s vysokou mortalitou. V roce 2016 bylo ve Spojených státech amerických diagnostikováno 1 688 780 nových případů a zhruba 600 920 pacientů na nádorové onemocnění zemřelo (Siegel et al., 2016).

V současné době došlo ke značným posunům v léčbě nádorových onemocnění, ať už jde o chirurgické výkony, radioterapii, chemoterapeutika či kombinaci chemoterapie a hormonální terapie s imunoterapií (Mullard, 2015). Přetrvávajícím problémem pro léčbu je však značná heterogenita subpopulace nádorových buněk a vznik rezistentní buněk neodpovídajících na cytotoxickou chemoterapii a/nebo pro-apoptické stimuly. Z hlediska výzkumu si tato situace žádá hledání nových léčebných strategií a sloučenin pro efektivnější terapii (Ruiz-Torres et al., 2017).

V uplynulých dvaceti letech byl hlavní přístup farmaceutického průmyslu k vývoji nových léčiv založen na kombinatoriální chemii. Byly využívány především metody organické syntézy sloužící k výrobě velkého počtu analogů chemických sloučenin se známým efektem působení. I přes vyšší rychlost získávání nových sloučenin však posun od tradiční ke kombinatorické syntéze nepřinesl kýžený výsledek, tj. zvýšení počtu kandidátních látek potenciale využitelných jako léčivo. Důvodem tohoto neúspěchu může být nedostatečná diverzita chemických struktur vytvořených pomocí kombinatoriálního přístupu (Feher & Schmidt, 2003). Za přínos kombinatoriálních metod však můžeme jednoznačně označit pokroky v optimalizaci farmakologických a farmakokinetických vlastností již známých struktur (Newman & Cragg, 2007).

V posledních letech je vývoj nových léčiv opět do značné míry závislý na objevování nových přírodních produktů, které nabízejí jedinečné chemické struktury. Například v oblasti antibiotik se zvyšuje počet rezistentních kmenů patogenních bakterií. Objevování zcela nových chemických struktur je proto klíčové k překonání rezistence nejnovější generace patogenů (Abdelmohsen et al., 2017).

Mimo to, že přírodní sloučeniny dokáží úspěšně bojovat s viry, bakteriemi, houbami, parazity a působí protizánětlivě, nacházejí využití i v léčbě nádorových onemocnění. Více než polovina sloučenin v současnosti využívaných k léčbě nádorových onemocnění je produktem přírodního původu nebo jeho analogem (Newman & Cragg, 2005).

Zvýšený zájem o vyhledávání přírodních látek s protinádorovými účinky odstartoval v roce 1958 i díky objevu vinblastinu a vinkristinu (Johnson et al., 1963). Tyto látky, izolované z *Vinca rosea*, významně přispěly k úspěchu v léčbě několika druhů nádorových onemocnění.

V roce 1960 zahájil NCI (National Cancer Institut) rozsáhlý program pro vyhledávání přírodních látek s protinádorovými účinky. Mezi léty 1960 až 1982 byl hodnocen cytotoxický efekt zhruba 114 000 extraktů z celkem 35 000 terestrických rostlin primárně proti liniím L1210 a P388 myši leukémie (Mann, 2002). Nejvýznamnějším objevem tohoto programu se stal paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), který byl izolován z kůry tichomořského tisu *Taxus brevifolia* (Wall et al., 1966). Dalšími významnými objevy tohoto programu jsou pak známá cytostatika etoposid, kamptotecin a jeho analog topotekan (Cragg et al., 1993).

V roce 1985 započal NCI nový výzkum, tzv. NCI-60. V programu NCI-60 byly extrakty z rostlin z předchozího programu, extrakty z živočichů a mikroorganismů (stále častěji mořského původu) testovány vůči 60 lidským nádorovým buněčným liniím. Nový koncept měl za cíl detekovat látky účinné proti solidním tumorům, nikoliv pouze proti leukémiím, jak tomu bylo u předchozího programu. Velkým přínosem obnoveného testování byl objev sloučenin působících proti viru HIV (Cragg et al., 1993).

U potenciální kandidátní látky pro další studie je zásadní objasnění mechanismu jejího protinádorového účinku. Program NCI-60 využil, jako jeden z prvních, k objasnění mechanismu účinku malých molekul komplexní (nepřímý) přístup (Cragg et al., 1993).

Komplexní přístup je založený na podobnosti fenotypu strukturálně nepodobných látek. U programu NCI-60 bylo žádoucím fenotypem zamezení proliferace nádorových buněk (Shoemaker, 2006). Odlišná toxicita malých molekul vůči jednotlivým buněčným liniím tvořila jakýsi „otisk prstu“ konkrétní molekuly. Tento „otisk prstu“ byl pomocí speciálního srovnávacího algoritmu porovnán s rozsáhlou databází malých molekul NCI.

Předpokládá se, že látky s unikátním cytotoxickým profilem pravděpodobně mají i unikátní mechanismus účinku. Molekuly s podobným profilem tak mohou být rozřazeny do konkrétních skupin (Salvador-Reyes & Luesch, 2015).

Komplexního přístupu k objasnění mechanismu účinku se využívá zejména u rozsáhlých programů při testování prefrakcionovaných extraktů. Tento přístup poskytuje informace spíše o obecném mechanismu účinku než o přímém cíli v buňce. Kromě toho, u malých molekul s potenciaálně unikátním mechanismem účinku, přináší informací poměrně málo (Cong et al., 2012).

Druhým typem přístupu k objasnění mechanismu účinku je přímý přístup (reverzní genetický). Tento je založen na přímé reakci malé molekuly s konkrétním purifikovaným proteinem. Využívá metod chemické proteomiky – kombinací afinitní chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Výhodou přímého přístupu je, že dostáváme informaci o konkrétním „*targetu*“ molekuly (Salvador-Reyes & Luesch, 2015).

Přímý postup je obvykle aplikován v bezbuněčných systémech. Má proto omezenou účinnost při objevování prekurzorů léčiva a neposkytuje prvotní poznatky o farmakokinetice léčiva. Navíc, ne vždy efektivita *in vitro* koresponduje s aktivitou *in vivo*. Je proto vhodné v určitých případech kombinovat tyto dva výše popsané přístupy k objasnění mechanismu účinku (Cong et al., 2012).

## **1.2 Mechanismy působení přírodních látek vůči nádorovým buňkám**

Neobvyklá chemická struktura přírodních látek (především pak sekundárních metabolitů) předurčuje tyto sloučeniny k interakci s různými enzymatickými procesy a proteinovými strukturami. Přesný popis mechanismu účinku konkrétní přírodní látky, a identifikování dalších možných cílů, jsou proto velice důležité pro předvídání případných vedlejších efektů léčby, ale i pro komplexní zhodnocení účinnosti bioaktivní látky (Breinbauer et al., 2002).

Tabulka I nabízí přehled buněčných struktur/proteinů, které jsou přírodními látkami v nádorových buňkách často ovlivněny. Interakce s těmito proteiny je velmi často přímo zodpovědná za bioaktivitu dané látky. Dále se v této kapitole podrobněji zabírám buněčným cyklem a mitochondrií, které do značné míry souvisí s praktickou částí mého výzkumu, jakožto vhodnými terapeutickými cíli v protinádorové léčbě.



**Tab. I: Přehled buněčných struktur/proteinů přírodními látkami v nádorových buňkách často ovlivněných (Tomek, 2011; Vicková, 2015, převzato a upraveno).**

<b>Látky poškozující DNA</b>	Alkylační činidla	<b>Carzinophilin</b> ( <i>Streptomyces sahachiroi</i> ) <b>Mitomycin C</b> ( <i>Streptomyces caespitosus</i> a <i>Streptomyces lavendulae</i> )
	Inhibitory topoisomeráz	<b>Camptothecin</b> a jeho deriváty <b>topotecan</b> a <b>irinotecan</b> ( <i>Camptotheca acuminata</i> ) <b>Podophyllotoxin</b> a jeho deriváty <b>etoposid, teniposide</b> a <b>etopophos</b> ( <i>Podophyllum</i> )
	Látky podporující vznik reaktivních forem kyslíku (ROS)	<b>Bleomyciny</b> ( <i>Streptomyces verticillus</i> )
<b>Inhibitory signálních kaskád</b>	Inhibitory tyrosinkináz	<b>Staurosporin</b> ( <i>Saccharothrix</i> )
	Inhibitory <i>serin/threonin</i> kináz	<b>Rapamycin</b> ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ) <b>Bryostatin 1</b> ( <i>Bugula neritina</i> )
	Modulátory signálních kaskád apoptózy	<b>Antimycin A</b> ( <i>Streptomyces</i> )
<b>Látky interagující s tubulinem a mikrotubuly („mitotické jedy“)</b>		<b>Vincristin</b> ( <i>Vinca rosea</i> ) <b>Vinblastin</b> ( <i>Vinca rosea</i> ) <b>Docetaxel (Taxotere®)</b> ( <i>Taxus baccata</i> ) <b>Paclitaxel (Taxol®)</b> ( <i>Taxus brevifolia</i> )

### 1.2.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je velmi striktně regulovaný mechanismus zahrnující růst buňky, syntézu DNA a rozdělení buňky na dvě dceřiné obsahující rovnocennou sádku chromozomů. Buněčný cyklus se sestává ze čtyř fází, a to: G<sub>1</sub>, S (syntéza DNA), G<sub>2</sub> a M (mitóza). Pro ověření přesnosti celé mašinérie prochází buňka během svého cyklu třemi kontrolními body (Cooper, 2000).

První kontrolní bod (tzv. „*checkpoint*“) probíhá v pozdní G<sub>1</sub> fázi. Dochází při něm ke kontrole velikost buňky, dostatku živin, přítomnosti růstových faktorů a stavu DNA. Jestliže buňka vyhoví ve všech ohledech, vstupuje do S fáze. Jakmile buňky do S fáze vstoupí, dokončí svůj cyklus rozdělením na dvě dceřiné. Jedinou výjimkou je poškození DNA nebo chybná replikace (Barnum & O'Connell, 2014). Pokud buňka neprojde tímto kontrolním bodem, zůstává v G<sub>0</sub> fázi. V G<sub>0</sub> fázi některé buňky setrvávají po celou dobu své existence, jiné za vhodných podmínek pokračují v dokončení cyklu.

Ke kontrole DNA, která se během S fáze zreplikovala, dochází na konci G<sub>2</sub> fáze. Pokud jsou zjištěny chyby nebo poškození, buněčný cyklus se zastaví v G<sub>2</sub> kontrolním bodu. Zde mohou být provedeny opravy nebo dokončena replikace. Buňky nenapravitelně poškozené jsou donuceny podstoupit apoptózu či jinou formu programované buněčné smrti. Tento mechanismus sebedestrukce zajišťuje, že poškozená DNA není předávána do dalších generací.

Posledním kontrolním bodem je „*checkpoint*“ na konci metafáze. Zde je nutná kontrola správného navázání chromozomů na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka. Vazba na dělicí vřeténko vytváří mechanické napětí, které je rozpoznáno regulačními proteiny a umožňuje vstup do anafáze (Barnum & O'Connell, 2014).

Progrese buněčného cyklu je regulována cykliny a cyklin-dependentními kinázami (CDK). CDK je skupina serin/treoninových kináz, které během G<sub>1</sub> fáze postupně fosforylují retinoblastomový protein (Rb). Po fosforylaci se stává Rb inaktivní a uvolňuje transkripční faktory rodiny E2F, které indukují transkripci genů potřebných pro vstup do S fáze. CDK jsou pozitivně regulovány cykliny, se kterými vytvářejí holoenzymy. Hladina cyklinů během buněčného cyklu kolísá. Za negativní regulaci CDK jsou zodpovědné dvě skupiny inhibitorů. Rodina inhibitorů CDK INK4a zahrnuje p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> a p19<sup>INK4d</sup> a specificky inhibuje CDK-4 a CDK-6, které tvoří komplexy s cykliny typu D. Naproti tomu rodina Cip / Kip se skládá z p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> a p57<sup>Kip2</sup> a inhibuje většinu CDK. CDK-1 (CDK-2), které jsou zodpovědné za přechod G<sub>2</sub> / M, tvoří komplexy s cyklinem B (Senderowicz, 2002).

Hlavním rysem nádorových buněk je deregulace kontrolních mechanismů buněčného cyklu, následkem čehož jsou schopny se nekontrolovatelně a rychle dělit. Řada přírodních sloučenin, které způsobují zástavu buněčného cyklu nádorových buněk, se ukázala jako účinná *in vivo*, *in vitro* i při klinických studiích (Bailon-Moscoso et al., 2017).

Mezi sloučeniny, schopné zastavit buněčný cyklus v určité fázi, patří látky inhibující aktivitu cyklinů a CDK, stejně jako dalších proteinů a enzymů podílejících se na chodu buněčného cyklu. Přehled těchto látek přírodního původu nabízí například Bailon-Moscoso et al. (2017).

Dalším mechanismem, který vede k zástavě buněčného cyklu a následné smrti buněk je narušení struktur aktinu a/nebo tubulinu či porušení dynamiky jejich přestavby. Mikrotubuly se podílejí na udržování struktury buňky a společně s mikrofilamenty a intermediárními filamenty tvoří cytoskelet. Jsou součástí mitotických vřetének, a tak hrají důležitou roli při separaci chromozómů během mitózy a meiózy. U různých typů nádorových buněk byly prokázány změny v mikrotubulární síti a předpokládá se, že mikrotubuly mohou hrát roli v chemoterapeutické rezistenci, vývoji a přežití nádorových buněk (Parker et al., 2014).

Mikrotubuly jsou dlouhé polymery sestávající se z alfa- a beta- monomerů tubulinu. Mikrotubulární síť vykazuje vysoce dynamické vlastnosti. Tato vlastnost je potřebná pro progresi buněčného cyklu. Látky působící jako tzv. mitotické jedy mohou být klasifikovány podle vlivu na polymerizaci tubulinu a podle jejich vazebného místa na tubulinu. Některé sloučeniny podporují polymerizaci a stabilizují mikrotubuly (např. taxoidy, epothilony, discodermolid). Jiné sloučeniny inhibují polymerizaci mikrotubulů (vinca alkaloidy, kolchiciny, cryptofyciny, halichondriny a estramustin) (Rao & Kurkjian, 2012).

Přírodní sloučeniny izolované z rostlin, mikroorganismů i mořských živočichů vykazují schopnost regulovat různé fáze buněčného cyklu, čímž inhibují dělení nádorových buněk. Mechanismy, pomocí kterých k tomu dochází, jsou u mnoha sloučenin často podobné. Zahrnují snížení exprese cyklinů a CDK charakteristických pro danou fázi buněčného cyklu a naopak zvýšení exprese inhibitorů CDK.

Prověření potencionálních cílů protinádorových sloučenin je potřebné pro zvýšení specificity zablokování buněčného cyklu nádorových buněk, snížení vedlejších efektů léčby spojených s poškozením normálních buněk a zabránění rezistenci vůči léčivu.

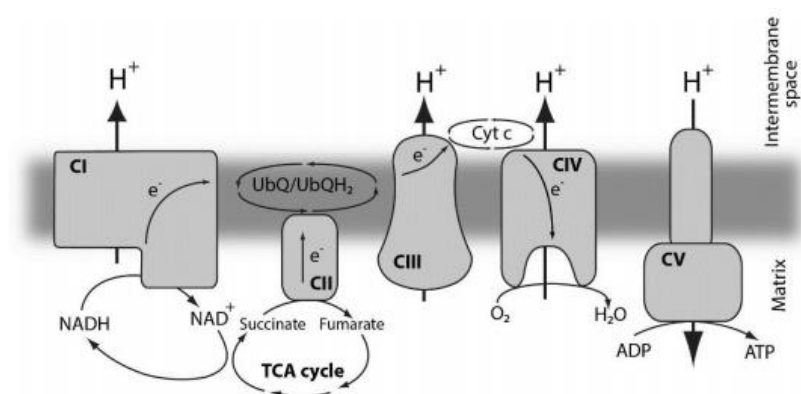
## 1.2.2 Mitochondrie

Mitochondrie je buněčná organela ohraničená dvěma biologickými membránami, mezi nimiž se nachází mezimembránový prostor. Vnitřní membrána vytváří četné záhyby, tzv. kristy, které zasahují do vnitřního mitochondriálního prostoru (matrix). Každý z těchto buněčných kompartmentů má svou funkci, přičemž nejdůležitější děje se odehrávají v matrix a na vnitřní membráně mitochondrie (Cooper, 2000).

Mitochondrie se účastní mnoha klíčových biosyntetických a metabolických reakcí. Zajišťuje homeostázu vápníku v buňce, syntézu hemu, kompletaci FeS klastrů, podílí se na metabolismu lipidů, syntéze nukleotidů a aminokyselin a několika dalších dějích. Velmi důležitá je též její úloha při regulaci apoptózy. Mitochondrie je ale především známá jako organela generující v normálních buňkách pomocí oxidativní fosforylace převážnou většinu ATP.

### 1.2.2.1 Mitochondrie a energetický metabolismus buňky

Enzymatický aparát zajišťující oxidativní fosforylaci (tzv. dýchací řetězec) je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. Jedná se o systém sestávající se z pěti komplexů a dvou mobilních elektronových přenašečů. Elektrony jsou přenášeny řetězcem oxidoredukčních reakcí, který směřuje k redukci konečného akceptoru elektronů, molekulárního kyslíku, na vodu. Komplexy I, III a IV fungují jako protonová čerpadla a využívají redoxní energie k přenosu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Takto generovaný protonový gradient vytváří elektro-chemický potenciál v okolí vnitřní mitochondriální membrány. Komplex V užívá tento potenciál ke katalýze kondenzace ADP a anorganického fosfátu za vzniku ATP (Rohlenová, 2016). Celý komplex je schematicky znázorněn na obrázku 1.



Obr. 1: Zjednodušené schéma oxidativní fosforylace (Rohlenová 2016).

U nádorových buněk byla úloha mitochondrie v syntéze ATP dlouhou dobu upozadována. Jednou z podmínek rychlého dělení nádorových buněk je dostatečně rychlá syntéza prekurzorů (nukleových kyselin, aminokyselin, lipidů) pro stavbu buněk nových. Proto nádorové buňky upravují svůj metabolismus tak, aby těmto zvýšeným nárokům vyhověly. Většinu glukózy přeměňují na pyruvát pomocí neefektivní, ovšem výrazně rychlejší glykolýzy (Slaninová & Krejčí, 2013). Tento jev (převažující zisk energie z glykolýzy vůči oxidativní fosforylaci) popsany německým lékařem Otto Warburgem je známý jako Warburgův efekt.

Warburg později vyslovil teorii, že dysfunkce mitochondrie stojí na počátku tumorigeneze (Warburg, 1956). Tento závěr společně s objevem onkogenů a tumor supresorů způsobil odklon zájmu od mitochondrie a Warburgův efekt se stal vhodným cílem využitelným nejen v léčbě, ale i v diagnostice nádorových onemocnění.

Přesto, že většina ATP v nádorové buňce vzniká procesem glykolýzy, nádorové buňky si zachovávají funkční mitochondrie. Výhodou mitochondrií je jejich nižší citlivost k nedostatku glukózy. Navíc se podílejí na biosyntéze určitých stavebních kamenů pro buňku esenciálních (aspartátu a pyrimidinových nukleotidů) (Sullivan et al., 2015).

Mitochondrie tedy může být považována za vhodný terapeutický cíl. Na rozdíl od cílení jednotlivých onkogenů nebo signálních drah, jejichž funkce je ve většině případů nahraditelná alternativními signalizačními drahami, poškození mitochondrie má pro buňku fatální následky. Specifičnost případné terapie je navíc zaručena odlišnými vlastnostmi mitochondrií (včetně dýchacího řetězce) v normálních a nádorových buňkách. Příkladem takové terapie je stimulace produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Rohlenová 2016).

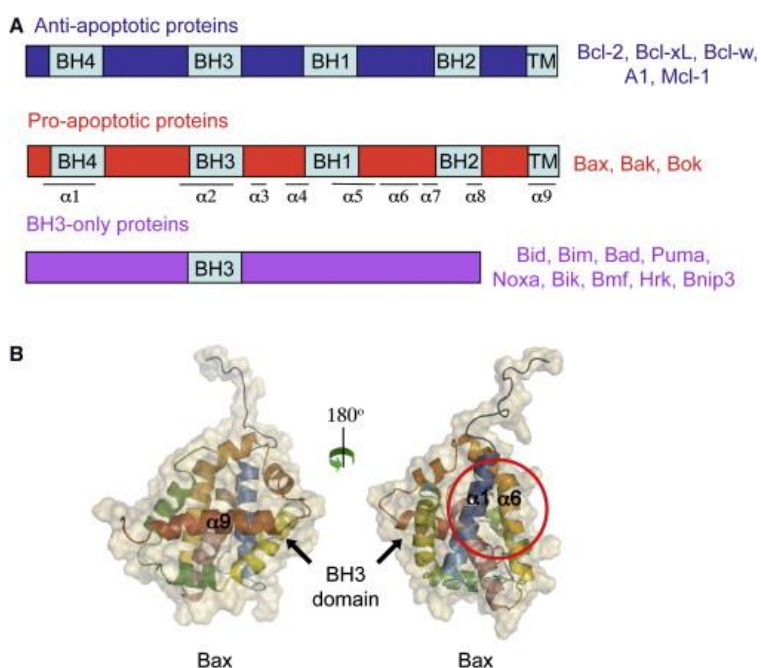
Oxidoredukční reakce v mitochondrii jsou hlavním zdrojem ROS. Za fyziologických podmínek působí ROS jako důležité signalizační molekuly. Účastní se regulace různých buněčných funkcí, jako je růst, přežití, proliferace a adaptace na hypoxii. Za patologických podmínek ROS přispívají ke vzniku nádorových buněk a tvorbě metastáz tím, že ovlivňují fosforylaci důležitých onkoproteinů jako jsou například MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) nebo dráha PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein kinase B) (Martindale & Holbrook, 2002).

