

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



**Příprava a základní charakterizace nádorové linie
rezistentní na inhibitory CDK**

Kateřina LÓNOVÁ

Bakalářská práce

Studijní program:
Studijní obor:

Typ studia:
Vedoucí práce:

Chemie
Bioorganická chemie a chemická
biologie
Prezenční
MUDr. Petr Džubák, PhD.

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce MUDr. Petru Džubákovi, PhD. za vedení při vypracování mé bakalářské práce.

Zároveň bych ráda poděkovala celému kolektivu pracovníků LBB na ÚMTM, především pak paní Renatě Burianové a paní Ing. Soni Gurské, PhD. za podporu a pomoc při měření a zpracování výsledků.

V neposlední řadě patří můj dík mé rodině a kamarádům, především Ing. Matějovi Horáčkovi za připomínky během zpracování teoretické rešerše a Bc. Ondřeji Plotěnému za rady při grafickém zpracování obrázků.

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Kateřina Lónová**Název práce:** Příprava a základní charakterizace nádorové linie rezistentní na inhibitory CDK**Typ práce:** bakalářská práce**Pracoviště:** Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, UPOL**Školitel:** MUDr. Petr Džubák, PhD.**Rok obhajoby práce:** 2017**ABSTRAKT:**

Tato práce je zaměřena na přípravu a základní charakterizaci vlastností nádorové linie odvozené od kolorektálního karcinomu, u které byla vybudována rezistence na syntetický inhibitor cyklin-dependantních kináz, Bohemin (BOH). V první polovině teoretické části práce je popsán buněčný cyklus a jeho regulace pomocí komplexů cyklin/cyklin-dependantní kináza. Zároveň jsou zde popsány přírodní a syntetické inhibitory cyklin-dependantních kináz. V druhé polovině teoretické části jsou charakterizovány některé mechanismy vzniku mnohočetné buněčné rezistence na cytostatika. Experimentální část se věnuje metodice přípravy nádorových linií rezistentních na BOH a následnému stanovení jeho střední inhibiční koncentrace (IC_{50}) pomocí MTS testu. Toto stanovení probíhalo pro nerezistentní i rezistentní linie. Rezistentní linie byly poté podrobeny sérii analýz na průtokovém cytometru pro určení jejich základních vlastností (syntéza DNA, RNA, míra apoptózy, charakterizace buněčného cyklu a exprese glykoproteinu P). V průběhu analýzy byly nerezistentní i rezistentní buňky ovlivňovány BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$.

Získané výsledky měření u nerezistentních buněk vykazovaly zajímavé změny na buněčném cyklu, kdy docházelo ke kumulaci buněk v G0/G1 fázi, stejně jako byla pozorována zvýšená apoptóza a zároveň inhibice syntéz DNA a RNA. Rezistentní linie tyto změny nevykazovaly.

Klíčová slova: mnohočetná léková rezistence, cyklin-dependantní kinázy, inhibitory cyklin-dependantních kináz, průtoková cytometrie, Bohemin**Počet stran:** 58**Počet příloh:** 1**Jazyk:** čeština

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Kateřina Lónová**Title:** Development and basic characterization of the cell line resistant to the CDK inhibitors**Type of thesis:** bachelor**Department:** Institute of molecular and translational medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, UPOL**Advisor:** MUDr. Petr Džubák, PhD**The year of presentation:** 2017**ABSTRACT:**

Bachelor thesis is focused on development and basic characterization of cancer cell line derived from colorectal carcinoma which shows resistance towards synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinase, Bohemine (BOH). The first half of theoretical part describes cell cycle and its regulation by complexes cyclin/cyclin-dependent kinase. This part also describes natural and synthetic inhibitors of cyclin-dependent kinases. Second half of theoretical part is focused on description of cell multi-drug resistance. Experimental part was dedicated to preparation of cell lines resistant towards BOH and detection of inhibition concentration (IC_{50}) by MTS tests. This concentration was measured for both non-resistant and resistant clones. Then, resistant cell lines were examined by flow cytometry in order to estimate their level of DNA and RNA synthesis, number of apoptotic cells, cell cycle characterization and expression of glycoprotein P. During analysis, both non-resistant and resistant cell were treated with BOH, which concentration was $1 \times IC_{50}$ and $3 \times IC_{50}$.

Results obtained during analysis showed interesting changes during cell cycle, where majority of non-resistant cells were stopped during G0/G1 phase and cell lines also inhibited their synthesis of nucleic acids. Resistant clones didn't show any of these changes.