Nízké dávky ROS u nádorových buněk stimulují buněčnou proliferaci, schopnost tvořit metastázy a nezávislost na extracelulární matrix. Nádorové buňky mají však přirozeně zvýšené bazální hodnoty ROS, což je činí zranitelnější k terapiím, při kterých se ROS stres dále zvyšuje (Nogueira et al., 2008).

### 1.2.2.2 Mitochondrie a apoptóza

Vedle ústřední role v buněčné bioenergetice působí mitochondrie také jako bod konvergence mnoha signálů indukujících apoptózu. Apoptóza je evolučně vysoce konzervovaný proces, který hraje klíčovou roli při udržování homeostázy tkání. „Neochota“ podstoupit apoptózu je charakteristickým znakem nádorových buněk. Během posledních dvou dekad bylo identifikováno několik mitochondriálních proteinů schopných přímé aktivace na kaspázách závislé vnitřní dráhy apoptózy (Liu et al., 1996).

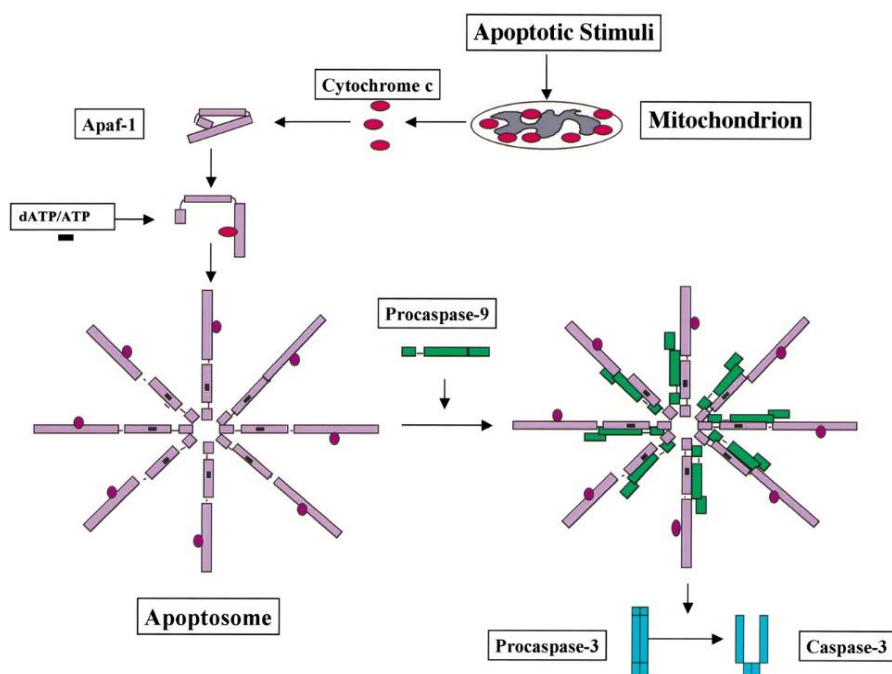
Strukturní změny mitochondrie jsou během apoptózy řízeny proteiny Bcl-2 rodiny (B-cell lymphoma 2). Bcl-2 genovou rodinu můžeme rozdělit do tří podskupin na základě počtu konzervovaných homologních domén (BH), které Bcl-2 proteiny obsahují (Obr. 2). Antiapoptičtí a proapoptičtí členové rodiny mají čtyři BH, zatímco BH3-only proteiny obsahují, jak název napovídá pouze BH3 doménu (Martinou & Youle, 2011).



**Obr. 2: Proteiny Bcl-2 genové rodiny (Martinou & Youle, 2011).**

Za normálních podmínek antiapoptičtí členové Bcl-2 rodiny udržují mitochondriální integritu přímou vazebnou interakcí s proapoptickými členy rodiny Bcl-2 (Bax a Bak) nacházejícími se v mitochondriální membráně. Během buněčného stresu jsou aktivovány BH3 proteiny působící proti antiapoptickým členům Bcl-2 rodiny. Následně dochází k zamezení inhibice Bax a / nebo Bak proteinů a jejich uvolnění, což vede k jejich oligomeraci a vytvoření kanálu, jehož prostřednictvím původně mitochondriální cytochrom c (cyt c) proniká do cytosolu. V cytosolu cyt c společně s Apaf-1 a dATP vytváří superkomplex, tzv. apoptosom.

Apoptosom je schopný navázat prokaspázu-9, která se tím aktivuje. Následně aktivní kaspáza-9 štěpí a aktivuje efektorové kaspázy-3, -6 a -7, jež mají zásadní význam pro průběh exekutivní fáze apoptické smrti (Obr. 3). Mimo to, i další proapoptotické proteiny uvolněné z mitochondrie přispívají k sebevražednému mechanismu buňky (Duprez et al., 2009).



**Obr. 3: Schéma průběhu na kaspázách závislé vnitřní dráhy apoptózy (Wang, 2001).**

Deregulace apoptózy vede k tvorbě a progresi nádoru a bývá častou příčinou selhání léčby nádorových onemocnění. V posledních desetiletích byly objeveny přírodní produkty schopné modulovat signální dráhy apoptózy, které jsou u nádorových buněk často pozměněny. Díky takovýmto sloučeninám se terapie stává cílenější a účinnější.

Jako příklad lze uvést BH3 mimetika. Jde o látky, které se vážou na BH3 vazebné místo antiapoptických proteinů, a tím způsobí uvolnění proapoptických proteinů BAX a BAK. Uvolněné proapoptické proteiny pak působí jako přímý apoptický stimul. Tohoto efektu lze dále využít k senzibilizaci buňky vůči široké paletě protinádorových léčiv. Takovým BH3 mimetikem přírodního původu je například gossypol (AT-101) (Opydo-Chanek et al., 2017).

## 1.3 Sinice jako zdroj nových látek k léčbě nádorových onemocnění

Sinice představují starobylou skupinu prokaryotních organismů produkujících nesmírně širokou škálu sekundárních metabolitů. Sekundární sinicové metabolity byly po miliony let evolucí selektovány tak, aby jejich chemická struktura umožňovala interakci s co nejširším spektrem enzymů a proteinů a ve finále tak napomáhala přežití těchto mikroorganismů v konkurenčním a dynamickém prostředí. Není proto náhodou, že některé z těchto metabolitů též vykazují aktivitu vůči biochemickým procesům probíhajících v buňkách obratlovců. Díky této skutečnosti lze sinice považovat za významný zdroj nových látek s farmakologickým potenciálem (Salvador-Reyes & Luesch, 2015).

První studie týkající se sinic byly zaměřeny na jejich ekologii a vliv na veřejné zdraví v důsledku schopnosti sinic produkovat toxiny (Carmichael, 1992). V nedávné době však bylo mnoha studiemi prokázáno, že sinice produkují sloučeniny s biotechnologickým a farmaceutickým významem. U některých sekundárních sinicových metabolitů byly popsány protizánětlivé, antibiotické i protinádorové vlastnosti a nové sloučeniny se stále objevují.

Testování sinicových extraktů na přítomnost látek s protinádorovými účinky započalo v 90. letech minulého století v laboratoři Moora (Oregonská státní univerzita) a Gerwicka (Havajská univerzita) (Singh et al., 2011). Mnoho látek izolovaných ze sinic vykazuje protinádorovou aktivitu. Ucelený přehled nabízí například Costa et al. (2012). V rámci této práce se však zaměřím pouze na klinicky nejvýznamnější skupiny látek.

### 1.3.1 Apratoxiny

Prvním známým apratoxinem byl apratoxin A. Jde se o cyklický depsipeptid, který byl izolován z mořské sinice *Lyngbya* sp. Později byly objeveny jeho další čtyři přírodní strukturní analogy, apratoxiny B-E (Luesch et al., 2002).

Apratoxin A má jednu z nejvyšších aktivit mezi cytotoxiny sinic vůbec. Hodnoty IC<sub>50</sub> (inhibiční koncentrace, při které dochází k zamezení růstu) in vitro vůči lidským rakovinným buněčným liniím se pohybují mezi 360 až 520 pM (Luesch et al., 2001a).

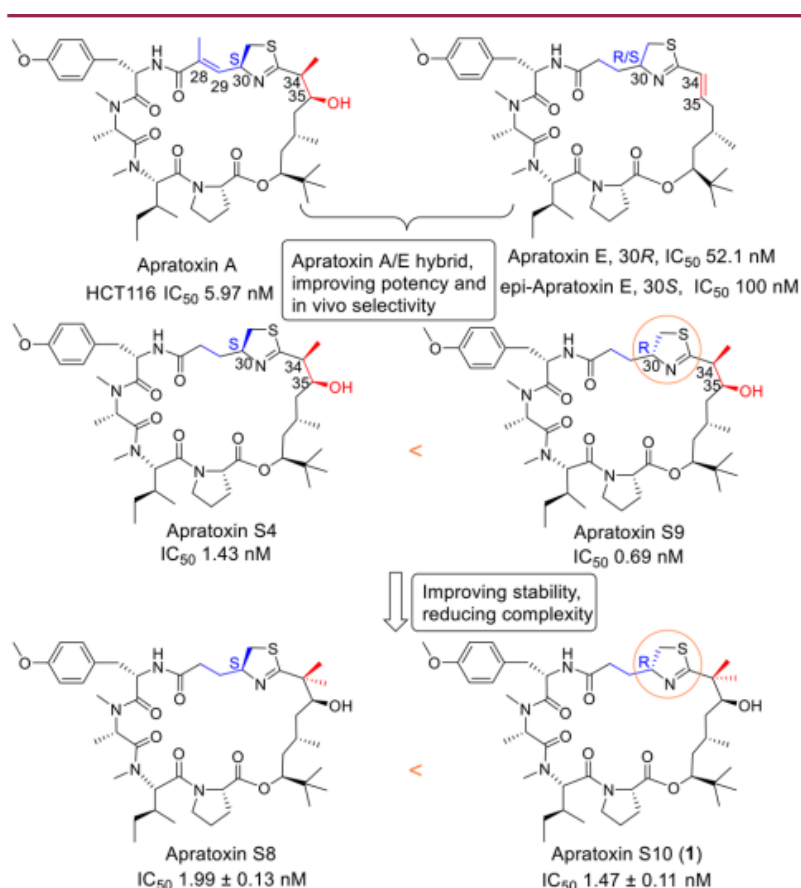
Apratoxin A indukuje zástavu buněčného cyklu v G1 fázi a následnou apoptózu. Přesný mechanismus účinku zatím nebyl uspokojivě objasněn. V nedávné době však bylo zjištěno, že apratoxin A zabraňuje kotranslační translokaci, a tím snižuje expresi řady receptorů, včetně receptorových tyrozinkináz.



Navíc inhibuje sekreci růstových faktorů působících právě na tyrozinkinázové receptory (Chen et al., 2011).

Tyrozinkinázové receptory, jako například receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFR) a jemu odpovídající ligandy (VEGF-A), jsou považovány za velmi vhodné terapeutické cíle. Díky tomu byly malé molekuly a protilátky proti těmto proteinům schváleny k léčbě kolorektálního karcinomu i některých dalších typů nádorových onemocnění (Koutras et al. 2011; Lurje & Lenz, 2010).

In vivo byl však apratoxin A jen nepatrně aktivní vůči nádoru tlustého střeva a inaktivní vůči nádoru prsu. Navíc také vykazoval nevratnou toxicitu a nebyl dobře snášen (Chen et al., 2011). Z tohoto důvodu byly nově syntetizovány jeho analogy, hybridy mezi apratoxinem A a apratoxinem E, apratoxiny S4, S8, S9, S10 (Obr. 4).



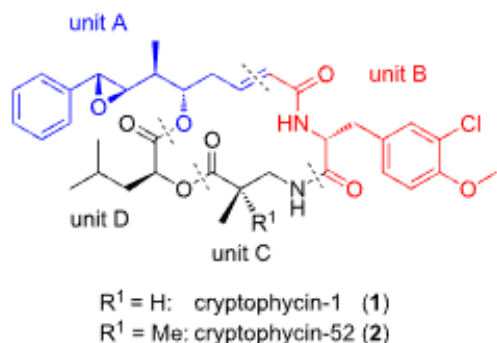
Obr. 4: Apratoxin A a Apratoxin E (přírodní produkty) a jejich syntetické analogy s odpovídajícími hodnotami IC<sub>50</sub> vůči HCT116 kolorektálním nádorovým buňkám (Cai et al., 2017).

Apratoxin S10 je považován za nejvhodnějšího kandidáta z rodiny apratoxinů pro další testování ve smyslu účinnosti, stability a syntetické dostupnosti. Díky potlačení exprese VEGFR2 a blokování sekrece VEGF-A a interleukinu-6 inhibuje jak angiogenezi, tak růst nádorových buněk *in vitro*. Kromě inhibice angiogeneze má silné inhibiční účinky vůči nádorovým buňkám z vysoce vaskularizovaných nádorů díky inhibici vícero receptorových tyrozinkináz. Tyto neobvyklé vlastnosti staví Apratoxin S10 do pozice slibného kandidáta pro další preklinické, případně klinické studie (Cai et al., 2017).

### 1.3.2 Cryptofyciny

Cryptofycin-1 byl poprvé izolován v roce 1990 ze symbiotické sinice *Nostoc* sp., kmene ATCC53789 (Schwartz et al., 1990). Je považován za nejsilnější mikrotubulární disruptor, který byl kdy z přírodního zdroje izolován.  $IC_{50}$  se pohybuje v řádech pikomolů (Buck et al., 2004). Nejdříve byla popsána jeho fungicidní aktivita, později se však zjistilo, že se ireverzibilně váže na tubulin a je schopen ničit i rezistentní nádorové buňky (Al-Awar et al., 2003). Vykazuje vysokou protinádorovou aktivitu, a to i proti taxol- a vinblastin-rezistentním nádorovým buňkám, včetně nádoru tlustého střeva, prsních žláz, ductálního adenokarcinomu, vaječníků nebo nemalobuněčného karcinomu plic (Golakoti et al., 1996).

Cryptofycin-1 má však i několik nežádoucích vlastností, které souvisí především s nepolárním charakterem této sloučeniny. Pokud je podáván intravenózně, vyžaduje pomocné látky zajišťující jeho rozpustnost v plasmě a v důsledku nestability molekuly se snižuje jeho účinnost *in vivo*. Od cryptofycinu-1 bylo proto připraveno více jak 25 strukturních analogů. Nejslibnější výsledky poskytl cryptofycin-52 (Obr. 5), který se dostal do fáze II klinických zkoušek pro léčbu platina rezistentního karcinomu ovaríí a nemalobuněčného karcinomu plic (Edelman et al., 2003, D' Agostino et al., 2006).



Obr. 5: Přírodní cryptofycin-1 a jeho analog cryptofycin-52 (Weiß et al., 2012).

Při léčbě karcinomu ovarií vykazoval cryptofycin-52 toxicitu 3. stupně dle Světové zdravotnické organizace. U pacientek způsoboval anémii, trombocytopenii, zvýšenou hladinu kreatininu a hyperbilirubinémii. Výsledky studie léčby karcinomu plic navíc ukázaly, že způsobuje neuropatii a má pouze omezenou účinnost. Tyto závěry vedly k předčasnému ukončení klinických studií (Raja et al., 2016).

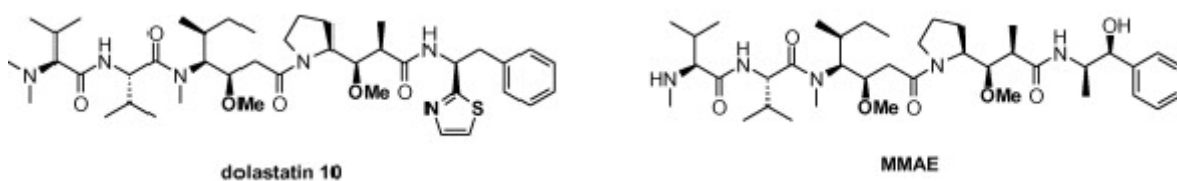
### 1.3.3 Dolastatiny

Dolastatin-10 byl původně izolován ve velmi malém množství z mlže *Dolabella auricularia* (mořský zajíc) (Pettit et al., 1987). Posléze se však zjistilo, že jeho primárním producentem je ve skutečnosti vláknitá sinice rodu *Symploca* (Luesch et al., 2001b).

Jedná se pentapeptid obsahující valin a čtyři vzácné (neproteinogenní) aminokyseliny - dolavalin, dolaisoleucin, dolaprolin a dolafenin. Blokuje polymerizaci tubulinu a způsobuje zástavu buněčného dělení v G2/M fázi. Vykazuje silnou antiproliferační aktivitu proti široké škále rakovinných buněk v piko- a nanomolárním rozmezí hodnot IC<sub>50</sub> (Madden et al., 2000).

Byl zařazen do klinických pokusů pro léčbu hormonálně rezistentního adenokarcinomu a platina-senzitivního rekurentního karcinomu ovarií. Klinické studie však byly přerušeny s ohledem na nízkou účinnost přípravku a periferní neuropatii u pacientů (Vaishampayan et al., 2010).

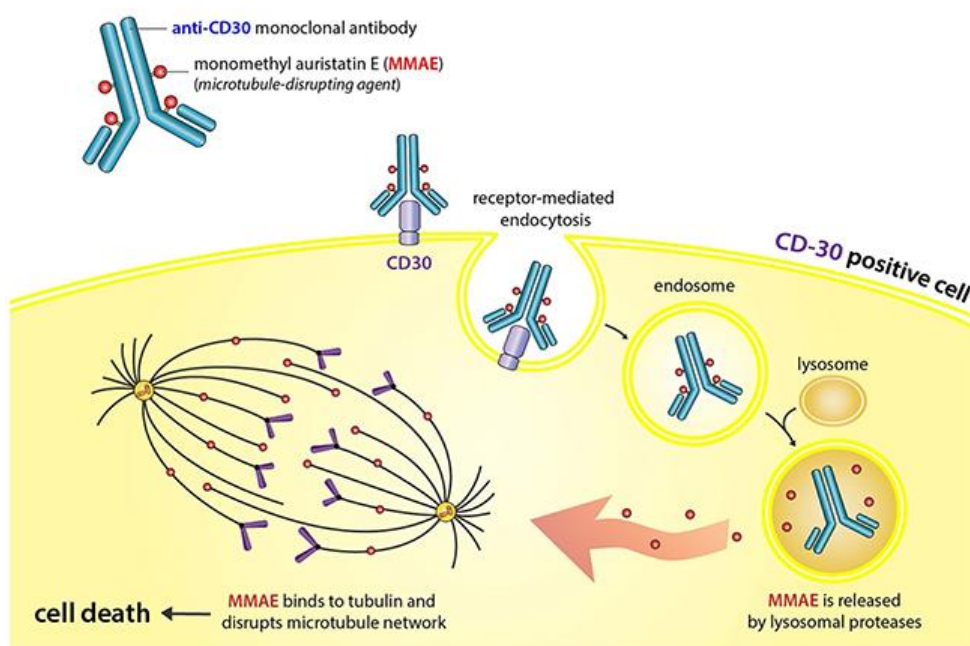
Dolastatin-10 však posloužil jako předloha pro návrh syntetických analogů, které mají nižší toxicitu a jsou vytvořeny pro cílenou léčbu. Jedná se především o monomethyl auristatin E (Obr. 6) (Deng et al., 2013).



**Obr. 6: Chemická struktura dolastatinu 10 a jeho syntetického analogu monomethyl auristatinu E (Bouchard et al., 2014).**

Monomethyl auristatin E je součástí konjugátu protilátka- léčivo s komerčním názvem brentuximab vedotin, který byl v roce 2011 schválen a je používán v léčbě Hodgkinova lymfomu a systémového anaplastického velkobuněčného lymfomu pod obchodním názvem Adcetris® (US Food and Drug Administration, 2011).

Brentuximab vedotin se skládá z léku (monomethyl auristatin E) spojeného s katepsin B-štěpitelným linkerem a anti-CD30 protilátkou. Tento konstrukt umožňuje selektivní dodání léku přímo k nádorovým buňkám exprimujícím vyšší hladiny CD30 antigenu. Má nízkou zkříženou reaktivitu k normálním buňkám. Brentuximab vedotin se do buňky dostává pomocí endocytózy zprostředkované receptorem. Konjugát protilátka-lék je následně štěpen lysozomálními enzymy, jako jsou například katepsiny, čímž je monomethyl auristatin E uvolněn do cytosolu a stává se účinným (Obr. 7) (Younes et al., 2012).



Obr. 7: Mechanismus účinku brentuximab vedotinu (Collins et al., 2014).

## 2. Cíle práce

- 1) Izolovat nostatin A (NosA) a jeho přírodní analogy v čistotě a množství dostatečném pro biologické experimenty.
- 2) Stanovit  $IC_{50}$  NosA a jeho přírodních analogů vůči nádorové linii lidských epitelálních buněk HeLa.
- 3) Pokus se objasnit mechanismus cytostatického účinku NosA.

# 3. Materiály a metody

## 3.1 Chemikálie

- **2-Deoxy-D-glukóza** (Sigma- Aldrich)
- **Acetonitril LC-MS** (Scharlau)
- **Alexa Fluor™ 555 Phalloidin** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **Alpha Tubulin Monoclonal Antibody (11126)** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **Antibiotika – antimykotika** (Gibco®, Life Technologies)
- **CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay** (Promega)
- **DAPI** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **DMEM** (Gibco® média, Life Technologies)
- **DMSO** - dimethylsulfoxid (Scharlau)
- **Etanol** (Sigma- Aldrich)
- **FACS pufr** (-  $\text{Ca}^{2+}$ , -  $\text{Mg}^{2+}$ , Gibco), 0,1% BSA, 0,1%  $\text{Na}_3\text{N}$
- **FBS** – fetální bovinní sérum (Gibco®, Life Technologies)
- **Fetální bovinní sérum (BSA)** (Serva)
- **Formaldehyd 36,5- 38%** (Sigma- Aldrich)
- **Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody (Alexa Fluor 488)** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **L-glutamin** (Gibco®, Life Technologies)
- **Metanol LC-MS** (Scharlau)
- **Mitomycin C** (Sigma- Aldrich)
- **MitoTracker® Green FM** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)

- **MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **MTT** - 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Invitrogen Molecular Probes®, Life Technologies)
- **NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (Hoechst® 33342)** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (DAPI)** (Invitrogen – Molecular Probes®, Life Technologies)
- **Oligomycin A** (Sigma- Aldrich)
- **Paclitaxel (Taxol)** (Sigma- Aldrich)
- **PBS** - fosfátový pufr (Sigma- Aldrich)
- **Propidium iodide (PI)** (Sigma- Aldrich)
- **RNAsa A** (Sigma- Aldrich)
- **RO-3306** (Sigma- Aldrich)
- **RPMI 1640** (Gibco® média, Life Technologies)
- **Triton™ X-100** (Sigma- Aldrich)
- **Trypsin-EDTA bez fenolové červeně** (Gibco®, Life Technologies)

## **3.2 Izolace NosA a jeho přírodních analogů, teplotní stabilita**

### **NosA**

#### **3.2.1 Kultivace sinicové biomasy**

Sinicový kmen *Desmonostoc muscorum* CALU 456 byl kultivován v médiu BG-11 (Rippka, 1979) při konstantní teplotě 28 °C, osvětlení ( $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) a přívodu vzduchu obohaceného o 2% CO<sub>2</sub> přímo do kultury v 60 litrových a 100 litrových plochých fotobioreaktorech. Biomasa byla opakovaně sklizena každých 10 dní. Před lyofilizací byla uskladněna při teplotě -70 °C.

#### **3.2.2 Příprava surového extraktu ze sinicové biomasy**

K 120 gramům lyofilizované sinicové biomasy bylo přidáno adekvátní množství mořského písku a celkem 3,5 litru 70% acetonitrilu. Ve třecí misce byla biomasa řádně homogenizována a po dobu alespoň jedné hodiny extrahována při pokojové teplotě. Následně byla směs centrifugována ( $3175 \times g$ , 10 minut). Odebraný supernatant byl odpařen na rotačních vakuových odparkách. Poté byl surový extrakt resuspendován v metanolu a opětovnou centrifugací zbaven nerozpustných zbytků.

#### **3.2.3 Vlastní izolace NosA a jeho přírodních analogů**

##### **3.2.3.1 Extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku**

Surový extrakt byl naředěn destilovanou vodou tak, aby výsledné procento metanolu v roztoku nepřesáhlo 10%. Následně byla provedena extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku. Určitý objem roztoku byl nanesen na aktivovanou kolonu (Discovery® DSC-18 SPE Tube). Látky zachycené na pevné fázi byly postupně vymývány metanolovým gradientem 10-100%. Frakce 80% a 90% metanolu obsahovaly významné množství NosA a jeho analogů, proto byly po odpaření a následném rozpuštění použity pro další krok izolace, gelovou chromatografií.

##### **3.2.3.2 Gelová chromatografie**

Gelová chromatografie byla provedena na koloně (290 x 30mm) naplněné sorbentem Sephadex LH-20 s použitím metanolu jako mobilní fáze při průtokové rychlosti  $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Každých 10 minut byly odebírány frakce, které byly následně analyzovány pomocí HPLC-HRMS. Frakce s nejvyšším obsahem požadovaných látek byly dále přečištěny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.



### **3.2.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Finální purifikace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie probíhala ve dvou krocích. Byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent HP 1100 s DAD detektorem. V prvním kroku probíhala separace látek na koloně C18 (Watrex Reprosil C18, 250 x 8 mm, 5 µm). Jako mobilní fáze byl použit acetonitril (A) a voda (B) s následujícím gradientem: A/B 55/45 (v 0 min), 58/42 (ve 32 min), 100/0 (ve 45min).

Získané frakce obsahující NosA a jeho analogy byly po zakoncování ve vakuovém koncentrátoru miVac QUATTRO dále přečištěny na fenylové koloně (Watrex Reprosil 100 Fenylnyl, 250 x 8 mm, 5 µm) opět za použití acetonitrilu (A) a vody (B) jako mobilních fází. Gradient byl následující: A/B 30/70 (v 0min), 50/50 (ve 20min), 67/34 (ve 37min), 100/0 (ve 42min), 30/70 (ve 47min). Ani u jednoho kroku nebyla do solventu přidána 0,1% kyselina mravenčí, která je jinak běžným přídavkem do mobilních fází.

### **3.2.4 Analýzy prováděné pomocí HPLC-HRMS**

Složení surového extraktu, jednotlivých frakcí, ověření čistoty izolovaných látek i vyhodnocení několika dalších biologických pokusů bylo provedeno pomocí analytické sestavy Thermo Dionex 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) propojené s hmotnostním spektrometrem Bruker Daltonic s HRMS detekcí (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) a ionizací elektrosprejem v pozitivním modu (souhrnně HPLC-HRMS). Nastavení hmotnostního spektrometru bylo následující: sušící teplota 200 °C; průtok sušícího plynu 12 l min<sup>-1</sup>; nebulizer gas pressure (tlak nebulizačního plynu) 3 bar; napětí na kapiláře 3,8 kV; „*end plate offset*“ 500 V. Spektra byla měřena v rozmezí *m/z* 20–2000 se spektrálním rozlišením 2 Hz. Získaná data byla následně analyzována v softwaru DataAnalysis.

### **3.2.5 Teplotní stabilita NosA**

Za účelem zjištění teplotní stability NosA byl proveden pokus, kdy uvedená látka byla po dobu 24 hodin zahřívána v termobloku na teplotu 40, 60, 80 a 100 °C. Jeden vzorek byl ponechán po inkriminovanou dobu při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby byly vzorky analyzovány pomocí HPLC-HRMS.

## 3.3 Experimenty na buněčných liniích

### 3.3.1 Kultivace buněk *in vitro*, příprava buněk na experiment

Pracovala jsem s buněčnými liniemi HeLa a PaTu 8902. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při konstantní teplotě 37 °C a atmosféře obohacené o 4,5% CO<sub>2</sub>. Pro kultivaci byla použita média RPMI 1640 (HeLa) a DMEM (PaTu 8902) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS), 1% 2 mM L-glutaminu a 1% antibiotik a antimykotik. Obě linie, se kterými jsem pracovala, jsou adherentní. Jejich pasáž byla prováděna přibližně každý třetí den. Staré médium bylo odstraněno odlitím, buněčná kultura omyta roztokem PBS a bylo přidáno 500 µL trypsinu. Zhruba po 5 minutách došlo k rozvolnění buněk od povrchu kultivační flakony i od sebe navzájem. Účinek trypsinu byl zastaven přidáním nového média a buněčná suspenze byla řádně promíchána pipetou. Část této suspenze byla převedena do sterilní kultivační lahve a po doplnění média umístěna zpět do inkubátoru k další kultivaci, část byla použita na experimenty.

V závislosti na typu pokusu byly použity 24-, 96- nebo 378- jamkové panely s plastovým či skleněným (fluorescenční mikroskopie) dnem. Pro konfokální mikroskopii byly buňky kultivovány na sklíčkách potažených poly-D-lysinem. V případě experimentů, jejichž výstupem byla hodnota luminiscence, byly použity netransparentní bílé panely.

Počet buněk potřebných na experiment se lišil v závislosti na typu pokusu. Ředění bylo stanoveno na základě znalosti přibližného počtu buněk v 1 ml suspenze získané počítáním buněk v Bürkerově komůrce. Standartní koncentrace byla  $2 \times 10^4$  buněk na jamku (200 µl). Pro zajištění dostatečné adheze buněk byl panel s buňkami připraven vždy jeden den před samotným experimentem.

### 3.3.2 MTT test

MTT test byl použit jako jedna z metod pro stanovení metabolické aktivity buněk. Tato metoda je založena na redukci žlutého, ve vodě rozpustného, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně a v cytosolu živých buněk. Množství vzniklého formazanu tedy odpovídá množství metabolicky aktivních buněk. Krystalky formazanu jsou rozpustné v DMSO a výsledné zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při měřicí vlnové délce 590 nm a referenční vlnové délce 640 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk).

Tato metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem (1983) jako tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk.

Médium v předem připravených testovacích jamkách s buňkami bylo nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku o požadované koncentraci. Koncentrace rozpouštědla v jamce nepřesáhla 1% (v/v). U jamek, sloužících jako negativní kontrola, bylo rovněž vyměněno médium za nové, obsahující stejné procento rozpouštědla jako v jamkách testovacích. Panel s buňkami byl inkubován požadovanou dobu za standardních kultivačních podmínek. Takto bylo postupováno při všech experimentech s testovanou látkou.

Po uplynutí stanovené doby bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l sterilního MTT o koncentraci 4 mg/ml. Destička byla další 4 hodiny inkubována a následně centrifugována (556 x g, 10 minut). Médium z destičky bylo vyklepnuto a do každé jamky bylo přidáno 200  $\mu$ l DMSO za účelem rozpuštění vzniklých formazanových krystalů. Absorbance byla naměřena na spektrofotometru Tecan SUNRISE při vlnových délkách 590 nm (hlavní) a 640 nm (referenční).

Výsledné hodnoty absorbance jsou průměrem triplikátů absorbancí naměřených v testovacích nebo kontrolních jamkách. Poměr testovacích jamek ke kontrolám představuje míru viability (či inhibice) vyjádřenou v procentech.

### ***3.3.3 Časoběrná mikroskopie***

Pro časoběrnou mikroskopii byl použit invertovaný mikroskop ZEISS Axio Observer Z.1 vybavený komorou pro udržení stálé teploty (37 °C) a přívodem vzduchu obohaceným o 4,5% CO<sub>2</sub>. V každé jamce je možno nastavit jedno i více mikroskopických polí, které budou po určitou dobu, a ve zvoleném časovém intervalu, sledována. Výsledkem je video, na kterém lze pozorovat změny v morfologii buněk, jejich dělení či smrt. Zároveň byla obdržena data o délce trvání těchto dějů a počtu buněk ve sledovaném poli.

### ***3.3.4 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie***

Vyšetření obsahu DNA bylo provedeno za pomoci průtokové cytometrie. HeLa buňky (100 tis . 1ml<sup>-1</sup>) byly kultivovány v médiu s 200 nM NosA po dobu 24, 48 a 72 hodin. Po uplynutí této doby bylo z jamky odsáto médium, buňky byly promyty PBS a do jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l trypsinu. Uvolněné buňky byly přeneseny do mikrozkuumavek, centrifugovány (280 x g, 5 minut, 4 °C) a následně udržovány na ledu. Supernatant byl odebrán a pelet propláchnut ledovým PBS. Poté byl celý proces centrifugace opakován.

Po odebrání supernatantu bylo k peletu buněk přidáno 300  $\mu$ l PBS, buňky byly resuspendovány a přeneseny do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii. Ve zkumavkách byly buňky jemně vortexovány a po kapkách bylo přidáno 700  $\mu$ l ledového etanolu. Takto fixované vzorky byly umístěny alespoň jednu hodinu ve 4 °C. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány (500 x g, 5 minut, 4 °C). Supernatant byl vyklepnut a buňky promyty PBS. Tento krok se opakoval ještě jednou. Poté bylo k peletu přidáno 1 ml RNAsy A (100  $\mu$ g/ml PBS) a vzorky byly ponechány 30 minut při 37 °C. Po 30 minutách byl ke vzorkům přidán propidium jodid (40 $\mu$ g/ml) a vzorek byl inkubován za tmy po dobu 15 minut. Finálním krokem byla opět centrifugace (500 x g, 10 minut, 4 °C), odebrání supernatantu a resuspendace v 1 ml FACS pufru.

Takto připravené vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD FACS Canto II za asistence RNDr. Jindřicha Chmelaře, Ph.D. Získaná data byla následně zpracována v softwaru FlowJo.

### **3.3.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu**

HeLa buňky (100 tis .  $1\text{ml}^{-1}$ ) byly kultivovány v 24– jamkových panelech na sklíčkách potažených poly- D- lysinem v médiu s přísadkou 50 nM NosA po dobu 24 a 48 hodin. Poté bylo odebráno médium, buňky byly dvakrát šetrně promyty PBS a fixovány 3,7% formaldehydem po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Následně proběhla permeabilizace buněčné membrány pomocí 0,25 % tritonu X-100 po dobu 5 minut. Za účelem blokování nespecifických vazebných míst pro protilátky, byly buňky inkubovány s 5% BSA po dobu jedné 1 hodiny při pokojové teplotě.

Poté byla přidána myší monoklonální protilátka proti alfa- podjednotce tubulinu o koncentraci 1  $\mu$ g .  $\text{ml}^{-1}$ . Inkubace s primární protilátkou probíhala po dobu 3 hodin při pokojové teplotě. Mezi všemi výše zmíněnými kroky byly buňky řádně promývány PBS. Po 3 hodinách byla přidána sekundární protilátka v poměru 1  $\mu$ l zásobního roztoku na 200  $\mu$ l PBS a po dalších 10 minutách protilátka proti aktinu (4  $\mu$ l zásobního roztoku na 200 $\mu$ l PBS). Společná inkubace při pokojové teplotě trvala 20 minut. Naposledy byly buňky dvakrát promyty PBS a sklíčko bylo pomocí „*mounting*“ gelu s přísadkou DAPI (3 kapky na 1 ml) připevněno k podložnímu sklíčku. Takto připravené vzorky byly skladovány v temnu při 4 °C.

### ***3.3.6 Distribuce NosA v médiu/ buňkách***

Byly analyzovány 3 frakce – frakce buněčná, trypsinová a kultivační médium, za účelem zjištění přítomnosti a kvantifikace NosA ve vzorku. HeLa buňky byly kultivovány v 1 ml média s NosA (400 nM a 200 nM) po dobu 24 a 48 hodin. Po uplynutí stanové doby bylo médium odebráno (1. frakce), následně bylo k buňkám přidáno 100  $\mu$ l trypsinu. Uvolněné buňky byly přeneseny do mikrozkuhavek a centrifugovány (280  $\times$  g, 5 minut při 4 °C). Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který představoval 2., trypsinovou frakci. Pelet buněk byl následně extrahován v 1 ml metanolu a mechanicky dezintegrován. Poté opět proběhla centrifugace (556  $\times$  g, 10 minut) a odebraný supernatant tvořil buněčnou frakci.

Všechny frakce byly nejprve přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku na koloně Discovery® DSC-18 SPE Tube. Jako elučního činidlo byl použit 1 ml metanolu. Následně došlo k zakoncentrování vzorků do 100  $\mu$ l metanolu. Přítomnost / množství NosA ve vzorcích bylo zjištěno pomocí HPLC-HRMS.

### ***3.3.7 Odmývací a trypsinizační experimenty***

Za účelem zjištění, zda NosA neinteraguje pouze s vnějšími proteiny buněk, byly provedeny trypsinizační experimenty. Při těchto pokusech byly buňky v testovacích jamkách po odstranění média s testovanou látkou dvakrát promyty PBS a bylo k nim přidáno 100  $\mu$ l trypsinu. Uvolněné buňky byly přeneseny do mikrozkuhavek a centrifugovány (280  $\times$  g, 5 minut, 4 °C). Následně byl supernatant odebrán a pelet propláchnut PBS. Poté se celý proces centrifugace opakoval. Nakonec byl pelet buněk resuspendován v kultivačním médiu, byla stanovena požadovaná koncentrace buněk a buňky byly přeneseny na kultivační panel.

U odmývacích experimentů došlo v testovacích jamkách, po odstranění média s testovanou látkou a omytí kultury PBS pufrem, k náhradě média bez testovací látky. Ošetřené buňky byly sledovány pomocí časověné mikroskopie další 72 hodin.

### ***3.3.8 Experimenty s RO-3306***

Za účelem stanovení závislosti efektu NosA na fázi buněčného cyklu byly buňky nejprve synchronizovány v G2/M fázi buněčného cyklu a posléze vystaveny působení NosA. Při těchto experimentech byl k synchronizaci buněčné kultury použit selektivní inhibitor CDK1 kináz RO-3306. Buňky byly preinkubovány s 10  $\mu$ M RO-3306 po dobu 18 hodin. Po této době bylo stávající médium nahrazeno standardním RPMI 1640 s/bez NosA. Buňky byly v co nejkratším časovém horizontu umístěny do mikroskopu a sledovány pomocí časověné mikroskopie.

### **3.3.9 Měření množství ATP v čase**

Hela buňky byly kultivovány na bílém netransparentním panelu ( $1 \times 10^4$  buněk na jamku). Hladina ATP byla kvantifikována ve stanovených časových intervalech a za použití CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Při esaji bylo postupováno podle pokynů výrobce.

Luminiscence byla měřena s integračním časem 1 s pomocí multifunkčního readeru Tecan Infinite 200. Výsledné hodnoty jsou udávány v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU).

### **3.3.10 Fluorescenční barvení mitochondrií**

#### **3.3.10.1 MitoTracker™ Green FM**

MitoTracker™ Green FM je zeleně fluoreskující mitochondriální barva, která se hromadí v lipidovém prostředí mitochondrií bez ohledu na mitochondriální potenciál.

Hela buňky byly kultivovány na panelu se skleněným dnem ( $1 \times 10^4$  buněk na jamku). Buňkám bylo odebráno původní kultivační médium a nahrazeno 100  $\mu$ l média (bez FBS, L-glutaminu, antibiotik, antimykotik) s MitoTracker™ Green FM (100 nM). Inkubace s barvou probíhala po dobu jedné hodiny za běžných kultivačních podmínek. Po uplynutí této doby bylo médium nahrazeno standardním RPMI 1640 médiem. Mitochondrie byly pozorovány na fluorescenčním invertním mikroskopu při objektivovém zvětšení 100x.

#### **3.3.10.2 MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos**

MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos využívá fluorescenční látku, která je po vstupu do dýchacího řetězce mitochondrií oxidována do fluorescenčního stavu.

Hela buňky byly kultivovány na sklíčku ( $1 \times 10^4$  buněk na jamku). Buňkám bylo odebráno původní kultivační médium a nahrazeno 100  $\mu$ l média (bez FBS, L-glutaminu, antibiotik, antimykotik) s MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (200 nM). Po jedné hodině bylo médium odebráno, buňky řádně promyty PBS a fixovány 3,7% formaldehydem po dobu 15 minut. Po fixaci byly buňky omyty PBS a permeabilizovány pomocí 0,25% tritonu-X po dobu 10 minut. Mezi jednotlivými kroky byly buňky vždy pečlivě promyty PBS. Sklíčko bylo pomocí „*mounting*“ gelu připevněno k podložnímu sklíčku. Takto připravené vzorky byly uloženy v temnu při 4 °C. Mitochondrie byly pozorovány na fluorescenčním invertním mikroskopu při objektivovém zvětšení 100x. Fluorescenční signál byl snímán a kvantifikován pomocí inverzního mikroskopu ZEISS Axio Observer Z.1 při konstantním expozičním čase. Průměrná hodnota signálu byla u jednotlivých buněk vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ.

### ***3.3.11 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A***

Za účelem testování, zda je efekt NosA závislý na vstupu D- glukózy do buňky, byl použit inhibitor glykolýzy a analog glukózy - 2-deoxy-D-glukóza. Ta byla do standartního kultivačního média přidána tak, aby výsledný poměr vůči D- glukóze v médiu byl 1:1 (tj. v koncentraci 2mg/mL). Jako mitochondriální inhibitor byl použit 50nM oligomycin A. Při experimentech byl sledován vliv těchto látek v různých kombinacích a s/bez přídatku NosA. Pro ohodnocení efektu těchto pokusných kombinací bylo použito měření množství ATP v buňce v čase 24 a 48 hodin pomocí kitu CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (viz výše).