Keywords: multi- drug resistance, cyclin-dependent kinases, inhibitors of cyclin-dependent kinases, flow cytometry, Bohemine**Number of pages:** 58**Number of appendixes:** 1**Language:** czech

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract.....	5
1. Úvod	10
2. Cíle práce	11
3. Buněčný cyklus	12
3.1 Interfáze	12
3.1.1 G1 fáze.....	13
3.1.2 G0 fáze.....	13
3.1.3 S fáze	14
3.1.4 G2 fáze.....	14
3.2 M fáze	14
4. Regulace buněčného cyklu	16
4.1 Cykliny a cyklin-dependentní kinázy (Cdk)	18
4.1.1 Komplexy cyklin/Cdk v G1 fázi.....	19
4.1.2 Komplexy cyklin/Cdk v rozhraní G1/S	19
4.1.3 Komplexy cyklin/Cdk na rozhraní S/G2 a ve fázích S a G2	19
4.1.4 Komplexy cyklin/Cdk na rozhraní G2/M a ve fázi M.....	20
5. Inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	20
5.1 Přirozené inhibitory CDK	20
5.2 Syntetické inhibitory Cdk (CdkI).....	21
5.2.1 Purinové CdkI.....	21
6. Rezistence na cytostatika.....	22
6.1 Mechanismus vzniku rezistence.....	23
6.2 Mnohočetná léková rezistence (MDR)	24
6.2.1 Efuxové ABC transportéry způsobující MDR	24
6.2.2 Změny na úrovni apoptotické dráhy způsobující MDR	27
6.2.3 Změny v aktivitě topoizomerázy II	27
7. Použitý materiál.....	29
7.1 Buněčné linie.....	29

7.2	Chemikálie	29
7.2.1	Seznam použitých protilátek	30
7.3	Přístroje	31
7.4	Spotřební materiál	31
8.	Metodika práce	31
8.1	Pasážování buněčných linií	32
8.2	Příprava Cdk rezistentních linií	32
8.2.1	Postupné navyšování koncentrace	33
8.2.2	Stanovení optimální koncentrace vhodné pro růst rezistentních klonů	34
8.3	Stanovení hodnoty IC_{50} pomocí MTS testu	34
8.4	Analýza vlastností buněčné linie pomocí průtokové cytometrie	35
8.4.1	Fixace buněk pro analýzu na průtokovém cytometru	35
8.4.2	Analýza syntézy DNA	36
8.4.3	Analýza syntézy RNA	36
8.4.4	Detekce fosforylace histonu H3-P _{Ser10}	37
8.4.5	Analýza buněčného cyklu	38
8.4.6	Analýza exprese glykoproteinu P	38
9.	VÝSLEDKY	40
9.1	Stanovení IC_{50} pro nerezistentní a rezistentní buněčné linie pomocí MTS	40
9.2	Analýza syntézy DNA	41
9.3	Analýza syntézy RNA	43
9.4	Analýza buněčného cyklu a apoptózy	45
9.5	Fosforylace histonu H3	48
9.6	Analýza exprese glykoproteinu P _{gp}	50
10.	Diskuze	51
11.	Závěr	53
12.	Citovaná literatura	54
13.	Příloha	58

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ABC protein	ATP-binding-casette protein
ADP	adenosin difosfát
ATP	adenosin trifosfát
BOH	Bohemin
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BrU	5-bromouridin
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CIP/KIP	Cdk-interacting protein (třída přírodních inhibitorů Cdk)
Cdk	cyklin-dependentní kináza
CdkI	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
GST	glutathionová-S-trasferáza
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
INK4	přírodní inhibitor Cdk
LEM	laboratoř experimentální medicíny
LRP	Lung resistance protein
MDR	multi-drug resistance
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium
MRP	multi-drug resistance associated protein
mRNA	mediátorová RNA
NBD	nukleotid-vázající doména
NP-40	nonidet P-40
PBS	izotonický fosfátový pufr
PBS-T	izotonický fosfátový pufr s přidavkem Tween 10
PI	propidium jodid
pRB	retinoblastomový protein
Pgp	glykoprotein P

p53	protein/produkt genu TP53
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza A	ribonukleáza A
RB	rinsing buffer
SD	směrodatná odchylka
TMD	transmembránová doména
TOPO II	topoizomeráza II

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou hned po nemocech oběhového systému jedněmi z nejčastějších příčin úmrtí současné evropské populace (1). Jen v České republice je každoročně diagnostikováno více než 77 tisíc nových případů rakoviny a téměř 28 tisíc pacientů na toto onemocnění umírá. (2)

Rakovina je obecně používaný název pro onemocnění, při kterém organismus ztrácí kontrolu nad dělením buněk, a dochází tak k jejich nekontrolovatelnému nárůstu. Tento děj je doprovázen poruchou kontrolních mechanismů, tedy ztrátou schopnosti detekce a autokorekce postižených buněk. Tyto příčiny vedou ke vzniku buněčných struktur – nádorů, které mohou invazivně pronikat pomocí krevního řečiště do dalších tkání (metastázovat) nebo stlačovat okolní struktury a zabraňovat jim ve vykonávání jejich funkce (3).

V moderní medicíně existuje mnoho způsobů léčby rakoviny, při kterých se nejčastěji využívá operativního odstranění nádoru v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií. V posledních letech bylo díky použití chemoterapie úspěšně léčeno mnoho typů rakovinných onemocnění (4). Snahou současných chemiků tedy je syntetizování a testování nových derivátů s antiproliferační aktivitou – cytostatik. Zajímavými sloučeninami z řady cytostatik jsou inhibitory cyklin-dependantních kináz. Jedná se o deriváty, které se chovají převážně jako kompetitivní inhibitory pro ATP a váží se do aktivního místa v komplexu cyklin-Cdk, čímž zapříčiňují zastavení buněčného dělení (5).

Ačkoliv cytostatika vykazují při léčbě nádorových onemocnění vysokou účinnost, poměrně často dochází k selhání jejich činnosti, tedy k zastavení nebo omezení jejich antiproliferačních účinků (6). Jedním z nejzávažnějších důvodů selhání účinků cytostatik je poměrně běžný fenomén, tzv. léková rezistence. Dochází při ní ke stavu, kdy buňky přestávají reagovat na přítomnost léčiva v organismu, a dokonce může docházet i k aktivnímu pumpování látek z buňky prostřednictvím specializovaných ATP-dependentních transportních proteinů. Ačkoliv je tato komplikace často spojována s posledními fázemi nádorového bujení, nedávné výzkumy potvrdily, že schopnost budování rezistence buňky na cytostatikum vzniká již v raných stádiích tumorigenního procesu (7). Výsledkem transformace je kromě nekontrolované buněčné proliferace a dalšího růstu nádoru i celkové oslabení organismu a případná ztráta imunitní odpovědi.

2. CÍLE PRÁCE

Bakalářská práce je formálně dělena na teoretickou a experimentální část. Cílem teoretické části bylo vypracování literární rešerše týkající se popisu vzniku buňky buněčným dělením a charakteristiky regulačních systémů ovlivňujících tento proces. Zároveň zde byly také představeny regulační proteiny, tzv. cyklin-dependantní kinázy (Cdk) a jejich inhibitory s purinovým skeletem, které mají terapeutické využití. V neposlední řadě zde byla charakterizována mnohočetná rezistence k léčivům (multidrug resistance, tedy MDR) a některé mechanismy jejího vzniku.

Cílem experimentální části práce bylo určení základních vlastností buněčných linií rezistentních na synteticky připravený inhibitor Cdk Bohemin (BOH) a porovnání jich s vlastnostmi nerezistentních klonů. Pro analýzu buněčného cyklu bylo využito metody průtokové cytometrie pro určení syntézy DNA a RNA a fosforylace histonu H3, jakožto markeru mitózy. Zároveň s těmito údaji byly určeny i vlastnosti buněčného cyklu a míra exprese glykoproteinu P, který je častou příčinou vzniku MDR.

TEORETICKÁ ČÁST

3. BUNĚČNÝ CYKLUS

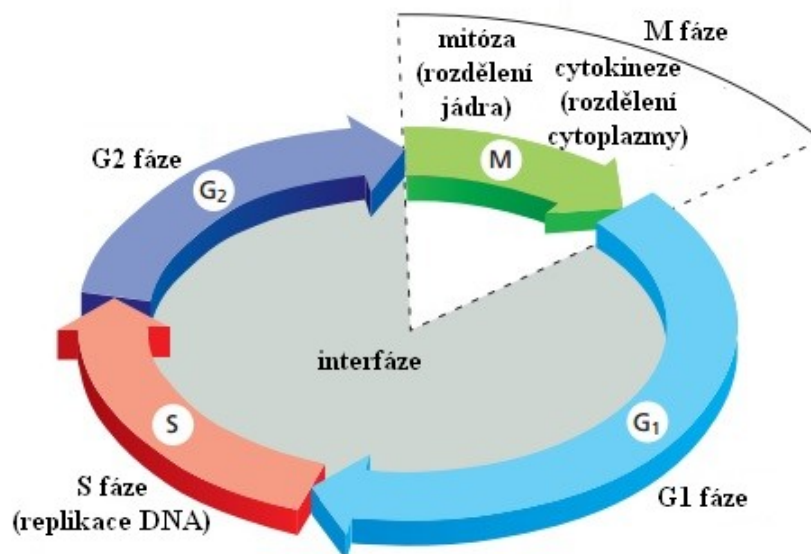
Buněčný cyklus je základní přírodní mechanismus, který probíhá u všech živých organismů. Jedná se o sled dějů, které vedou k duplikaci veškerého buněčného obsahu a následnému rozdělení buňky z jedné mateřské na dvě dceřiné. Nejjednodušší dělení probíhá u jednobuněčných prokaryot, kdy při jediném procesu vzniká dokonce celý nový organismus. Na druhou stranu, eukaryotické organismy se dělí složitějším způsobem, kdy se mnohonásobným dělením postupně z jednobuněčného vajíčka stává plnohodnotný mnohobuněčný organismus. Po úplném zformování eukaryotického organismu se buněčný cyklus nezastavuje, ale probíhá během celého života. V lidském těle vzniká odhadem asi 25 milionů nových buněk za sekundu (8).

Formálně se buněčný cyklus dělí na dvě fáze – interfázi a M-fázi. Při M-fázi dochází k mitóze, kdy chromozomy kondenzují v mateřské buňce a poté jsou od sebe odděleny a umístěny do jádra obou dceřiných buněk. Tato fáze probíhá asi 30-60 minut, a je ukončena cytokinezí, což je proces, při kterém je plasma rozdělena na dvě části a dochází ke vzniku dvou samostatných dceřiných buněk. Ačkoliv při M-fázi dochází k samotnému rozdělení buňky, mnoho přípravných procesů pro mitózu a cytokinezi probíhá v interfázi. Dochází při ní k růstu buňky, duplikování organel, zmnožení makromolekul a k replikaci DNA. Délka interfáze je v porovnání s délkou M-fáze relativně dlouhá, může trvat od několika hodin až po několik týdnů (8).