## 4. Výsledky

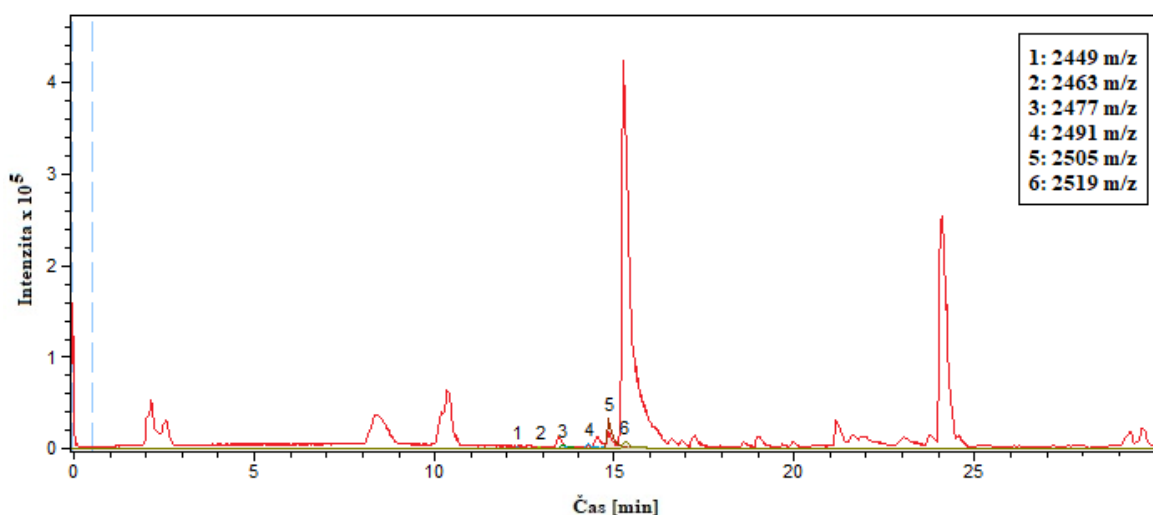
Tato práce navazuje na výzkum, který jsem prováděla v rámci mé bakalářské práce v laboratoři řasové biotechnologie Centra Algatech, Mikrobiologického ústavu AV ČR- vědecké pracoviště Třeboň. Ze sinice *Desmonostoc muscorum* CALU 456 se naší skupině podařilo izolovat pravděpodobně novou organickou látku o  $m/z$  2505, která je v této práci nazývána nostatinem A (NosA). Tato látka vykazovala inhibiční účinek vůči HeLa a PaTu buněčným liniím v nanomolárních koncentracích (Vicková, 2015). Rozhodli jsme se proto, provést s NosA další experimenty, za účelem bližšího prozkoumání jeho biologické aktivity.

### 4.1 Izolace NosA a jeho přírodních analogů

Prvním krokem byla samotná izolace NosA a jeho přírodních analogů. Jak bylo zjištěno, NosA má dalších pět přírodních strukturních analogů se snižující se molekulární vahou o inkrement 14 Da (Gajarská, 2017). Izolace byla proto optimalizována tak, aby při ní bylo získáno, pokud možno, všech šest strukturních variant v množství a čistotě dostatečných pro biologické experimenty.

#### 4.1.1 Extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku

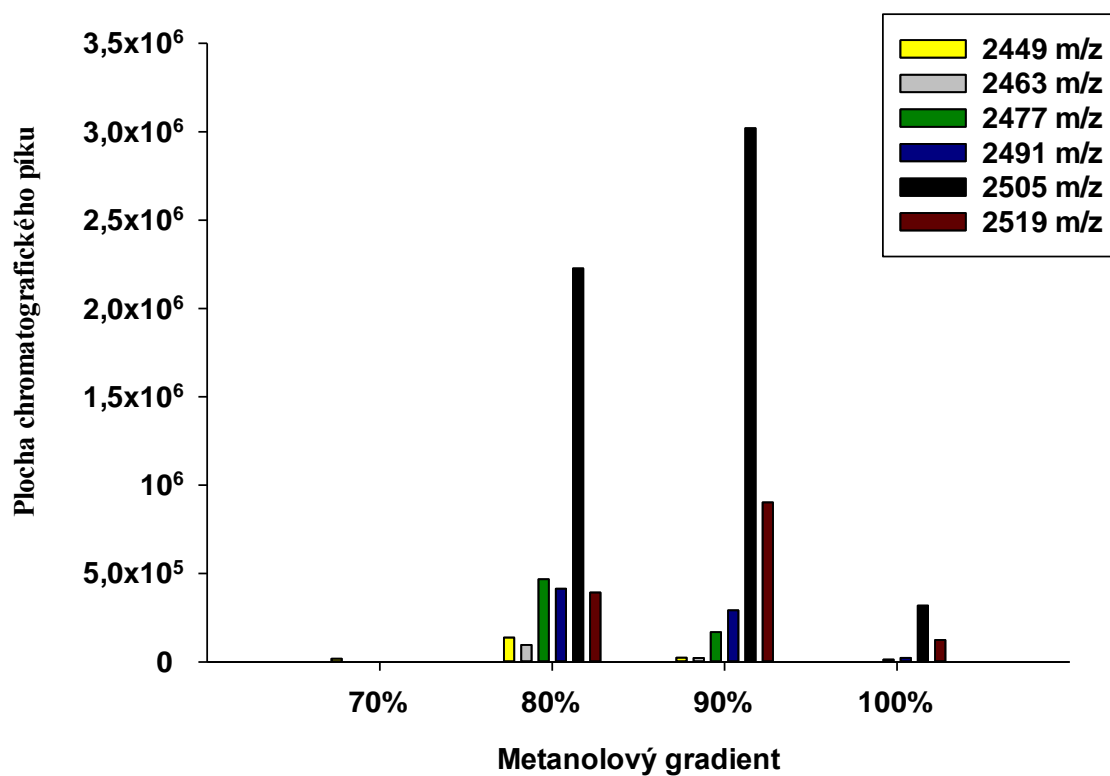
Za účelem primárního přečištění byl surový extrakt, jehož „base peak“ chromatogram je znázorněn na obrázku 8, přečištěn pomocí extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku.



Obr. 8: „Base peak“ chromatogram surového extraktu ze sinice *Desmonostoc muscorum* CALU 456. Čísla uvedená nad některými chromatografickými píky znázorňují retenci NosA a jeho přírodních analogů, přičemž pozice 5 odpovídá retenci NosA.



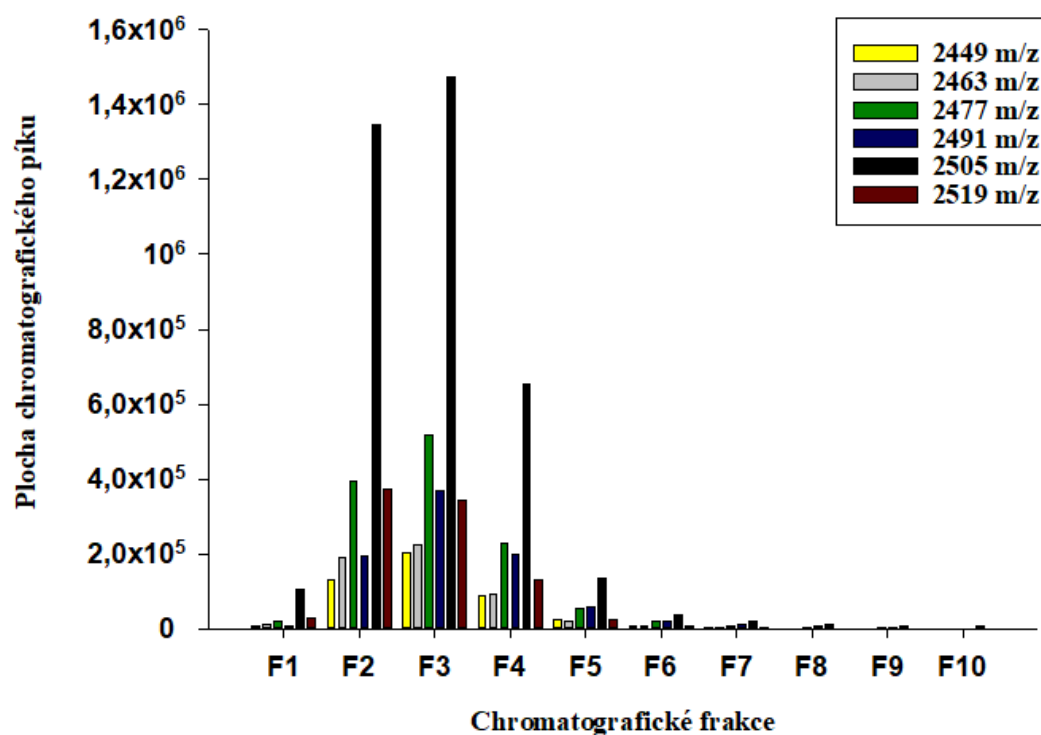
Získané chromatografické frakce byly zpětně analyzovány pomocí HPLC-HRMS. Na základě analýzy byl zjištěn poměr izolovaných látek obsažených v jednotlivých frakcích (Obr. 9). Pro další purifikaci byly použity frakce s nejvyšším obsahem NosA a jeho strukturních analogů, tedy frakce získané elucí 80% a 90% metanolem. Jejich společná navážka činila 350 mg.



Obr. 9: Extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku – obsah požadovaných látek v metanolvých frakcích.

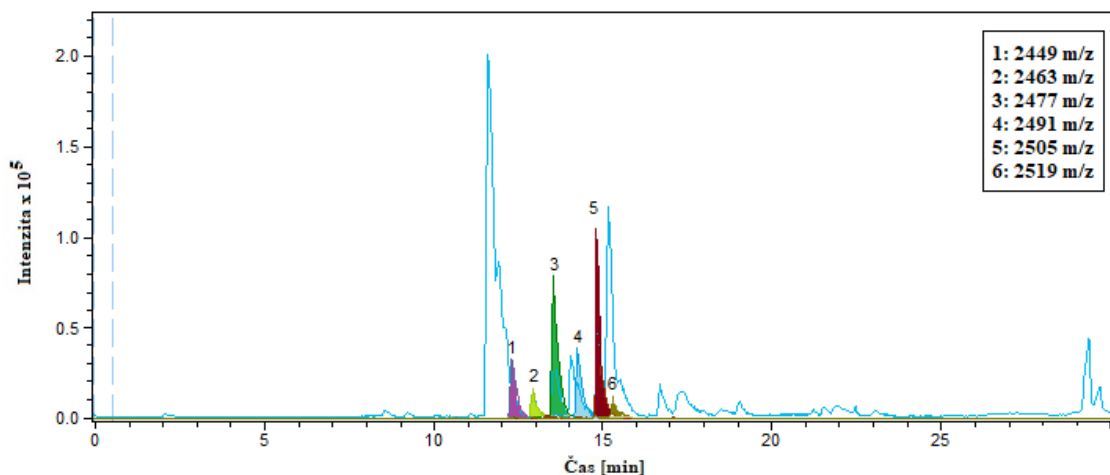
### 4.1.2 Gelová chromatografie

Jako další předčišťovací krok byla použita gelová chromatografie. Nejvíce požadovaných látek obsahovaly frakce F2, F3 a F4 (Obr. 10). Jejich společná navážka se rovnala 180 mg. Tyto frakce byly dále použity pro finální purifikaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.



Obr. 10: Gelová chromatografie- obsah požadovaných látek v jednotlivých frakcích.

Na obrázku 11 je „*extracted ion*“ chromatogram frakcí získaných po gelové chromatografii. V porovnání s obrázkem 8 je patrné, že došlo k částečnému odstranění nežádoucích látek, což bylo účelem prvních dvou kroků izolace.



**Obr. 11:** „*Extracted ion*“ chromatogram frakcí získaných po gelové chromatografii.

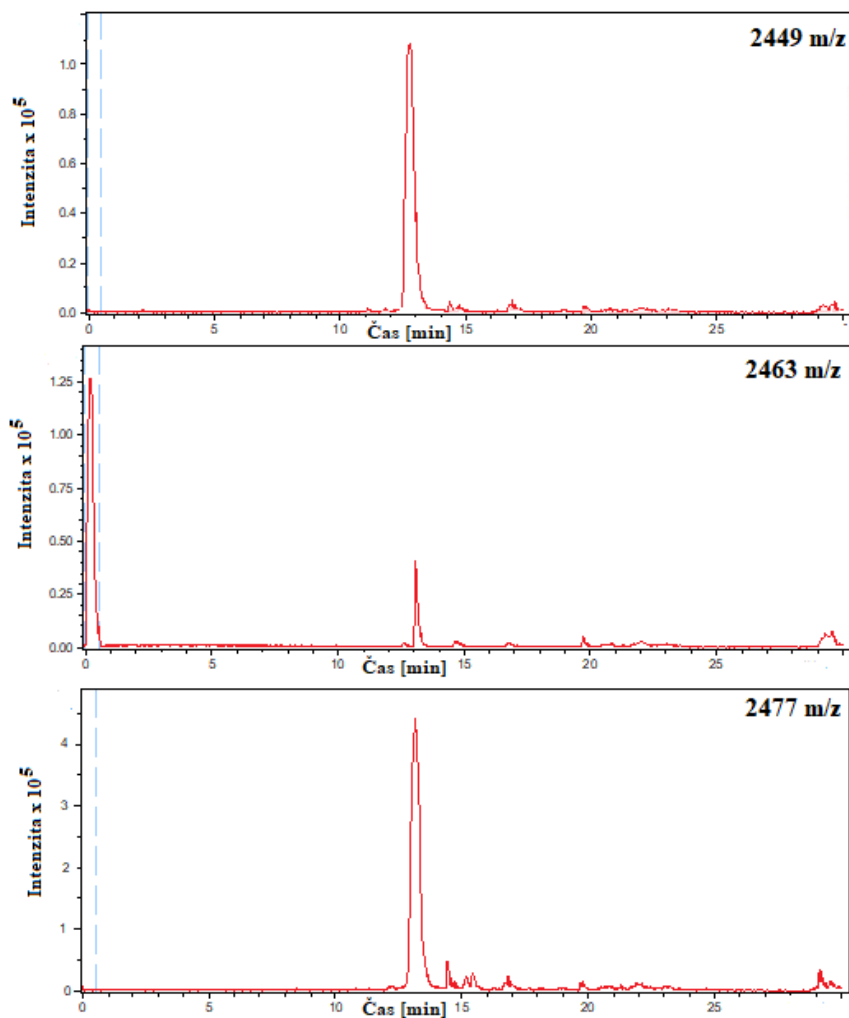
#### 4.1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Finální purifikace byla provedena dvoustupňově, přičemž v prvním kroku jsem provedla oddělení jednotlivých strukturních variant NosA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (viz metodika) a v následném kroku došlo ke konečnému přečištění. Navážka jednotlivých variant po prvním kroku izolace provedeném a navážka finálních produktů je uvedena v tabulce II. Z výsledků je patrné, že již pouze ve finálním purifikačním kroku dochází k 50% ztrátám získávaných látek.

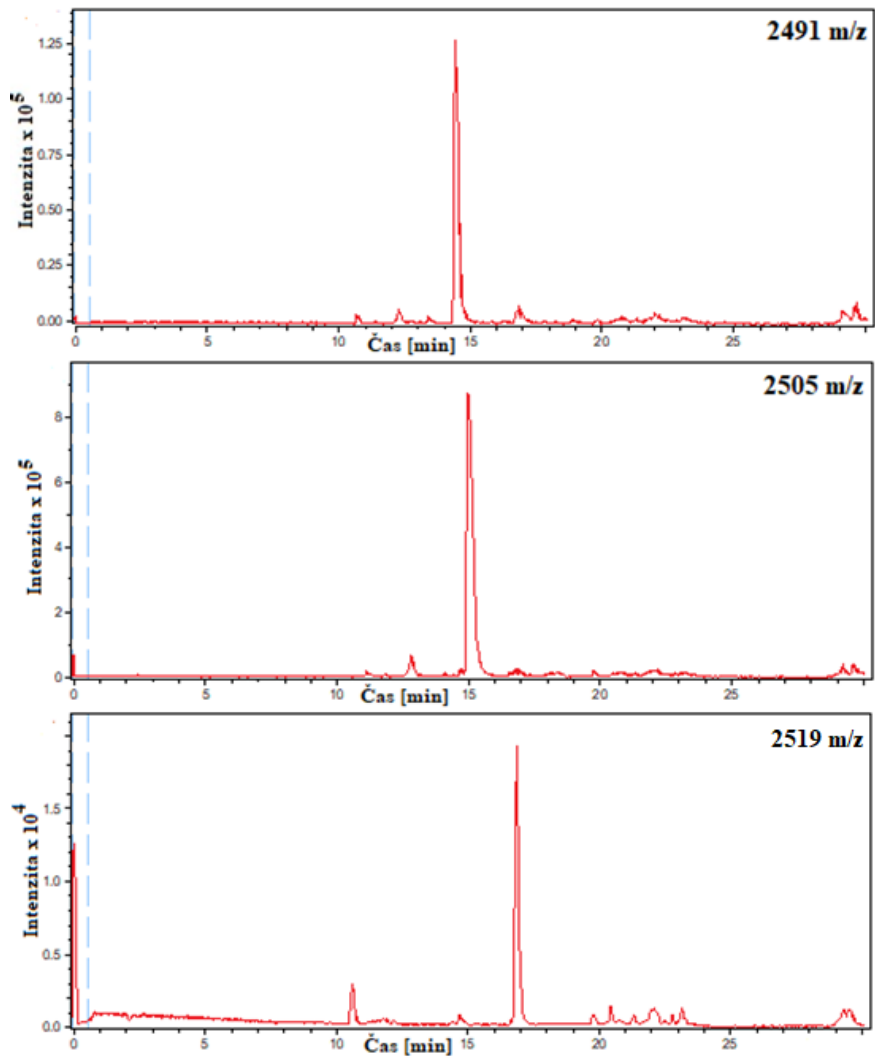
**Tab. II:** Navážky jednotlivých izolovaných látek po 1. a 2. kroku finální purifikace.

Varianta	1. krok	2. krok
2449 m/z	1,8 mg	0,8 mg
2463 m/z	1,2 mg	0,4 mg
2477 m/z	2,2 mg	1,0 mg
2491 m/z	1,7 mg	0,9 mg
2505 m/z	4,1 mg	2,1 mg
2519 m/z	0,9 mg	0,3 mg

Následující obrázky (Obr. 12, 13) představují „*extracted ion*“ chromatogramy jednotlivých variant. Biologické experimenty byly provedeny s pěti strukturálními analogy, jejichž čistota přesahovala 95% a navážka byla větší než 0,3 mg.



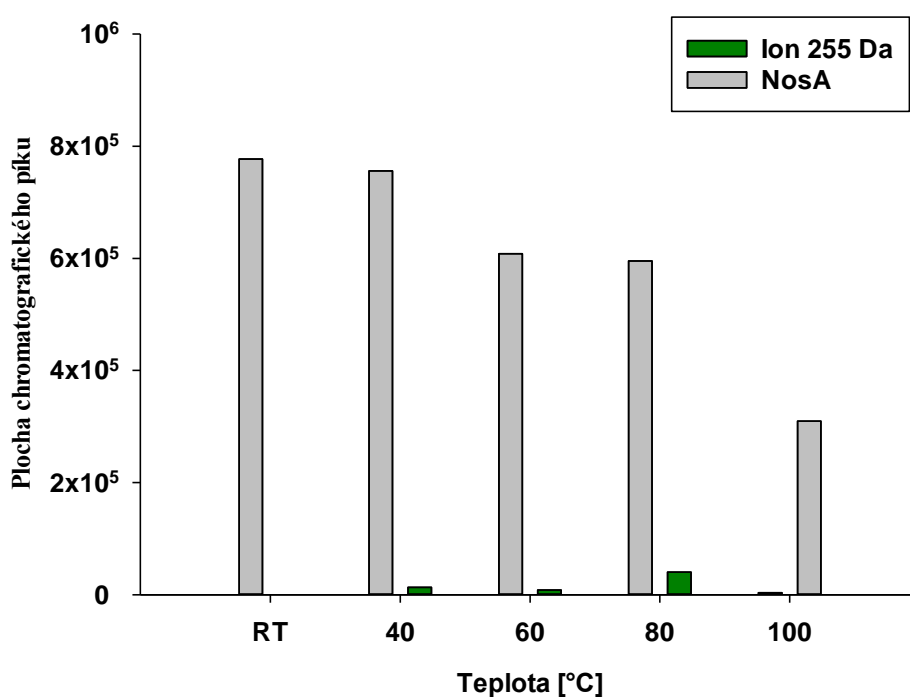
Obr. 12: „*Extracted ion*“ chromatogramy variant 2449 *m/z*, 2463 *m/z* a 2477 *m/z*.



Obr. 13: „*Extracted ion*“ chromatogramy variant 2491 m/z, 2505 m/z (NosA) a 2519 m/z.

## 4.2 Teplotní stabilita NosA

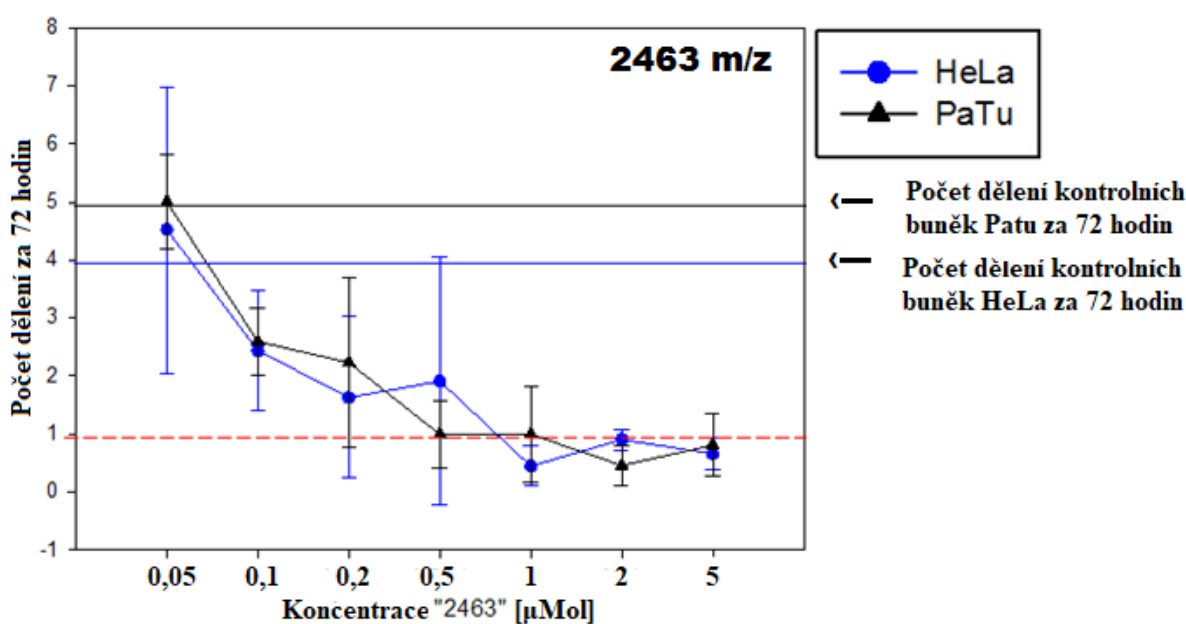
Cílem testování teplotní stability bylo zjistit, zda nedochází k rozkladu molekuly a zda případný rozklad nemůže ovlivnit biologická a chemická měření. Po 24 hodinách ponechání látky v uvedených teplotních podmínkách (Obr. 14) bylo zjištěno, že testovaná látka je vysoce termostabilní. Zanedbatelná míra degradace byla zjištěna v 40 °C, výrazněji byla molekula degradována až při 60 °C. Při teplotě 100 °C je degradována přibližně polovina z původního množství NosA. Navíc, při vyšších teplotách byl zaznamenán příbytek iontu o velikosti 255 Da.



Obr. 14: Teplotní stabilita po 24 hodinách setrvání NosA v uvedených teplotách (RT-pokojeová teplota).

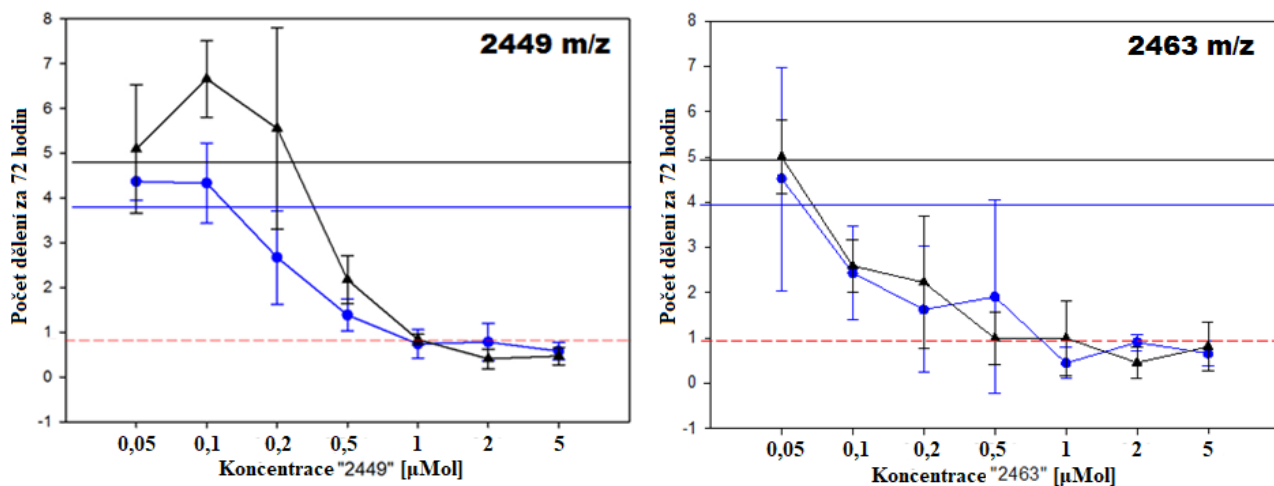
### 4.3 Stanovení IC<sub>50</sub> NosA a jeho přírodních analogů

Tato série pokusů byla provedena za účelem stanovení inhibiční koncentrace NosA a jeho čtyř přírodních analogů, při které dochází k 50% zamezení růstu testovaných buněčných linií. Obrázek 15 slouží jako ilustrační. Popisuje uspořádání použitých grafů. Grafy zobrazují závislost počtu dělení buněk za dobu 72 hodin na koncentraci testované látky. Přírodní analogy byly testovány na dvou buněčných liniích – HeLa a PaTu. NosA byl testován pouze na buněčné linii HeLa.



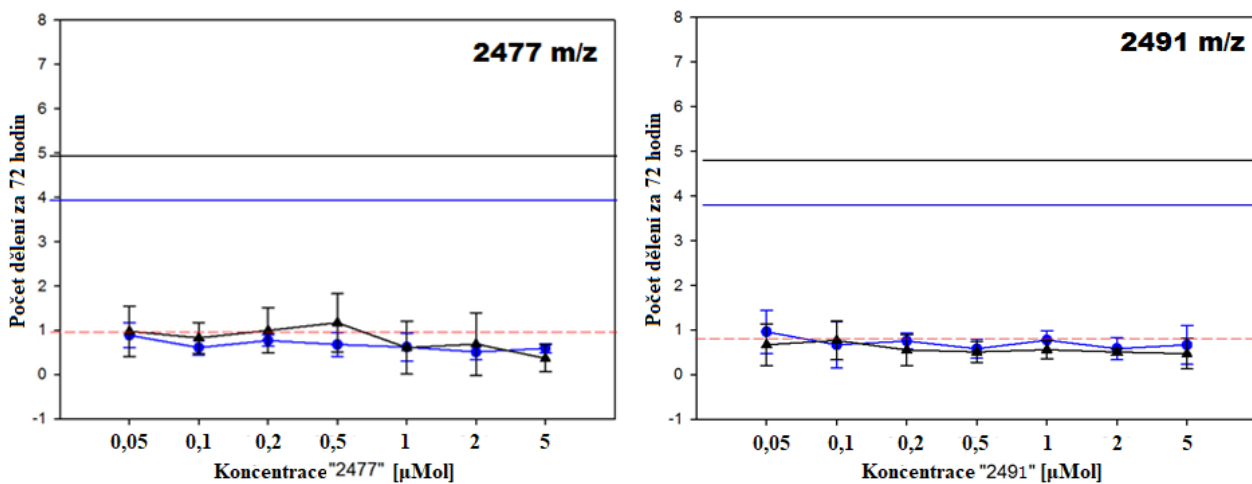
Obr. 15: Ilustrační obrázek popisující uspořádání grafů znázorňujících závislost počtu dělení za 72 hodin vůči koncentracím NosA a jeho analogů.

U přírodních variant NosA se neprokázala výrazná specifita účinku vůči jedné či druhé testované linii. U variant 2449 m/z a 2463 m/z se u koncentrací vyšších než 1 µMol buňky za 72 hodiny rozdělili pouze jedenkrát, oproti kontrolním buňkám, které se za stejný časový úsek rozdělí 3,8krát (HeLa) a 4,9krát (PaTu) (Obr. 16).



**Obr. 16: Závislost počtu dělení za 72 hodin na koncentracích přírodních analogů NosA 2449 m/z a 2463 m/z.**

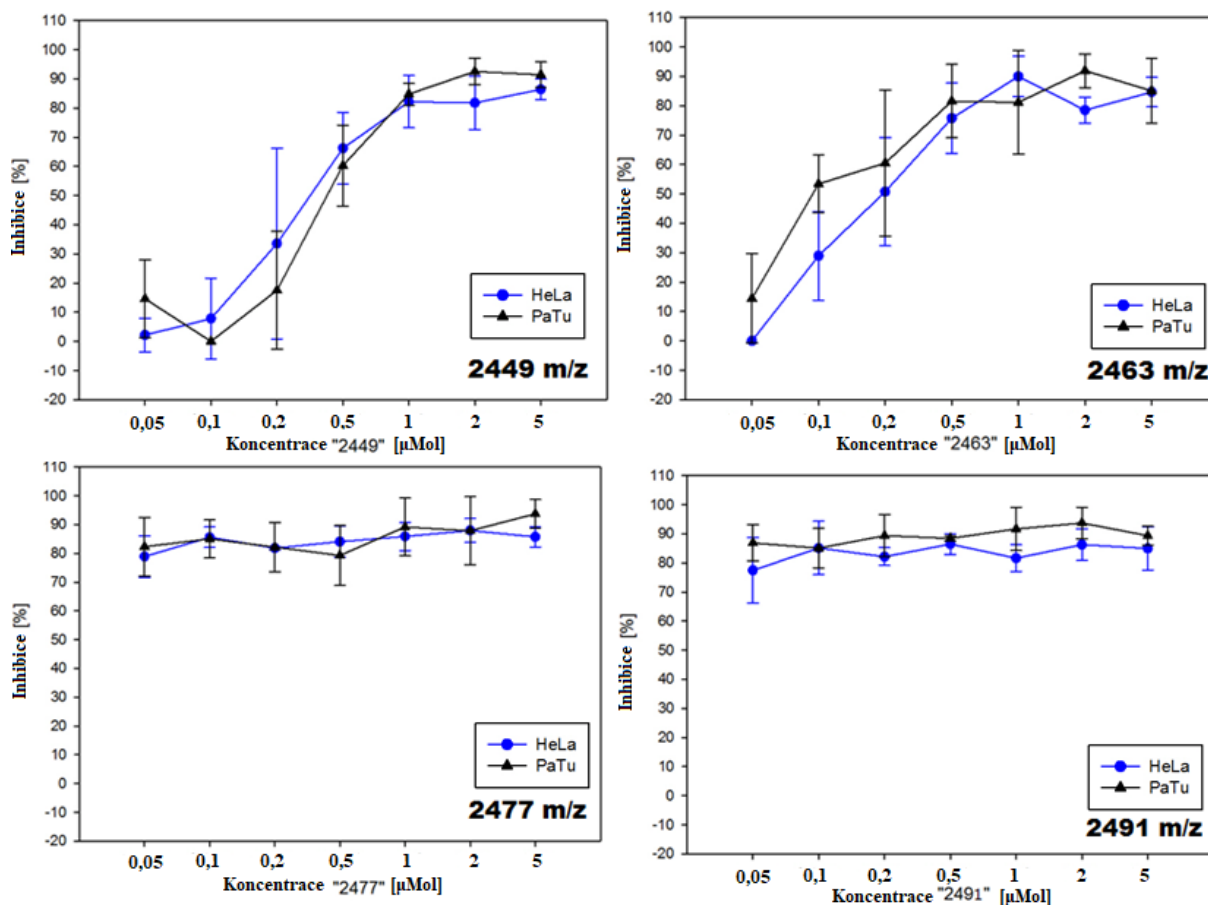
Zbývající dva testované přírodní analogy NosA, látky 2477 m/z a 2491 m/z, se jevily jako účinnější. Při všech testovaných koncentracích NosA, včetně nejnižší použité koncentrace 50 nMol se buňky nerozdělily více než jedenkrát za dobu 72 hod (Obr. 17).



**Obr. 17: Závislost počtu dělení za 72 hodin na koncentracích přírodních analogů NosA 2477 m/z a 2491 m/z.**



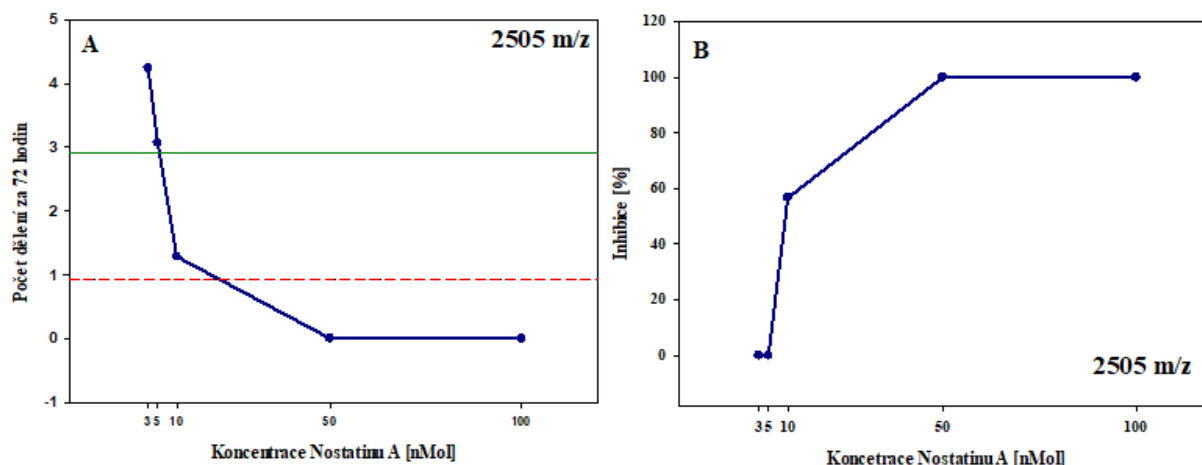
Následující obrázek ilustruje míru inhibice buněčné proliferace v závislosti na koncentraci testovaný látek.



**Obr. 18: Inhibice buněčné proliferace v závislosti na koncentraci přírodních analogů NosA.**

Pro varianty 2449 m/z a 2463 m/z je míra inhibice závislá na koncentraci testovaných látek. U analogů 2477 m/z a 2491 m/z se inhibice buněčné proliferace pohybuje v rozmezí 70 až 100% pro všechny testované koncentrace.

U NosA bylo stanovení  $IC_{50}$  provedeno obdobným způsobem. Podle předpokladu, že jeho  $IC_{50}$  se bude pohybovat v hodnotách nižších než 50 nMol, byly testovány i nižší koncentrace této látky (Obr. 19).



**Obr. 19: A: Závislost počtu dělení za 72 hodin na koncentraci NosA, B: Závislost inhibice buněčné proliferace na koncentraci NosA.**

Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé varianty jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. III). Ačkoliv se mi nepodařilo získat výsledky přesné hodnoty  $IC_{50}$  pro všechny analogy NosA, je z výsledků patrné, že inhibiční aktivita přírodních variant NosA roste se vzrůstající molekulární vahou molekuly.

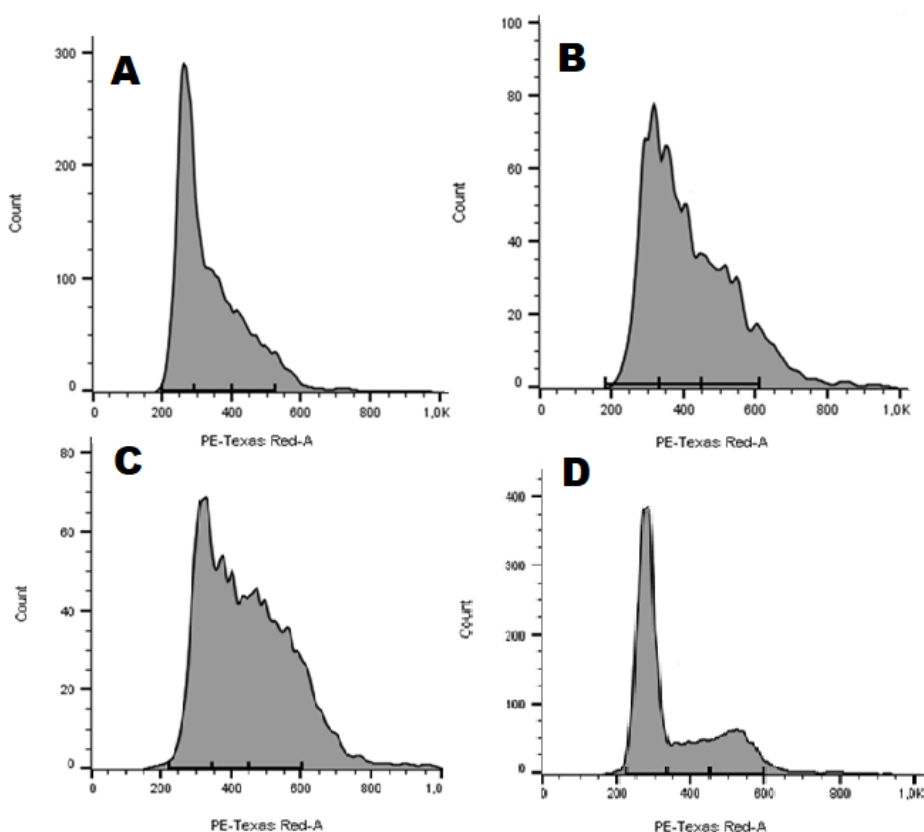
**Tab. III: Hodnoty  $IC_{50}$  NosA a jeho přírodních analogů vůči buněčné linii HeLa.**

HeLa		
Látka [m/z]	$IC_{50}$ [nMol]	Směr. odchylka
2449	430	140
2463	120	20
2477	< 50	NA
2791	< 50	NA
2505	9	NA

## 4.4 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA

Z předchozích pokusů, získaných za pomoci časosběrné mikroskopie, bylo zřejmé, že naprostá většina buněk inkubovaných s NosA se rozdělí právě jedenkrát a následně dojde k zástavě buněčného cyklu. Pro zjištění, v jaké fázi se buněčný cyklus zastaví, bylo použito metod průtokové cytometrie. Podle analýzy je patrné, že dochází ke kumulaci buněk v S (G2) fázi. Kvantitativní rozbor získaných dat je velmi komplikovaný, jelikož z výsledků je patrné, že došlo k výraznému celkovému posunu fluorescence jader k vyšším hodnotám fluorescence. Původní procentuální zastoupení populací v G1 (68 %), S (22 %) a G2 (10 %), tedy nebylo možné jednoznačně porovnat s ošetřenými buňkami.

První změny jsou viditelné už po 24 hodinách inkubace s NosA. S prodlužujícím se časem počet buněk v S (G2) fázi buněčného cyklu narůstá.

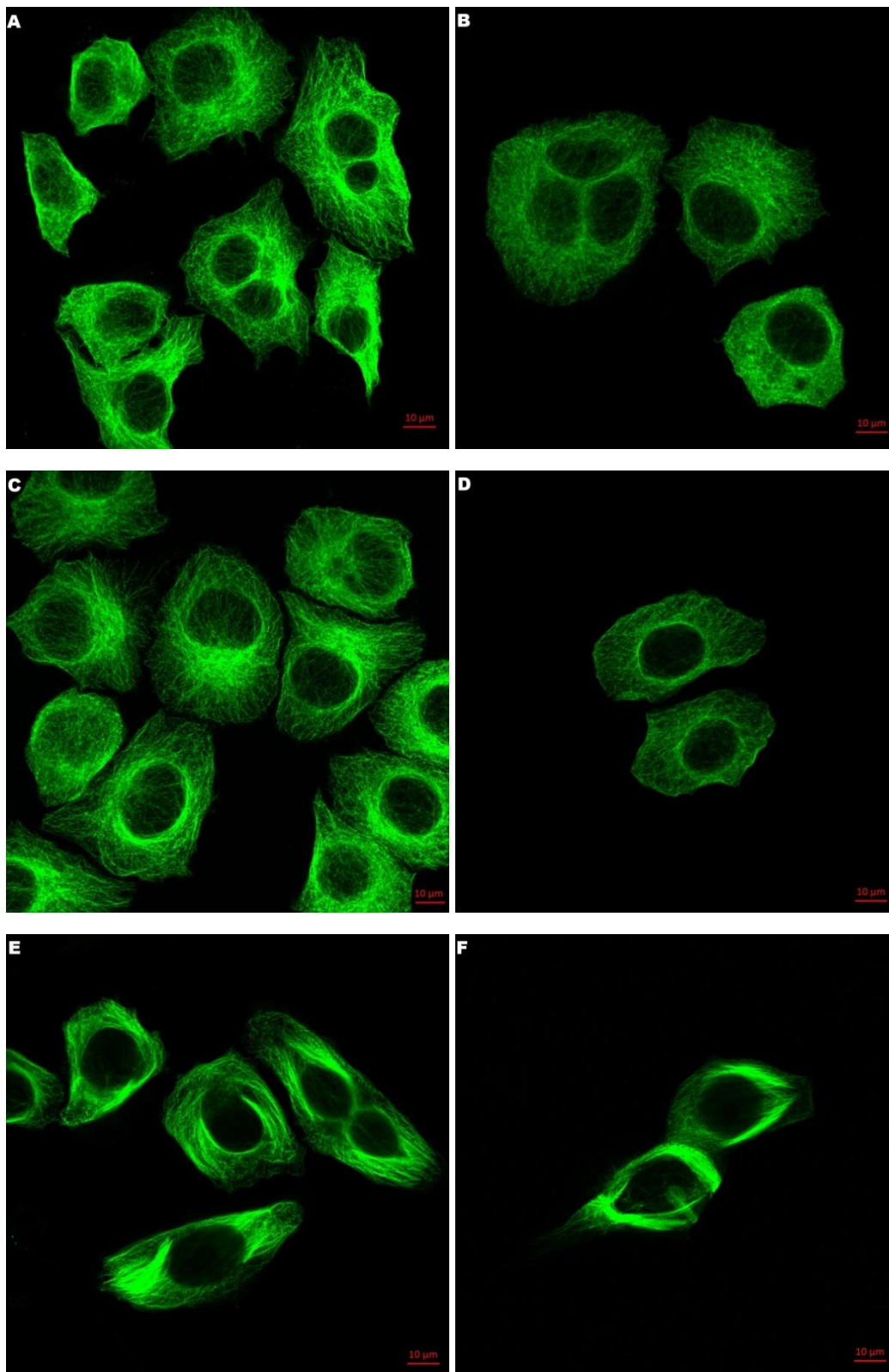


**Obr. 20:** Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie u HeLa buněk inkubovaných s NosA (200nMol) po dobu **A:** 24 hodin, **B:** 48 hodin, **C:** 72 hodin, **D:** negativní kontrola

## 4.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu

Barvení aktinové a tubulární sítě bylo provedeno za účelem vizualizace případných patologických změn způsobených NosA. Jako pozitivní kontrola byl použit taxol, látka zabraňující depolymerizaci mikrotubulů. Jako negativní kontrola byl použit mitomycin C. Mitomycin C působí jako alkylační agens, alkyluje DNA a způsobuje zástavu v S fázi buněčného cyklu bez ovlivnění mikrotubulární sítě.