Celý cyklus musí proběhnout ve správném pořadí při každém dělení. Například, pokud dojde k oddělení chromozomů předtím, než je dokončen proces replikace, jedna z dceřiných buněk získá neúplnou genetickou informaci. Naopak, pokud dojde k opětovné replikaci před rozdělením mateřské buňky, bude mít jedna z dceřiných buněk nadbytek genů v porovnání s ostatními buňkami. Tyto abnormality v genové expresi vedou za fyziologických podmínek k apoptóze, tedy programované buněčné smrti. (9)

3.1 Interfáze

Mateřská buňka musí koordinovat svoji velikost s každým dělením, jinak by se dceřiné buňky s dalšími dělicími cykly neustále zmenšovaly. Aby se zachovala velikost nastávající generace, prochází buňka obdobím kontinuálního růstu, kdy se duplikuje nejen jaderná DNA, ale i organely a makromolekuly. Děje se tak během interfáze, která se skládá ze 3 fází, tedy G1, S a G2 (viz obr. 1).



Obr. 1 Schéma buněčného cyklu rozděleného podle jednotlivých fází (upraveno) (10)

3.1.1 G1 fáze

G1 fáze (z angl. *gap = mezera*) je první období interfáze a následuje po cytokinezi. Během této etapy probíhají nejvýraznější změny na buňce. Dochází k syntéze enzymů pro budoucí replikaci jaderné DNA, tvorbě mRNA, tubulinu a dalších proteinů potřebných pro syntézu DNA v následujících krocích cyklu. Zároveň buňka zvětšuje svoje rozměry (8). Součástí G1 fáze je jeden z hlavních kontrolních bodů cyklu, tzv. G1/S kontrolní bod. Tento bod, který se také nazývá restriční, rozhoduje, zda má buňka vhodné extracelulární podmínky pro přechod do následující fáze dělení. Hlavními podmínkami, je dostatečný nárůst buňky a produkce správných enzymů pro budoucí syntézu DNA. Pokud nejsou tyto podmínky splněny, kontrolní bod cyklus zastaví a buňka přechází do klidové fáze dělení, tzv. fáze G0 (11).

3.1.2 G0 fáze

Při nevhodných podmínkách mnoho buněk vystupuje z G1 fáze do tzv. G0 fáze, a tak zastavují svůj cyklus dělení. Nástup do tohoto období je ovlivněn kontrolním bodem G1, který se vyskytuje na konci G1 fáze. V klidové fázi mohou buňky zůstat před obnovením proliferace i několik let (11). Terminálně diferencované buňky (fibroblasty, lymfocyty, neurony) jsou zafixované v G0 fázi, takže se již dále nedělí (9). Naopak některé buňky (hepatocyty) jsou schopné z klidové fáze přejít opět do G1 fáze a obnovit tak svůj buněčný cyklus (12).

3.1.3 S fáze

Poté, co vystoupí z G1 fáze, vstupuje buňka do S fáze (z angl. *synthesis* = *syntéza*). Jak již název napovídá, hlavním procesem je zde syntéza jaderné DNA. Během této syntézy dochází k replikaci DNA a tvorbě histonů potřebných pro budoucí kondenzaci chromatinu do podoby chromozomů (8).

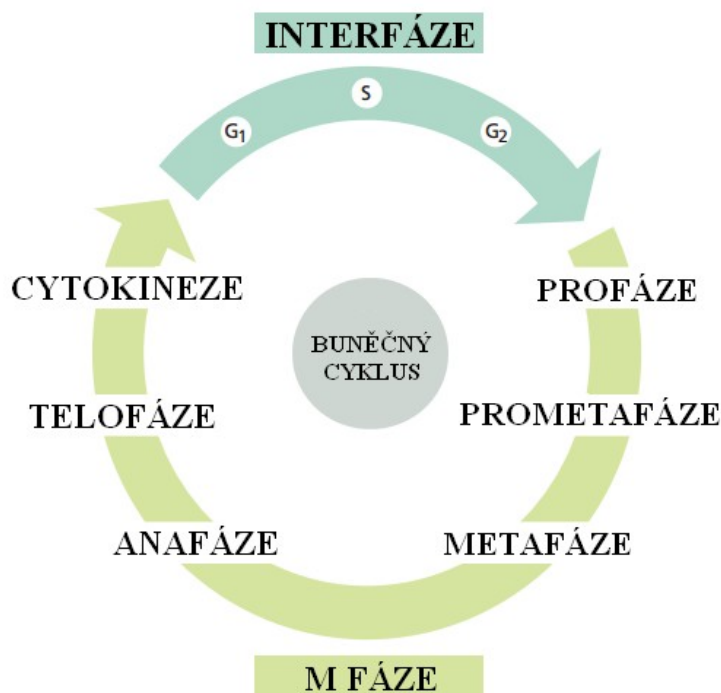
3.1.4 G2 fáze

Poté, co se zreplikuje veškerá jaderná DNA, vstupuje buňka do G2 fáze. V tomto období dochází k dodatečnému růstu buňky, syntéze proteinů, duplikování organel a k tvorbě struktur potřebných pro dělení buňky. Nedílnou součástí jsou také postreplikační opravy DNA. Na konci G2 fáze histony reagují s molekulami DNA a započínají tak její kondenzaci, při které vznikají chromatinová vlákna. Buňka poté vstupuje do první etapy M fáze.