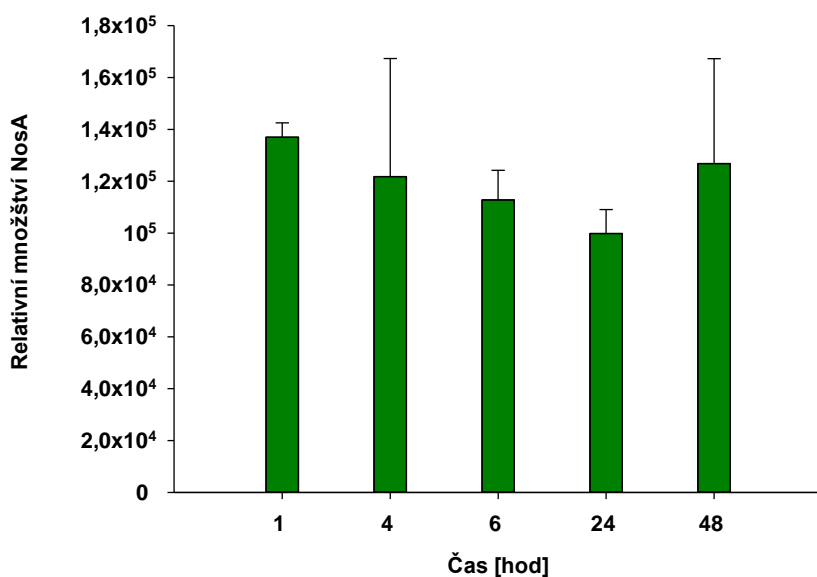
Jak je z obrázků patrné, v buňkách ošetřených NosA a mitomycinem C nedošlo ke změně morfologie tubulinu. Zatímco u buněk, které byly inkubovány s taxolem, se morfologie tubulární sítě výrazně odlišuje (Obr. 21). Aktinová síť se jevila rovněž jako NosA neovlivněná (obrázky nepřikládám).



**Obr. 21 : Obarvený aktin (HeLa buňky, 63x) A: NosA (50nM) 24h, B: NosA (50nM) 48h, C: Mitomycin C (1µM) 24h, D: Mitomycin C (1µM) 48h, E: Taxol (1µM) 24h, F: Taxol (1µM) 48h**

## 4.6 Distribuce NosA v kultivačním médiu/buňkách

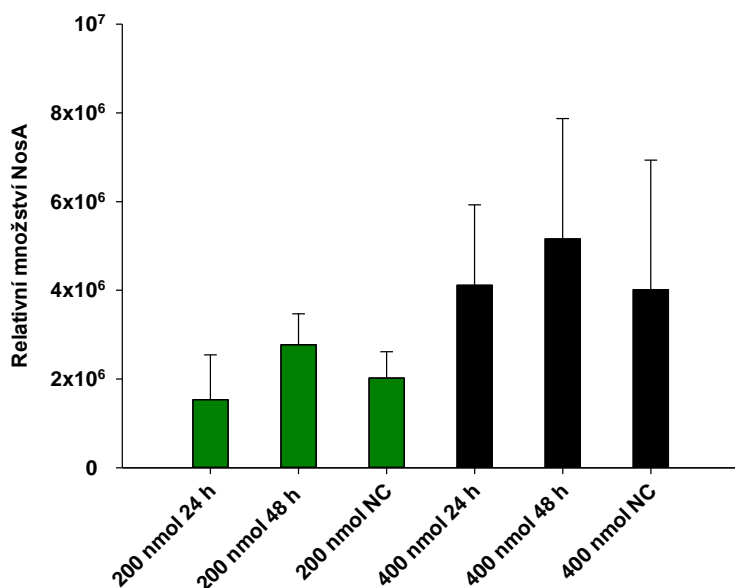
Za účelem zjištění, zda je NosA přijímán buňkami, byla provedena analýza média v uvedených časových intervalech od přidání NosA (Obr. 22). K těmto experimentům nás vedl fakt, že NosA má poměrně vysokou molekulární hmotnost (2504 Da) a není tedy zcela jisté, zda působí intracelulárně nebo na buněčné membráně (např. přes receptor či interakcí s membránou).



Obr. 22: Vývoj hladiny NosA v kultivačním médiu během 48 hodin.

Hladina NosA se v kultivačním médiu buněk výrazně neměnila. V průběhu 48 hodinové inkubace byl zaznamenán mírný postupný pokles do 24 hodin inkubace. Na přesný vývoj koncentrace v médiu je velmi těžké usuzovat, jelikož naměřené koncentrace vykazovaly poměrně velkou variabilitu.

V dalším experimentu byly analyzovány 3 frakce, frakce buněčná, trypsinová a kultivační médium, získané od buněk kultivovaných s NosA ve dvou koncentracích po dobu 24 a 48 hodin. Ve frakci buněčné a trypsinové nebyl NosA přítomen. V kultivačním médiu se jeho hladiny pohybovaly v hodnotách odpovídající přidavku na počátku (Obr. 23).



**Obr. 23: Distribuce NosA v kultivačním médiu.** NC- kontrola odpovídající RPMI médiu bez buněk s přidavkem NosA.

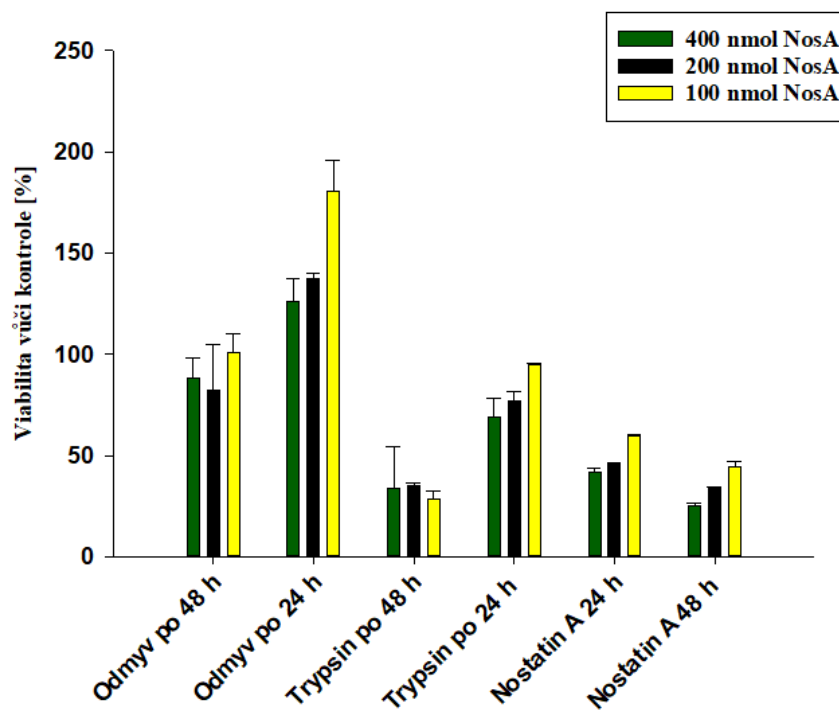
I přes poměrně velkou variabilitu dat je z obou experimentů zřejmé, že NosA je po celou dobu přítomen v kultivačním médiu ve svojí původní formě a v koncentraci odpovídající počátečnímu přidavku. Velkým překvapením je, že většina přidaného NosA byla po celou dobu kultivace nalezena v okolním médiu buněk a nikoliv uvnitř buněk. Tento výsledek vyplývá z faktu, že hladina NosA v médiu odebraném od buněk se výrazně neliší od kontroly (médiu bez buněk s přidavkem NosA).

## 4.7 Odmývací a trypsinizační experimenty

Cílem této série pokusů bylo zjistit, zda odstranění NosA od testovaných buněk po určité době expozice (24 a 48 hodin) zvrátí inhibiční účinek testované látky.

Jak je patrné z výsledků, odstranění NosA po 24 hodinách, a do vysoké míry po i 48 hodinách, buňky zachrání od inhibičního účinku testované látky a jejich viabilita je srovnatelná, či dokonce předčí, viabilitu buněk kontrolních.

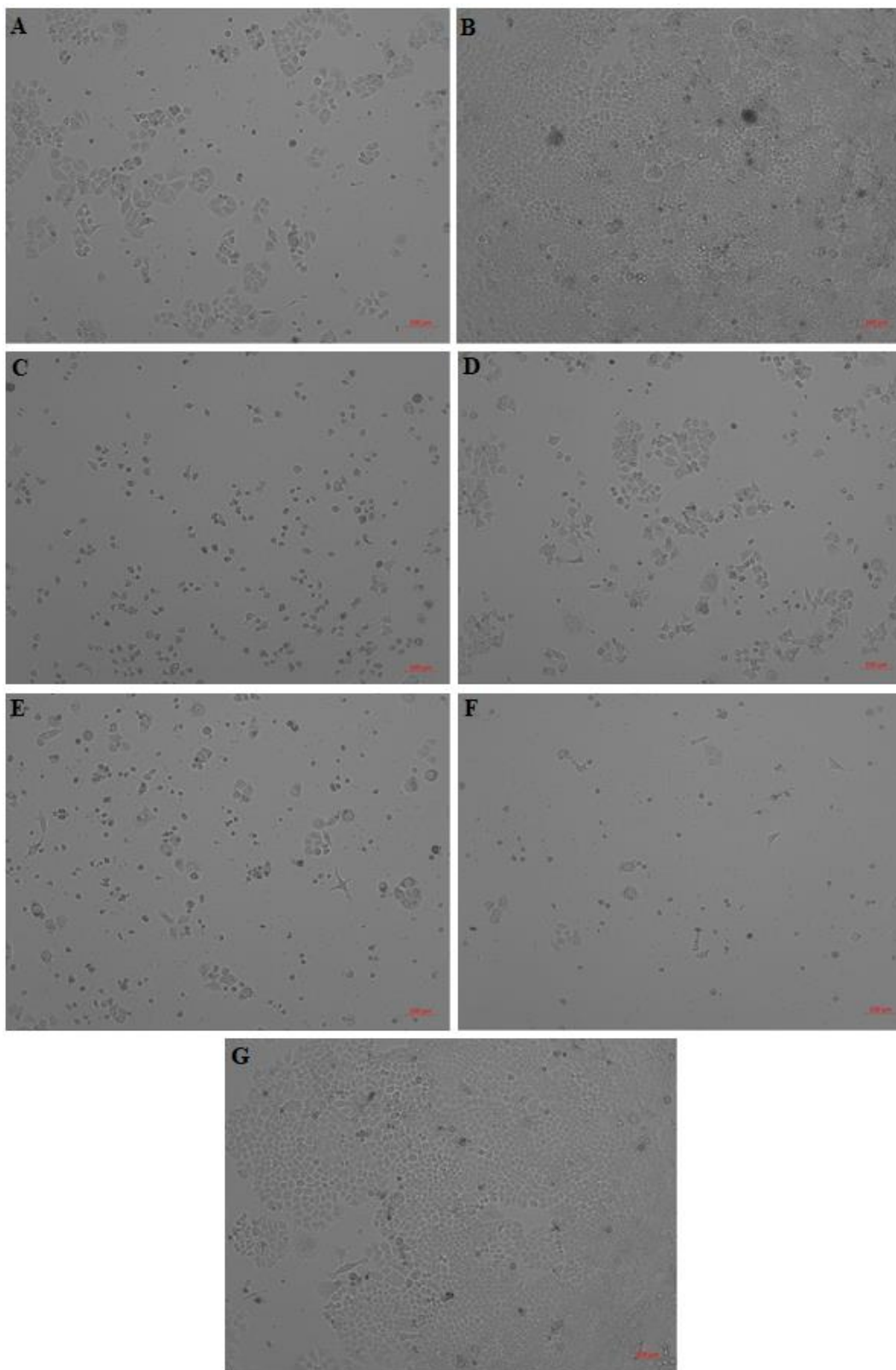
U trypsinizačních pokusů je situace odlišná. Buňky, které byly trypsinizovány po 24 hodinové inkubaci s NosA dosahují podobných hodnot viability jako buňky „odmyv po 48 h“. Buňky inkubované s testovanou látkou po dobu 48 hodin, a následně trypsinizované, dosahují nižších než polovičních hodnot viability ve srovnání s kontrolou.



**Obr. 24: Vliv odmytí a trypsinizace NosA na viabilitu buněk HeLa po 72 hodinách od odmyvu/trypsinizace.**

Na obrázku 25 je možné vidět konfluenci a morfologii buněk po 72 hodinách od odmyvu či trypsinizace.



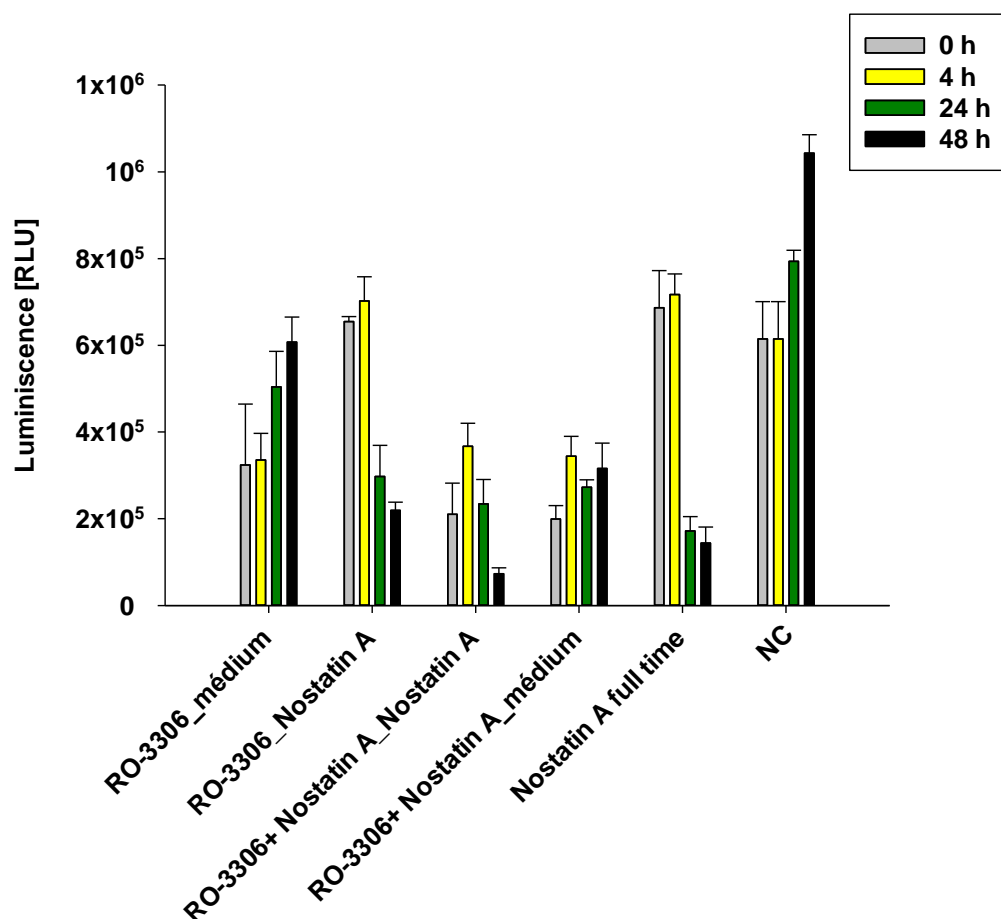


**Obr. 25: A: Buňky HeLa po 72 hodinách od A: Odmyvu NosA (400 nmol) po 48 hodinách, B: Odmyvu po 24 hodinách, C: Trypsinizace po 48 hodinách, D: Trypsinizace po 24 hodinách E: NosA 24 hodin, F: NosA 48h G: Negativní kontrola**

## 4.8 Experimenty s RO-3306

Cílem pokusu bylo zjistit, zda synchronizace buněk může ovlivnit efekt NosA ve smyslu oddálení či naopak uspíšení zástavy buněčného dělení. Preinkubace s farmakologickým inhibítorem CDK1 RO-3306 zastavila buňky na rozhraní G2/M fáze. Po odmytí RO-3306 byly buňky sledovány pomocí časosběrné mikroskopie. Na základě tohoto pozorování bylo zjištěno, že synchronizace buněčné kultury v G2/M fázi nemá vliv na efekt způsobený NosA. Synchronizované buňky se, po rozdělení způsobeném odmytím RO-3306, ještě jedenkrát rozdělí a následně dochází k zástavě buněčného cyklu.

Dalším výstupem u tohoto pokusu bylo naměření hladiny ATP ihned po odmyvu inhibítoru RO-3306, dále pak po 4, 24 a 48 hodinách (Obr. 26).

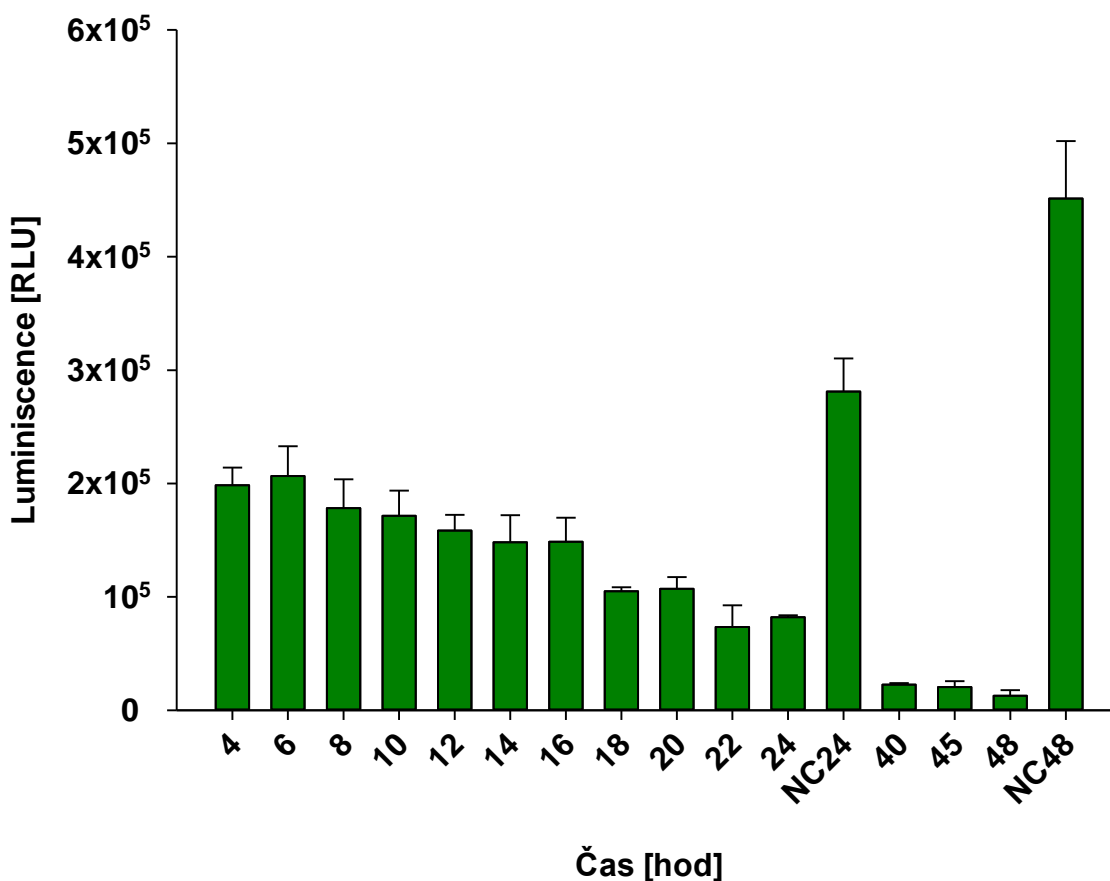


**Obr. 26: Hladina ATP v čase 0, 4, 24 a 48 hodin po odmyvu inhibítoru RO-3306 u buněk HeLa.** Kultura buněk HeLa byl vystavena různým pokusným podmínkám - přidavek NosA by proveden buď během či nebo synchronizaci. Například RO-3306 + Nostatin A\_ Nostatin A znamená, že buňky byly preinkubovány zároveň s RO-3306 i NosA a po odmyvu k nim byl přidán opět NosA.

Z výsledků je patrné, že po odmyvu RO-3306 se hladina ATP u buněk, ke kterým bylo přidáno pouze kultivační médium, zvyšuje. Naopak, pokud je ihned po odmyvu přidán NosA, dojde za dalších 24 hodinách ke snížení hladiny ATP téměř na polovinu původní hodnoty. V případě preinkubování buněk společně s RO-3306 a NosA a následného opětovného přidání NosA ihned po odmyvu, je snížení hladiny ATP ještě výraznější než v předchozím případě.

#### 4.9 Měření množství ATP v čase

Na základě předchozího experimentu s RO-3306 bylo zjištěno, že testovaná látka ovlivňuje hladinu ATP. Bylo proto provedeno podrobné měření časového průběhu koncentrace ATP u buněk inkubovaných s NosA (Obr. 27).

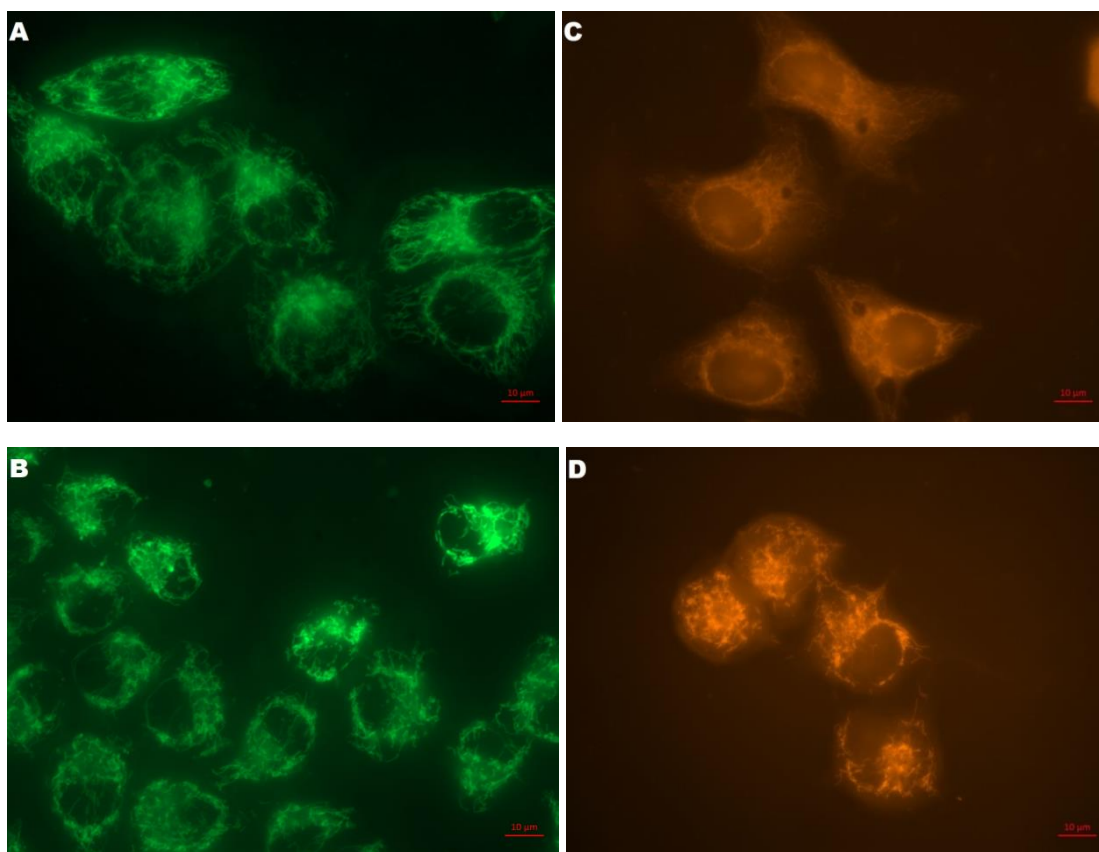


Obr. 27: Podrobný časový profil vývoje hladiny ATP u buněk HeLa po přidání NosA.

Naměřený profil ukazuje, že k poklesu ATP dochází pozvolna v průběhu času počínaje osmi hodinami inkubace s NosA. Po 24 hodinách inkubace s látkou je hladina ATP u testovaných buněk třetinová oproti kontrole. Ve 48 hodinách dojde ještě k výraznějšímu poklesu ATP na minimální hodnotu.

## 4.10 Fluorescenční barvení mitochondrií

Vzhledem k faktu, že v buňkách vystavených NosA dochází k výraznému poklesu hladiny ATP, jsem se rozhodla testovat případný vliv NosA na strukturu mitochondrií. Barvení mitochondrií pomocí MitoTracker® Green mělo za cíl vizualizovat mitochondrie a ohodnotit případné změny v jejich morfologii po inkubaci s NosA. Barvení pomocí MitoTracker™ Orange bylo zaměřeno na zhodnocení případných změn mitochondriálního membránového potenciálu. Jak je patrné z obrázku 28, ani jeden sledovaný parametr se významně nelišil u buněk ošetřených NosA a buněk kontrolních. Můžeme pozorovat pouze jemnou kondenzaci mitochondriální sítě, která by patrně neměla mít funkční význam.



**Obr. 28: Obarvené mitochondrie (HeLa buňky, 100x)** **A:** Negativní kontrola MitoTracker® Green, **B:** NosA (100nM) 24 h MitoTracker® Green, **C:** Negativní kontrola MitoTracker™ Orange, **D:** NosA (100nM) 24 h MitoTracker™ Orange

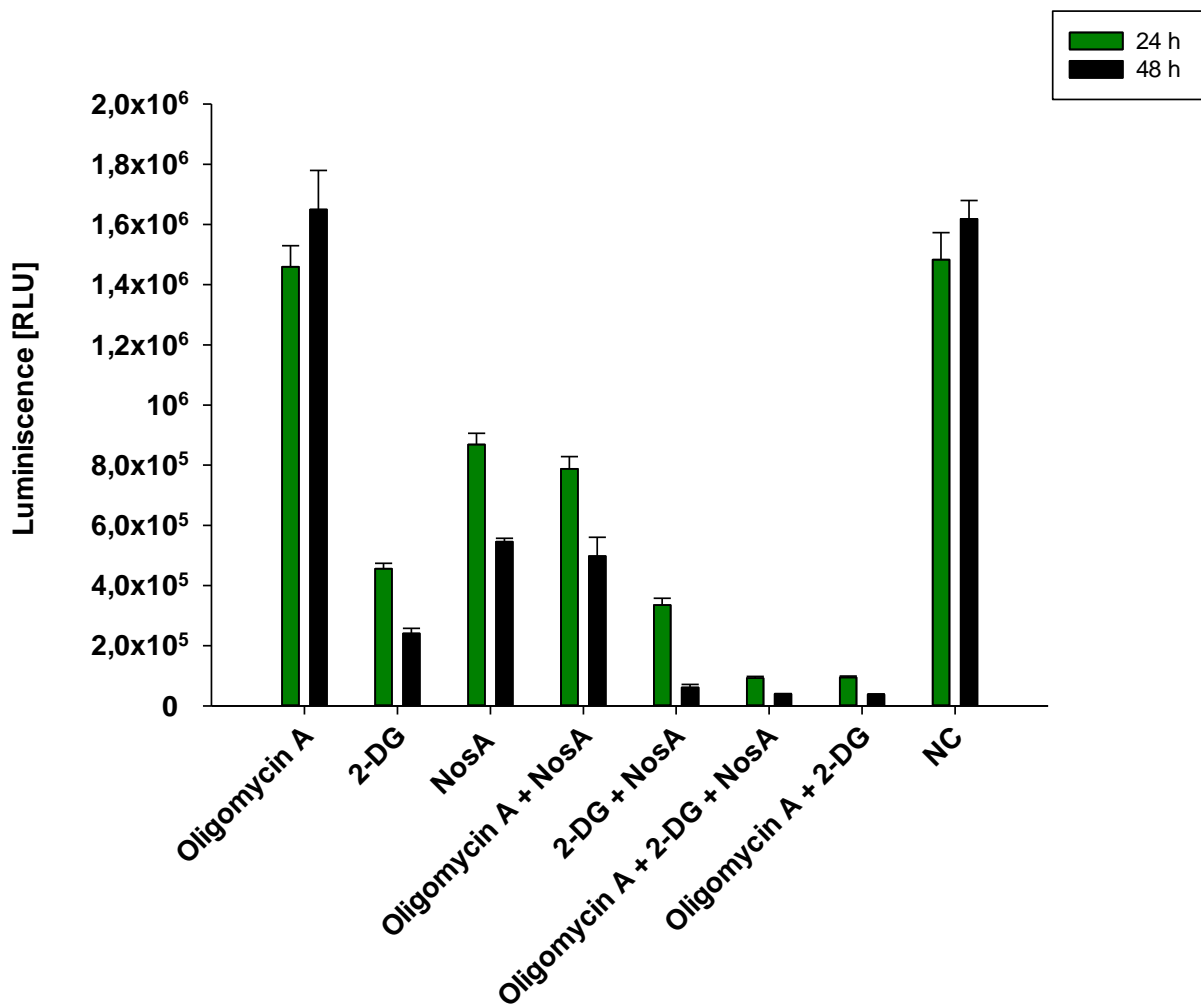
U buněk obarvených MitoTracker™ Orange byl naměřený fluorescenční signál dále kvantifikován prostřednictvím softwaru ImageJ. Z výsledků v tabulce IV je zřejmé, že u buněk ošetřených po 24 hodin NosA, nedošlo k poklesu fluorescenčního signálu oproti buňkám kontrolním.

**Tab. IV: Hodnoty fluorescenčního signálu u buněk inkubovaných s NosA po dobu 24 hodin a buněk kontrolních.**

	Fluorescenční signál	Směrodatná odchylka
NosA [100nMol]	71,48	14,42
Negativní kontrola	68,67	10,32

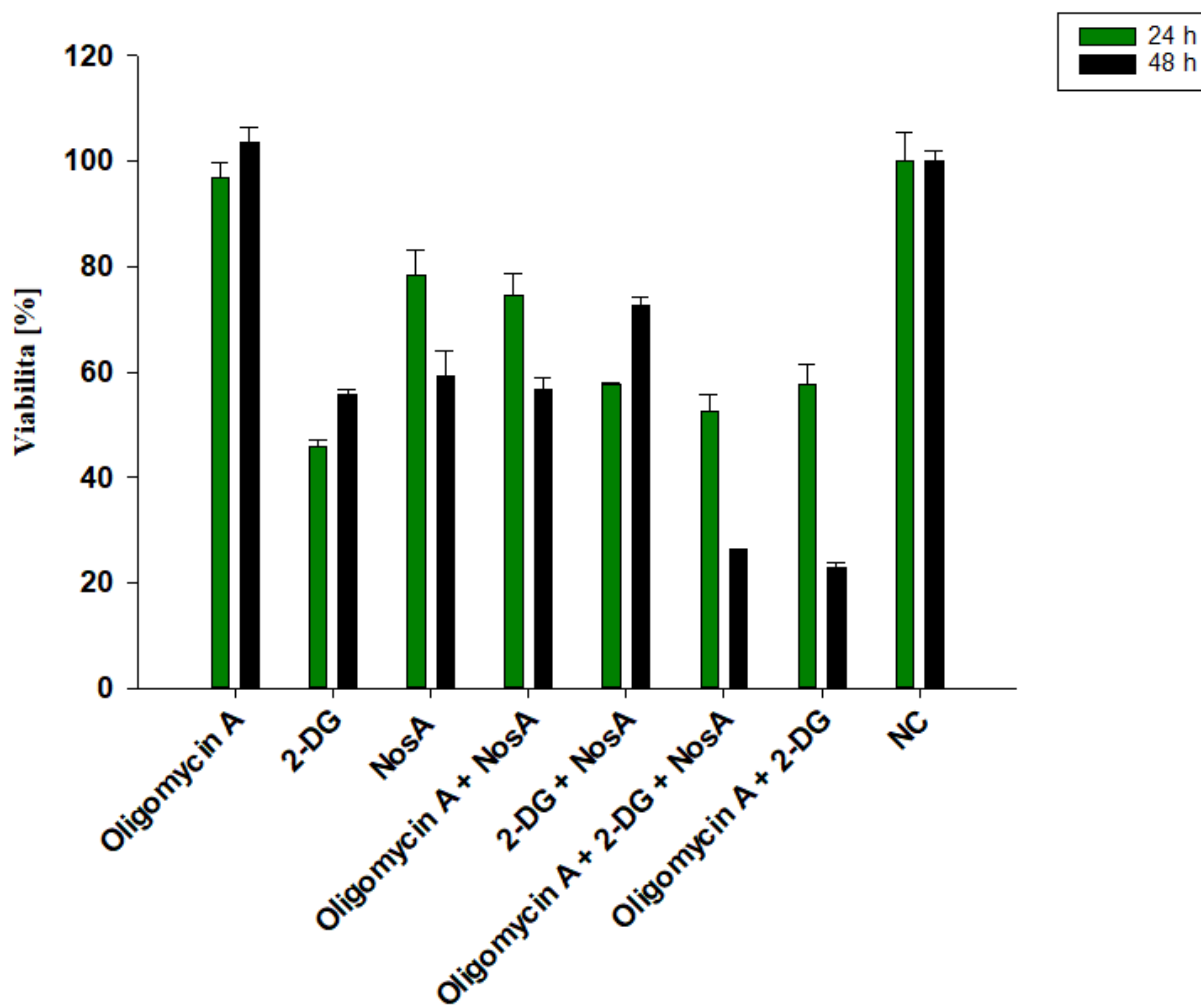
#### **4. 11 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A**

Tyto experimenty byly provedeny především za účelem vyšetření vlivu NosA na vstup glukózy do buňky. Jak je patrné z obrázku 29, při použití inhibitoru ATP-syntázy oligomycinu A zůstává hladina ATP oproti kontrolním buňkám nezměněná. Pokud je k buňkám přidán zároveň s oligomycinem i NosA, dojde k poklesu hladiny ATP přibližně o třetinu oproti kontrole. Přídavek samotného NosA způsobí v hladině ATP stejný pokles jako v předchozím popisovaném případě. Při inkubaci buněk pouze s 2-deoxy-D-glukózou, došlo u testovaných buněk k výraznému poklesu ATP, a to na třetinovou hodnotu oproti buňkám kontrolním. Tento pokles je srovnatelný s ošetřením buněk 2-deoxy-D-glukózou společně s NosA.



**Obr. 29: Hladina ATP po 24 a 48 hodinách od přidání NosA, 2-deoxy-D-glukózy, oligomycinu A a jejich vzájemných kombinací naměřená u buněk HeLa.**

Kromě hladiny ATP byla u tohoto typu pokusu zhodnocena viabilita buněk pomocí MTT testu. Naměřené hodnoty u jednotlivých testovaných látek a jejich kombinací si zachovávají stejný trend, jaký byl popsán při měření hladiny ATP, ovšem inhibice oproti kontrole ve zvolených časových intervalech nejsou tak výrazné (Obr. 30).



**Obr. 30: Viabilita po 24 a 48 hodinách od přidání NosA, 2-deoxy-D-glukózy, oligomycinu A a jejich vzájemných kombinací naměřená u buněk HeLa.**

## 5. Diskuze

### 5.1 Izolace a struktura NosA a jeho analogů

K izolaci NosA bylo použito 120 g sinicové biomasy, přičemž navážky získaných čistých látek se pohybovaly v řádech desetin až jednotek miligramů. Výsledek naznačuje, že by metoda izolace měla být v budoucnu, za účelem zvýšení výtěžku, optimalizována lépe.

Stávající metoda zahrnuje dva kroky hrubého přečistění (gelová filtrace a extrakce na pevné fázi) a dva kroky finální purifikace pomocí semipreparativní HPLC. Každý úkon navíc představuje riziko ztráty určitého množství izolované látky (vysrážení, manipulace se vzorkem apod.). Nově navržený postup izolace by měl tedy zahrnovat co možná nejméně mezikroků, a to především co se týče použití separace na reverzní fázi. Při ní došlo mezi prvním a druhým krokem ke ztrátám izolovaných látek větším než 50%, jak vyplývá z tabulky II. Vzhledem k relativně nízkým obsahům NosA a jeho analogů v biomase sinice bude v budoucnu vhodné využít metody, při nichž lze pracovat s většími objemy extraktu a nehrozí při nich vysoké riziko ztráty izolovaných sloučenin. Mezi takové metody můžeme zařadit například gelovou chromatografií nebo vysokoúčinnou „*Countercurrent*“ chromatografií (HPCCC).

Kromě varianty  $m/z$  2519 bylo množství získaných látek kvantitativně i kvalitativně dostačující pro pilotní biologické experimenty, což bylo hlavním účelem celé izolace. Navíc, NosA byl analyzován za účelem objasnění jeho struktury pomocí nukleární magnetické rezonanční spektrometrie. Tato metoda se bohužel ukázala jako nevhodná pro určení chemické struktury této sloučeniny (Ing. Marek Kuzma, Ph.D., laboratoř charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR, ústní sdělení). Přinesla pouze informaci, že molekula obsahuje pravděpodobně velké množství heterocyklických podjednotek a vyloučila přítomnost fosforu.

V současnosti probíhá velkoobjemová kultivace sinicové kultury v tisícilitrovém bioreaktoru. Po získání dostatečného množství biomasy bude provedena další velkoobjemová izolace NosA. Její výtěžek bude určen primárně pro objasnění chemické struktury studované látky, tentokrát pravděpodobně pomocí krystalografie.



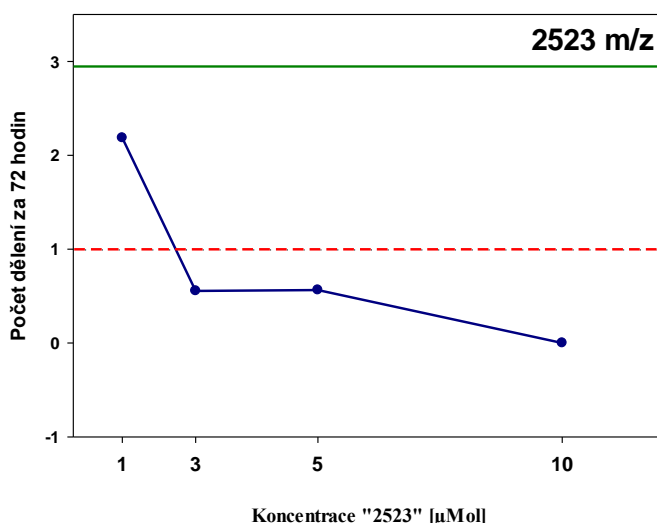
Znalost chemické struktury je pro další práci nezbytná. Dosud je nám o struktuře NosA známo velmi málo. Lze říci jen tolik, že se nejedná o peptid, což dokládají fragmentační spektra molekuly získané pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (Mgr. Jan Hájek, laboratoř řasové biotechnologie Centra Algatech, MBÚ AV ČR- vědecké pracoviště Třeboň, ústní sdělení). Je vysoce pravděpodobné, že se NosA skládá z několika podjednotek. Jednotlivé strukturní analogy se pak mezi sebou liší přítomností methylové skupiny nebo ketonu a dvojných vazeb v molekule.

## 5.2 Teplotní stabilita NosA

NosA se jeví jako termostabilní látka. Tato vlastnost podporuje tvrzení, že se nejedná o peptid, jelikož peptidová vazba by při vysokých teplotách nebyla stabilní. Inkubace buněk a testování vlastní bioaktivity probíhá při teplotě 37°C, proto by se NosA při experimentech v médiu neměl vlivem teploty rozkládat. Za pozorovanou biologickou aktivitu je tedy pravděpodobně zodpovědná molekula jako celek, nikoliv její rozpadový produkt.

## 5.3 IC<sub>50</sub> NosA a jeho přírodních analogů

NosA a jeho analogy se od sebe pravděpodobně liší jen malou záměnou v molekule, jak bylo popsáno výše. Rozdíl mezi jejich hodnotami IC<sub>50</sub> je však poměrně znatelný, přičemž s narůstající velikostí molekuly roste její cytostatický účinek (tj. 340 nM pro 2449 a 10 nM pro 2505 *m/z*). Během izolace navíc vznikla, pravděpodobně oxidovaná forma NosA (látka 2523 *m/z*). Tato látka byla rovněž podrobena experimentům za účelem stanovení její IC<sub>50</sub>. Jak je patrné z obrázku 31, hodnoty IC<sub>50</sub> se zde pohybují v řádech jednotek μmol.



Obr. 31: : Závislost počtu dělení za 72 hodin na koncentraci oxidované formy NosA.

Oxidovaná forma NosA je tedy přibližně stokrát méně účinná než samotný NosA. Tento jev lze vysvětlit tak, že mechanismus působení testovaných látek je dosti specifický, a proto i malá změna v molekule způsobí velkou změnu v účinnosti látky.

Hodnoty  $IC_{50}$  samotného NosA vůči testované buněčné linii se pohybují okolo 10nmol. Takto nízká hodnota není u přírodních látek běžná. Jen málo přírodních látek má  $IC_{50}$  v řádu stovek pikomolů (viz Cryptoficin-1, Apratoxin A). Pokud navíc uvážíme případnou chemickou modifikaci molekuly, kterou by bylo možné provést za účelem zvýšení efektivity sloučeniny, jedná se o látku s velkým farmaceutickým potenciálem.

## 5.4 Analýza buněčného cyklu

Z naměřených dat je zřejmé, že u buněk inkubovaných s NosA dochází k zástavě buněčného cyklu v S (G2) fázi. Změny jsou patrné po 24 a 48 hodinách od přidání NosA, tedy v době kdy na buňkách ještě není možné pozorovat žádné morfologické změny.

Určitý problém při vyhodnocování dat představovalo vyjádření přesného procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, proto ho neuvádím. U buněk inkubovaných s NosA došlo plošně k posunu fluorescence jader k vyšším hodnotám, přičemž v populaci buněk sledovaných časosběrnou mikroskopií nebyly nalezeny žádné vícejaderné buňky odpovídající vznikajícím objektům s vyšší fluorescencí než 600 (nejvyšší hodnota naměřená u kontrolních buněk). Řešením, jak usnadnit kvantifikaci buněčných populací v jednotlivých fázích buněčného cyklu, by mohlo být použití senzoru FUCCI (viz kapitola 5.8 této práce).

Obecně, zástava buněčného cyklu v S fázi způsobená přírodními látkami není pozorována příliš často. Mnohem častější jsou zástavy v G1/S nebo G2/M fázi. Přírodní látkou, způsobující zástavu buněčného cyklu v S fázi, je například resveratrol. Resveratrol potlačuje expresi cyklinu D1, cyklinu A, cyklinu B1 a  $\beta$ - kateninu, ale neovlivňuje hladinu cyklinu E. Právě cyklin E je pravděpodobně zodpovědný za přechod do S fáze, i když hladina cyklinu D1 je redukována (Joe, 2002).