Součástí této fáze je kontrolní bod G2/M, který rozhoduje, zda buňka bude pokračovat do M fáze, nebo svůj cyklus přeruší (11).

3.2 M fáze

Mitóza, neboli M-fáze, zajišťuje růst organismu, či náhradu tkáně při jejím poškození (13). Jedná se o nepohlavní dělení, tudíž při rozdělení mateřské buňky s daným počtem chromozomů dochází ke vzniku naprosto identické dceřiné buňky s totožným počtem chromozomů. Během této fáze dochází k rozdělení již replikované DNA do dvou identických setů, které jsou později součástí dvou jader pro nově vznikající buňky. Mitóza se rozděluje do 5 fází: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze (viz obr. 2). Nutno dodat, že toto dělení je pouze formální pro účely diskuze a experimenty, jinak je jedná o jeden souvislý děj (8).



Obr. 2 Schéma M-fáze buněčného cyklu (upraveno) (10)

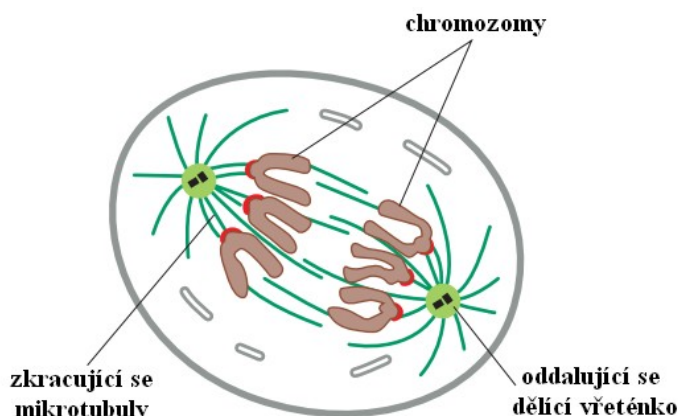
Prvním znakem, že buňka vstupuje do mitotické fáze je započínající kondenzace chromatinových vláken, ze kterých se postupně formují jednotlivé chromozomy. Ty jsou po proběhnutí S-fáze dvouchromatidové a spojené centromerou. Tento proces je tak výrazný, že ho lze snadno pozorovat pod světelným mikroskopem (14). Důležitým procesem, který v této fázi také probíhá, je formace dělicího vřeténka. Během replikace DNA v S fázi došlo k duplikaci centrozomu, což je organela zodpovědná za organizování mikrotubulů v buňce do prostorové sítě. V M-fázi zajišťuje navázání chromozomů na mikrotubuly a jejich následné rozdělení. Tato fáze mitózy se nazývá profáze.

Následující fáze, prometafáze, je charakteristická fragmentací jaderné membrány. Ta se rozpadá na menší části a chromozomy nacházející se v jádře přicházejí do kontaktu s mikrotubuly navázanými na jednotlivé centrozomy. Ty se postupně posouvají k opačným pólům buňky (15).

Při metafázi jsou chromozomy seřazeny do ekvatoriální roviny, která se nachází přesně ve středu mezi centrozomy. Ty jsou již lokalizované na opačných pólech buňky a vychází z nich mikrotubuly, které jsou napojeny na jednotlivé chromozomy v místě zvaném centriola (10).

Anafáze je nejkratší část celého procesu mitózy, může trvat pouze několik minut (14). Dochází při ní k oddělování sesterských párů chromatid po mikrotubulech dělicího vřeténka

k opačným pólům (viz obr. 3). Zároveň se od sebe tyto póly vzdalují a buňka se začíná natahovat. Na konci anafáze je u každého pólu ekvivalentní množství chromozomů.



Obr. 3 Oddalující se sesterské chromatidy v průběhu anafáze (upraveno) (10)

Poslední fází je telofáze, kdy dochází k obnově jadérka a zániku dělicího vřeténka. Zároveň se v dceřiných buňkách formují dvě oddělená jádra a chromozomy částečně dekonduzují. Na telofázi volně navazuje cytokineze, při které dochází k formaci kontraktálního prstence z aktinových mikrofilament. Jeho postupným zužováním dochází k zaškrvení buňky a rozdělení původní buňky na dvě samostatné, dceřiné buňky.

4. REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU

Kontrola buněčného cyklu je nezbytná pro správnou funkci organismu. Replikace a rozdělení buněčných komponent musí být provedeno vždy přesně, musí být správně načasováno a kontrolováno. V opačném případě, kdy dochází k nesprávné funkci kontrolních mechanismů, může docházet k řadě různých onemocnění, mimo jiné k nádorovému bujení.