Dalším mechanismem, díky kterému může dojít k zastavení buněčného cyklu v S fázi, je inhibice syntézy DNA. Látka působící jako analog báze se během replikace inkorporuje do DNA a následně inhibuje syntézu (Shi et al., 2001).

Budoucí experimenty by proto mohly být zaměřeny na zjištění změn v hladinách cyklinů a dalších proteinů podílejících se na progresi buněčného cyklu, zejména v regulaci G1 a S fáze, způsobené NosA. Dalším vhodným experimentem by bylo i vyhodnocení inhibice syntézy DNA, například pomocí inkorporace 5-bromo-2'- deoxyuridinu (BrdU).

Pozdější zjištění, že NosA redukuje hladinu ATP, vedlo k úvahám o vlivu množství dostupného ATP na progresi buněčného cyklu. Blok v S (G2) fázi by mohl nastat i z důvodu nedostatečného energetického zásobení buňky. Bohužel, v dostupné literatuře se nepodařilo dohledat zdroje, které by toto tvrzení podpořily.

## **5.5 Fluorescenční barvení aktinu a tubulinu**

U buněk inkubovaných s NosA dochází k zástavě buněčného dělení. Poškození mikrotubulů je mechanismem působení mnoha přírodních látek (viz taxol, vinblastin, vinkristin). Rozhodli jsme se proto prověřit případné poškození aparátu, který se podílí na dělení buňky. Na základě provedených pokusů jsme však došli k názoru, že NosA nijak nepoškozuje tubulinovou ani aktinovou síť, a tudíž by zástava buněčného dělení neměla být způsobena poškozením mitotického vřeténka. V tomto případě bychom navíc mnohem pravděpodobněji pozorovali zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu, nikoliv v S fázi, a následnou apoptózu (Yeung et al., 1999).

## **5.6 Distribuce NosA v médiu/ buňkách**

Pomocí velmi citlivé HPLC-HRMS/MS analýzy se nepodařilo prokázat přítomnost NosA uvnitř buněk ani v trypsinové frakci. Hladina testované látky v médiu buněk ošetřených NosA po 24 a 48 hodinové kultivaci nevykazovala výrazné rozdíly oproti kontrolním vzorkům (médiu s přídatkem NosA). Tento výsledek by mohl napovídat tomu, že NosA působí vně buňky, což vzhledem k velikosti molekuly nelze vyloučit. Druhým možným vysvětlením je aktivní transport NosA, jak dovnitř, tak zpětný transport z buňky ven. Samozřejmě, je zde nutné počítat s enormně velkou směrodatnou odchylkou naměřených dat.

Médium muselo být přečištěno pomocí extrakce na pevné fázi za sníženého tlaku, aby mohlo být dále analyzováno pomocí HPLC-HRMS. Při tomto procesu pravděpodobně došlo k určitým ztrátám sledované látky, čímž lze vysvětlit velké směrodatné odchylky. Řešením by bylo provést experiment ve větším objemu média než je 1 ml, kde by malé ztráty sledované látky nezpůsobily tak významný rozdíl. Takový experiment však zatím nebylo možné opakovat kvůli velké spotřebě NosA.

## 5.7 Odmývací a trypsinizační experimenty

Viabilita buněk, od kterých byl NosA odstraněn po 24 a 48 hodinách, byla po 72 hodinách následně inkubace srovnatelná s viabilitou kontrolních buněk. Tento výsledek lze opět vysvětlit dvěma výše zmíněnými způsoby. V obou případech (působení vně buňky, či aktivní transport ven z buňky), by odstranění látky vedlo ke zvýšení jejich viability, což je případ našich experimentálních dat.

U buněk, u kterých byla provedena trypsinizace po aplikaci NosA, je viabilita buněk oproti odmyvu výrazně nižší. Tento jev může být způsoben tím, že již do značné míry poškozené buňky se nedokáží vyrovnat s působením trypsinu.

Na základě výsledků lze zvažovat též možnost, že NosA působí jako chelatační činidlo vychytávají z média složky důležité pro přežití a proliferaci buněk. Tato možnost se však zdá velmi málo pravděpodobná vzhledem k používaným nanomolárním koncentracím NosA.

Fakt, že je viabilita buněk po odmyvu NosA srovnatelná s viabilitou kontrolních buněk, společně se zjištěním, že NosA způsobuje zástavu buněčného cyklu, navádí k myšlence potencionálního uplatnění NosA jako látky použitelné k synchronizaci buněk v S fázi buněčného cyklu.

## 5.8 Experimenty s RO-3306

Při těchto experimentech se nepotvrdil náš předpoklad, že by synchronizace buněk v G2/M fázi měla vliv na uspíšení efektu NosA. Bohužel, inhibitor RO-3306 neovlivnil celou sledovanou populaci buněk, ale pouze zhruba 60% buněk se rozdělilo během prvních pár hodin po odmytí inhibitoru. Ke zlepšení jeho efektu by bylo možné buňky presynchronizovat v G1/S fázi, například pomocí hydroxyurei. Poté by výsledné procento buněk synchronizovaných v G2/M fázi mělo být výrazně vyšší (Ma & Poon, 2011).

Otázkou je, nakolik by tento způsob synchronizace ovlivnil fyziologické vlastnosti buňky. Pozorovaný jev by pak mohl být výsledkem multiplikativního efektu několika látek na buňku za nefyziologických podmínek, čemuž jsme se při designu pokusů pokoušeli vyhnout.

K vyhodnocení pokusu byla použita časosběrná mikroskopie. Buňky se po odmytí inhibitoru RO-3306 ovšem rozdělí v řádu několika minut, proto nebylo vždy možné zachytit první dělení buněk. Vhodným nástrojem, který by pomohl charakterizovat, zda již došlo k progresi v buněčném cyklu a v jaké fázi se buňka nachází, by mohl být „fluorescence ubiquitination cell cycle indicator“ (FUCCI). Jedná se o dvoubarevný detekční systém založený na fluorescenčně značených proteinech charakteristických pro určitou fázi buněčného cyklu.

Buňky přecházejí z červené barvy charakteristické pro G1 fázi, přes žlutou (G1/S), až po zelenou (S, G2 a M fáze). Takový experiment může být vyhodnocen pomocí fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Sakaue-Sawano et al., 2008). Kromě časosběrné mikroskopie bylo dalším výstupem tohoto typu pokusu měření hladiny ATP. Zde jsme poprvé zaregistrovali snížení hladiny ATP u buněk inkubovaných s NosA, proto se další výzkum ubíral tímto směrem.

## 5.9 Fluorescenční barvení mitochondrií

Mitochondrie, jakožto organela zodpovědná za produkci největšího množství ATP ve fyziologické buňce, byla podrobena sledování změn po ošetření buněk NosA. Použití MitoTracker® Green, který barví mitochondrie nezávisle na mitochondriálním potenciálu, neodhalilo výraznější změny ve struktuře mitochondrií. Pro produkci ATP v dýchacím řetězci je však důležitý především mitochondriální membránový potenciál. Ten byl sledován pomocí MitoTracker™ Orange. Kvantifikace fluorescenčního signálu byla vyhodnocena pomocí analýzy obrazu v softwaru ImageJ. Tuto metodu lze považovat za semikvantitativní, avšak předešlé studie poukazují na její možné použití pro hodnocení membránového potenciálu (Krysko et al., 2001).

Nebyl však pozorován žádný rozdíl mezi průměrným fluorescenčním signálem testovaných a kontrolních buněk. Z toho lze usuzovat, že mitochondriální potenciál, který je hnací silou pro mitochondriální syntézu ATP, nebyl u testovaných buněk snížen, a tudíž by ani mitochondriální produkce ATP neměla být ovlivněna. Pro přesnější stanovení mitochondriálního dýchání by ovšem bylo vhodné použít přesnější metodu, například měření respirace pomocí oxymetru.

## 5.10 Experimenty s 2-deoxy-D-glukózou a oligomycinem A

S ohledem na snižování hladiny ATP v buňkách ošetřených NosA i přes fyziologický stav mitochondriální sítě, jsme se rozhodli pokusit se stanovit vliv zablokování glykolýzy popřípadě transportu glukózy do buňky pomocí inhibitoru 2-deoxy-D-glukózy (2DG).

Glukóza, jakožto základní energetický substrát, vstupuje do buňky pomocí více jak deseti známých glukózových transportérů, z nichž nejvýznamnější, a v nádorových buňkách často „*upregulovaný*“, je glukózový transportér 1 (Glut1). Vzhledem k tomu, že nádorové buňky jsou závislé na rychlé glykolýze, jsou velmi senzitivní ke změnám koncentrace glukózy. Z tohoto důvodu je specifická inhibice Glut1 zajímavá jako strategie pro protinádorovou terapii (Liu et al., 2012).

V zásadě jako pozitivní kontrola byla použita 2DG. Chemická struktura 2DG se od glukózy liší pouze substitucí hydroxylové skupiny na druhém uhlíku za vodík. Po vstupu do buňky je 2DG fosforylována hexokinázou. Vzniklý 2-deoxy-D-glukóza-6-fosfát není dále metabolizován, a tak dochází k inhibici glukózového metabolismu a poklesu hladiny ATP v buňce.

Pokud by NosA působil jako inhibitor Glut1, hladina ATP by byla srovnatelná s hladinou ATP naměřenou u buněk po inkubaci s 2DG. Jak je však patrné z obrázku 29, NosA nezpůsobuje tak výrazné snížení hladiny ATP jako 2DG. Především však, buňky při společném ošetření NosA+2DG vykazují výrazný pokles ATP, což vyřazuje možnost, že by NosA blokoval vstup glukózy/2DG do buňky.

Dalším zajímavým poznatkem je, že oligomycin A, jakožto mitochondriální inhibitor, nemá u testovaných buněk na hladinu ATP žádný efekt. Z toho vyplývá, že HeLa buňky jsou schopny plně nahradit funkci mitochondrie v tvorbě ATP glykolýzou.

Výsledky tohoto experimentu nenaznačují, že by NosA působil jako inhibitor Glut1. Navíc, Liu et al. (2012) ve své studii nového inhibitoru Glut1 popisuje, že přidání extracelulárního ATP současně s inhibitorem odvrátí účinek inhibice Glut1. Pokoušeli jsme se provést obdobný experiment (data neuvádím). Výsledkem bylo, že přidání extracelulárního ATP ani samotného adenosinu zároveň s NosA nepomohlo překonat efekt způsobený NosA.

## 6. Závěr

Práce byla zaměřena na studium cytostatického účinku látky izolované z půdní sinice *Desmonostoc muscorum*, která je v této práci nazývána nostatinem A (NosA). První podmínkou pro studium efektu NosA a jeho strukturních analogů byla izolace ze sinicové biomasy. Během izolace se podařilo získat dostatečné množství čistých látek pro pilotní biologické experimenty. V budoucnu bude muset být metoda izolace optimalizována tak, aby byla použitelná pro větší množství biomasy a dosáhlo se vyšší účinnosti. Co se týče efektu NosA vůči testovaným buněčným liniím, bylo zjištěno následující:

- $IC_{50}$  NosA a jeho strukturních analogů jsou rozdílné. Nejnižší  $IC_{50}$  vykazuje NosA, hodnota odpovídá koncentraci 9 nmol.
- NosA způsobuje zástavu buněčného cyklu, pravděpodobně v S fázi.
- NosA neovlivňuje strukturu aktinu ani tubulinu.
- NosA nebyl detekován uvnitř buněk ani v trypsinové frakci získané z povrchu buněk. Jeho koncentrace v médiu se v čase téměř nemění.
- Odmytí NosA z buněčné kultury po 24, a do značné míry i 48 hodinách, zachrání buňky od cytostatického efektu.
- Synchronizace buněk v G2/M fázi nemá vliv na urychlení či oddálení efektu způsobeného NosA.
- NosA pravděpodobně zastavuje syntézu ATP a v dlouhodobém časovém horizontu výrazně snižuje jeho hladinu v buňce.
- NosA nemá vliv na strukturu mitochondrií, a pravděpodobně ani na mitochondriální membránový potenciál.
- NosA pravděpodobně nepůsobí jako inhibitor glukózového transportéru 1.

Pro své unikátní vlastnosti je NosA předurčen k dalšímu zkoumání. Stěžejním krokem v budoucnu bude objasnění jeho chemické struktury. Ta by mohla napovědět více o mechanismu, jakým látka působí. Doufám, že molekula NosA jednou najde své uplatnění v praxi, i když k tomu jistě nepovede jednoduchá cesta.

## 7. Použitá literatura

ABDELMOHSEN, Usama Ramadan, et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17.2: e30-e41.

AL-AWAR, Rima S., et al. A convergent approach to cryptophycin 52 analogues: synthesis and biological evaluation of a novel series of fragment A epoxides and chlorohydrins. *Journal of medicinal chemistry*, 2003, 46.14: 2985-3007.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*; American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2016.

BAILON-MOSCOSO, Natalia, et al. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. *Current Genomics*, 2017, 18.2: 106-131.

BARNUM, Kevin J.; O'CONNELL, Matthew J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*, 2014, 29-40.

BOUCHARD, Hervé; VISKOV, Christian; GARCIA-ECHEVERRIA, Carlos. Antibody–drug conjugates—a new wave of cancer drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2014, 24.23: 5357-5363.

BREINBAUER, Rolf; VETTER, Ingrid R.; WALDMANN, Herbert. From protein domains to drug candidates—natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41.16: 2878-2890.

BUCK, Suzanne B., et al. Total synthesis and anti-tubulin activity of epi-c3 analogues of cryptophycin-24. *Journal of medicinal chemistry*, 2004, 47.14: 3697-3699.

CAI, Weijing, et al. Apratoxin S10, a Dual Inhibitor of Angiogenesis and Cancer Cell Growth To Treat Highly Vascularized Tumors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 8.10: 1007-1012.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 1992, 72.6: 445-459.

COLLINS, G. P.; BRUCE, D.; EYRE, T. A. New Therapies in T-cell Lymphoma. *Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemias*, 2014, 4: 1.



CONG, Feng; CHEUNG, Atwood K.; HUANG, Shih-Min A. Chemical genetics–based target identification in drug discovery. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2012, 52: 57-78.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Eukaryotic Cell Cycle. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>

COSTA, Margarida, et al. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: A review on the implication of apoptosis. *Marine drugs*, 2012, 10.10: 2181-2207.

CRAGG, Gordon M., et al. Role of plants in the National Cancer Institute drug discovery and development program, 1993, 80-95.

D'AGOSTINO, G., et al. A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2006, 16.1: 71-76.

DENG, Changchun; PAN, Beiqing; O'CONNOR, Owen A. Brentuximab vedotin. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19.1: 22-27.

DUPREZ, Linde, et al. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, 2009, 11.13: 1050-1062.

EDELMAN, Martin J., et al. Phase 2 study of cryptophycin 52 (LY355703) in patients previously treated with platinum based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 39.2: 197-199.

FEHER, Miklos; SCHMIDT, Jonathan M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 2003, 43.1: 218-227.

GAJARSKÁ, Z., 2017: Influence of cultivation conditions and age of the culture on the production of cytostatic secondary metabolite 2505 and its natural analogues. BSc. Thesis, in English, - 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

GOLAKOTI, Trimurtulu, et al. Structure Determination, Conformational Analysis, Chemical Stability Studies, and Antitumor Evaluation of the Cryptophycins. Isolation of 18 New Analogs from Nostoc sp. Strain GSV 224 J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 12030-12049. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118.13: 3323-3323.

CHEN, Qi-Yin; LIU, Yanxia; LUESCH, Hendrik. Systematic chemical mutagenesis identifies a potent novel apratoxin A/E hybrid with improved in vivo antitumor activity. *ACS medicinal chemistry letters*, 2011, 2.11: 861-865.

JOE, Andrew K., et al. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8.3: 893-903.

JOHNSON, Irving S., et al. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Research*, 1963, 23.8 Part 1: 1390-1427.

KOUTRAS, A. K., et al. Targeted therapy in colorectal cancer: current status and future challenges. *Current medicinal chemistry*, 2011, 18.11: 1599-1612.

KRYSKO, Dmitri V., et al. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2001, 49.10: 1277-1284.

LIANG, Jian, et al. Cryptophycins-309, 249 and other cryptophycin analogs: preclinical efficacy studies with mouse and human tumors. *Investigational new drugs*, 2005, 23.3: 213-224.

LIU, Xuesong, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86.1: 147-157.

LIU, Yi, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 2012, 11.8: 1672-1682.

LUESCH, Hendrik, et al. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symprostatin 1. *Journal of Natural Products*, 2001b, 64.7: 907-910.

LUESCH, Hendrik, et al. Lyngbyalose B, a New Glycoside Macrolide from a Palauan Marine Cyanobacterium, *Lyngbya* sp. 1. *Journal of natural products*, 2002, 65.12: 1945-1948.

LUESCH, Hendrik, et al. Total Structure Determination of Apratoxin A, a Potent Novel Cytotoxin from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya m. ajuscula*. *Journal of the American Chemical Society*, 2001a, 123.23: 5418-5423.

LURJE, Georg; LENZ, H.-J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, 2010, 77.6: 400-410.

MA, Hoi Tang; POON, Randy YC. Synchronization of HeLa cells. *Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols*, 2011, 151-161.

MADDEN, Timothy, et al. Novel marine-derived anticancer agents: a phase I clinical, pharmacological, and pharmacodynamic study of dolastatin 10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research*, 2000, 6.4: 1293-1301.

MANN, John. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2.2: 143-148.

MARTINDALE, Jennifer L.; HOLBROOK, Nikki J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology*, 2002, 192.1: 1-15.

MARTINOU, Jean-Claude; YOULE, Richard J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell*, 2011, 21.1: 92-101.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983, 65.1-2: 55-63.

MULLARD, Asher. FDA approves first immunotherapy combo. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14.11: 739-739.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 2007, 70.3: 461-477.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. The discovery of anticancer drugs from natural sources. In: *Natural Products*. Humana Press, 2005. p. 129-168.

NOGUEIRA, Veronique, et al. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer cell*, 2008, 14.6: 458-470.

OPYDO-CHANEK, Małgorzata; GONZALO, Oscar; MARZO, Isabel. Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: current evidence and future prospects. *Biochemical Pharmacology*, 2017.

PARKER, Amelia L.; KAVALLARIS, Maria; MCCARROLL, Joshua A. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in oncology*, 2014, 4.

PETTIT, George R., et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, 109.22: 6883-6885.

RAJA, Rathinam, et al. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical reviews in microbiology*, 2016, 42.3: 394-405.

RAO, Chinthalapally; KURKJIAN, Carla; Y YAMADA, Hiroshi. Mitosis-targeting natural products for cancer prevention and therapy. *Current Drug Targets*, 2012, 13.14: 1820-1830.

*Republic.*

RIPPKA, Rosmarie, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 1979, 111.1: 1-61.

ROHLENOVÁ, K., 2016: Targeting mitochondria to overcome resistance of breast cancer to therapy. Ph.D. Thesis, in English,-199 p., Charles University in Prague, Faculty of Science, Praha, Czech Republic.

RUIZ-TORRES, Verónica, et al. An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. *Molecules*, 2017, 22.7: 1037.

SAKAUE-SAWANO, Asako, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 2008, 132.3: 487-498.

SALVADOR-REYES, Lilibeth A.; LUESCH, Hendrik. Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria. *Natural product reports*, 2015, 32.3: 478-503.

SENDEROWICZ, Adrian M. The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *The oncologist*, 2002, 7.Supplement 3: 12-19.

- SHI, Zheng, et al. S-Phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. *Cancer Research*, 2001, 61.3: 1065-1072.
- SHOEMAKER, Robert H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6.10: 813-823.
- SCHWARTZ, Robert E., et al. Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of industrial microbiology*, 1990, 5.2-3: 113-123.
- SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2016, 66.1: 7-30.
- SINGH, Rahul Kunwar, et al. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics*, 2011, 64.6: 401-412.
- SLANINOVÁ, Věra a KREJČÍ Alena. Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci / Cancer Cells and Changes in Their Metabolism: a Way to Survive and a Tool for Destruction. *Živa*. 2013, s. 220. ISSN 0044-4812.
- SULLIVAN, Lucas B., et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell*, 2015, 162.3: 552-563.
- TOMEK, P., 2010: Muscotoxins: novel cytotoxic undecapeptides with unique structural elements and mechanism of action, isolated from soil cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Mgr. Thesis, in English. – 89 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, et al. FDA approves Adcetris to treat two types of lymphoma. *FDA Web site*, 2011 [2012-07-13]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm268781.htm>, 2013.
- VAISHAMPAYAN, Uika, et al. Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. *Clinical cancer research*, 2000, 6.11: 4205-4208.
- VICKOVÁ, K., 2015: Cytotoxické působení sinicových metabolitů na vybrané lidské rakovinné linie se zaměřením na pankreatickou linii PaTu. [Cytotoxic effect of some cyanobacterial crude extracts and metabolites against selected human cancer cell lines, especially focusing on pancreatic cancer cell line PaTu. Bc. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

WALL, Monroe E., et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*, 2. *Journal of the American Chemical Society*, 1966, 88.16: 3888-3890.

WANG, Xiaodong. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 2001, 15.22: 2922-2933.

WARBURG, Otto. On the origin of cancer. *Science*, 1956, 123.3191: 309-314.

WEIß, Christine, et al. Total synthesis and biological evaluation of fluorinated cryptophycins. *Beilstein journal of organic chemistry*, 2012, 8: 2060.

YEUNG, Tai K., et al. The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999, 263.2: 398-404.

YOUNES, Anas, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2012, 30.18: 2183-2189.