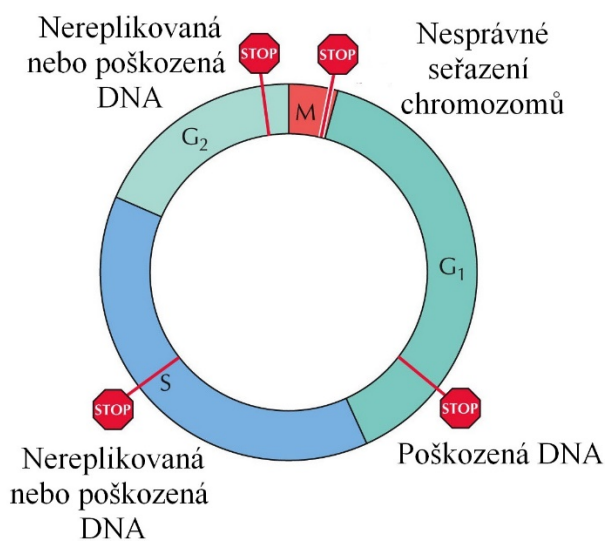
Ve všech eukaryotických organismech je mašinérie buněčného cyklu přísně řízena signály od ostatních buněk a aktivací klíčových sloučenin, tzv. růstových faktorů, které iniciují, popřípadě regulují replikaci DNA, mitózu a cytokinezi. Jedná se nejčastěji o látky bílkovinné povahy působící na buňky prostřednictvím receptorů. Tyto signály se z receptorů přenášejí signalizačními kaskádami k jádru a tím ovlivňují celou mašinérii buněčného cyklu.

Aktivace těchto proteinů je zapříčiněna jejich fosforylací pomocí specifických enzymů známých pod jménem proteinové kinázy. Ty odštěpují fosfátové skupiny z ATP a dále je přenáší na nově syntetizovaný řetězec aminokyselin obsažený v cílovém proteinu. Protein tak změní svou konformaci a stává se aktivním. Fosforylace tohoto proteinu je reverzibilní,

může tedy být zvrácena pomocí jiných enzymů – fosfatáz, které naopak odštěpují fosfát z proteinu (15). Kromě regulace buněčného dělení se však tyto faktory mohou podílet i na diferenciaci či stárnutí buněk.

Celý komplex těchto kontrolních komponent se označuje souhrnným názvem kontrolní systém buněčného cyklu. Ten zajišťuje správný chod buněčného dělení, a dokonce může cyklus v jakékoliv jeho části pozastavit (například v případě neúplné replikace DNA, nedostatečného nárůstu buňky před rozdělením apod.). Díky tomuto kontrolnímu systému se může dělení buněk uzpůsobovat potřebám organismu a produkovat jen ty buňky, které jsou v dané situaci potřebné.

Důmyslnou součástí kontrolního systému buněčného dělení jsou tzv. checkpoints, tedy kontrolní body (viz obr. 4). Ty zodpovídají za správné přechody buňky mezi jednotlivými fázemi cyklu a kontrolují, aby nedošlo k započetí další fáze předtím, než byla ta předchozí dokončena. V celém cyklu se vyskytují tři body: G1/S bod, G2/M bod a kontrolní bod v anafázi. Bod G1/S se, jak již z názvu vyplývá, vyskytuje na pomezí fází G1 a S. Tento bod určuje, zda jsou extracelulární podmínky příznivé a buňka tak bude pokračovat do S fáze, kde dojde k replikaci její DNA. Pokud podmínky nejsou vhodné, buňka vstoupí do klidové fáze G0. Další kontrolní bod se nachází na pomezí G2 a M fáze. Ten zajišťuje kontrolu správné replikace DNA a zduplikování organel. Poslední kontrolní bod se nachází v anafázi a kontroluje správné rozdělení sesterských chromatid chromozomů (10). Z biochemického hlediska jsou tyto kontrolní body komplexy enzymů cyklin-dependentních kináz a proteinů cyklinů.



Obr. 4 Kontrolní body v průběhu buněčného cyklu (upraveno) (16)

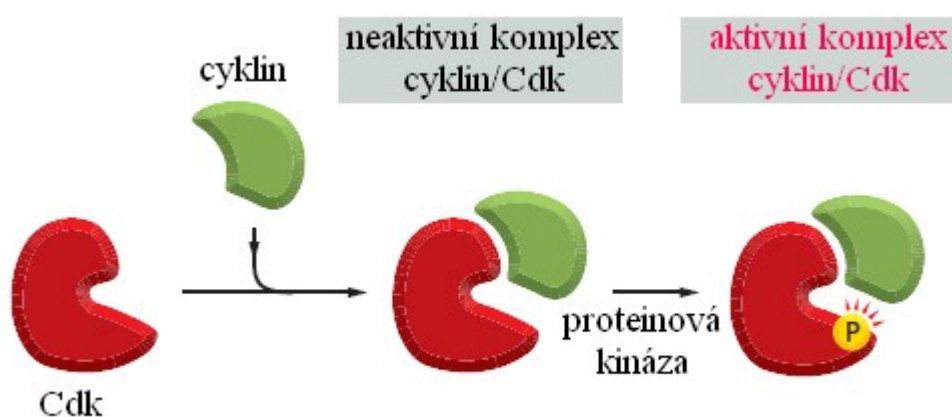
4.1 Cykliny a cyklin-dependentní kinázy (Cdk)

Jak již bylo řečeno v předchozím odstavci, Cdk slouží jako kontrolní body, které regulují průchod buňky buněčným cyklem a za fyziologických podmínek zabraňují nekontrolované proliferaci a vzniku rakovinného onemocnění. Chemicky se definují jako heterodimerické proteinkinázy složené ze dvou podjednotek: katalytické (Cdk), která obsahuje aktivní místo pro navázání ATP, a regulační (cyklin) (17).

Jelikož je buněčný cyklus velmi složitý proces, podílí se na jeho regulaci celá plejáda komplexů Cdk, přičemž každý z nich má rozdílnou funkci a ve své molekule obsahuje vazebné místo pro molekuly partnerských cyklínů. V lidském genomu se vyskytuje celkem 12 serin/threoninových enzymů z rodiny Cdk, avšak jen 5 z nich se přímo zapojuje do regulace buněčného cyklu, konkrétně Cdk 1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 a Cdk6 (17). Ostatní Cdk mají klíčové role v průběhu transkripce (18).

Cdk jsou v průběhu buněčného cyklu přítomné neustále, koncentrace jejich příslušných cyklínů však kolísá v závislosti na jednotlivých fázích cyklu (19). Tvorba a odbourávání cyklínů tedy reguluje aktivitu Cdk a tím přechody mezi fázemi cyklu. Cykliny se dělí do několika tříd, které se označují písmeny A až H (20).

I když oscilace hladin jednotlivých cyklínů hraje důležitou roli při regulaci aktivity Cdk, maximální aktivace celého komplexu cyklin/Cdk je způsobena jeho dodatečnou fosforylací pomocí CDK-aktivačních kináz (viz obr. 4). Poté co je komplex fosforylován, přenáší následně volný fosfát na cílové proteiny v buňce, které zodpovídají za jednotlivé procesy při buněčném cyklu (například kondenzace chromozomů, rozpad jaderné membrány apod) (10).



Obr. 4 Fosforylace komplexu cyklin/Cdk pomocí Cdk-aktivační kinázy (upraveno) (10)

4.1.1 Komplexy cyklin/Cdk v G1 fázi

V případě, že je buňka stimulována růstovými faktory a vystupuje z G0 fáze, dochází k expresi cyklinů třídy D. Tato syntéza je zahájena pomocí externích mitogenních signálů, stejně, jako jimi může být i přerušena (20). Jejich partnerské proteinkinázy jsou Cdk4 a Cdk6. Zároveň jsou v G1 fázi exprimovány i cykliny třídy C, které tvoří komplexy s Cdk8. Poznatky o jejich aktivitě však prozatím nejsou příliš rozsáhlé (20).

První komplexy cyklin D/Cdk4, popřípadě cyklin D/Cdk6, se formují ve střední G1 fázi a jejich katalytická aktivita vrcholí blízko přechodu G1/S fáze. Pokud jsou mitogenní signály v průběhu fáze utlumeny, aktivita Cdk vymizí a cykliny D jsou proteolyticky odbourány (20).

Hlavním substrátem pro komplex Cdk a cyklinu D je retinoblastomový protein (pRB), což je tumor-supresorový protein zodpovědný za inhibici transkripce a růstu buňky a tím i zamezení vstupu do S fáze (21). Rb protein je v G1 fázi hypofosforylovaný, proto na sebe váže rozmanité regulační proteiny a transkripční faktory, bez jejichž uvolnění nemůže být zahájena transkripce, a tedy ani proliferace. Jakmile však dojde k expresi cyklinu D a aktivaci Cdk, je pRB těmito komplexy fosforylovan a regulační proteiny společně s transkripčními faktory se uvolní. Jejich aktivní produkty poté převedou cyklus do S fáze (20).

V případě, že dochází k nadměrné fosforylaci pRB (nedostatečná inhibice Cdk, nebo naopak nadměrná produkce cyklinu D), není buňka schopná kontrolovat přechod mezi G1 a S fázi. Tyto defekty vedou ke genomové nestabilitě, popřípadě přímo k nádorovému bujení (20).

4.1.2 Komplexy cyklin/Cdk v rozhraní G1/S

Poté, co dojde k dostatečné fosforylaci proteinu pRB, buňka prochází kontrolním bodem G1/S a vstupuje do S fáze. V této části začíná exprese cyklinu E, který interaguje s Cdk2 a společně přispívají k fosforylaci pRB a dalších substrátů, které zajišťují tvorbu genů nezbytných pro postup do další fáze cyklu (20).

4.1.3 Komplexy cyklin/Cdk na rozhraní S/G2 a ve fázích S a G2

Během S fáze dochází k expresi především cyklinu A, jehož koncentrace v buňce dosahuje vrcholu v časně G2 fázi. Tvoří aktivní komplex s Cdk2, na rozhraní S/G2 fáze se však odštěpuje, a začíná tvorbu komplexu s proteinkinázou Cdk1. Při vstupu do M fáze

však dochází k rozpadu jaderné membrány, cyklin A degraduje a Cdk1 uvolňuje své vazebné místo.

Následujícím komplexem syntetizovaným v S fázi je cyklin B v interakci právě s Cdk1, který dosahuje své maximální koncentrace na rozhraní G2/M (20).

4.1.4 Komplexy cyklin/Cdk na rozhraní G2/M a ve fázi M

M fáze buněčného cyklu je zahájena poté, co se v jádře buňky nahromadí dostatečné množství cyklinu B ve vazbě s Cdk1, která se během celého období interfáze nachází mimo jádro, v cytoplazmě. Pokud cyklin B chybí, nebo je neaktivní, mitóza není ukončena a buněčný cyklus se zastaví (20).

5. INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁZ

Současný výzkum prokázal, že mutace buňky zahrnující změnu aktivity Cdk (deaktivace Cdk inhibitorů, nadměrná exprese cyklinů) jsou jedny z nejčastějších příčin vzniku rakovinných onemocnění (18) (17). Tato zjištění vedla k myšlence syntetizovat molekuly, které budou schopné aktivitu těchto enzymů regulovat, respektive je inhibovat. Bohužel, prozatím jsou všechna potenciální terapeutika v klinickém testování, žádný inhibitor Cdk zatím nebyl schválen pro komerční použití (18).

Za zmínku stojí i přínos olomouckých vědců, kteří významně k objevu syntetických Cdk inhibitorů (CdkI) přispěli (5).

5.1 Přirozené inhibitory CDK

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že aktivita Cdk je řízena především interakcí s jejich partnerskými cykliny a následnou fosforylací/defosforylací tohoto komplexu. Další možností, jak ovlivnit, respektive utlumit aktivitu těchto proteinkináz, je vazba s jejich přirozenými inhibitory (CdkI). V savčím genomu bylo objeveno celkem sedm CdkI a ty se podle místa účinku a struktury formálně rozdělují do dvou skupin: Cip/Kip proteiny a INK4 proteiny (22).

Rodina INK4 proteinů zahrnuje proteiny p16^{Ink4A}, p15^{Ink4B}, p18^{Ink4C} a p19^{Ink4D}, které mají velmi podobnou strukturu (23). Jak lze vyčíst z jejich názvu, ovlivňují aktivitu především proteinkinázy Cdk4 (INK4 = inhibitor kinase 4), mohou se však také podílet i na inhibici Cdk6 (24).

Hlavními zástupci rodiny Cip/Kip jsou proteiny p21^{Cip1}, p27^{Kip1} a p57^{Kip2}. Na rozdíl od rodiny INK4 jsou schopné inhibovat aktivitu jak Cdk, tak všech jejich příslušných cyklínů (25).

5.2 Syntetické inhibitory Cdk (CdkI)

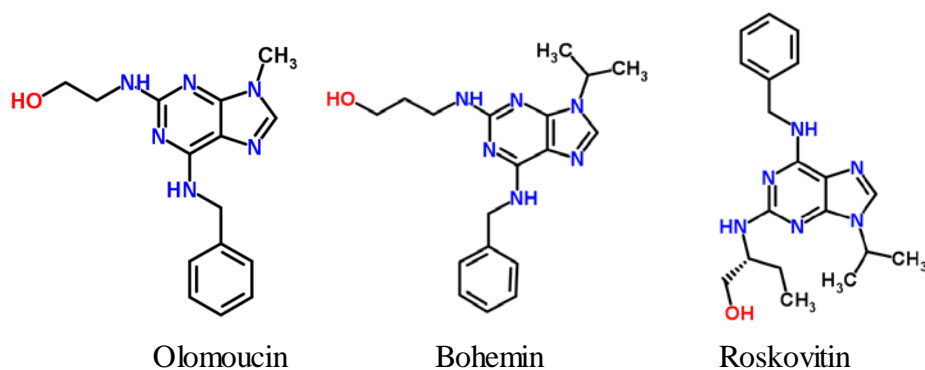
Snaha o syntetizování nových sloučenin, které by svými účinky simulovaly Cip/Kip proteiny, započala současně s objevováním přirozených inhibitorů na začátku 90. let 20. století (26). První specifické syntetické inhibitory Cdk byly objeveny a popsány několika skupinami autorů nezávisle na sobě. Mezi tyto inhibitory, tzv. inhibitory první generace, patří především Butyrolakton 1 (27), Olomoucín (5) a Flavopiridol (28). Tyto molekuly, jež svými účinky inhibují většinu Cdk, byly uvedeny do klinických testů, pro jejich nedostatečný terapeutický efekt a nízkou selektivitu však nikdy nepokročily dále než do 3. fáze testování (18). Inhibitory 2. generace jsou prozatím pouze v preklinickém testování.

Majorita těchto inhibitorů má stejný mechanismus účinku, a to kompetici s přirozeným substrátem ATP, který na Cdk přenáší svůj volný fosfát. Pokud není vazba ATP na Cdk umožněna, nedochází ani k jeho fosforylaci a tím k aktivaci komplexu cyklín/Cdk.

5.2.1 Purinové CdkI

Deriváty 2,6,9-trisubstituovaných purinových Cdk inhibitorů jsou intenzivně zkoumány od doby, kdy byly během testování účinků rostlinných hormonů cytokininů prokázány silné inhibiční účinky derivátu 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurinu. Tato sloučenina byla na počest místa jejího objevení pojmenována **Olomoucín**. Je to kompetitivní substrát pro ATP a selektivně inhibuje komplex cyklín B/Cdk1, který je klíčový při vstupu buňky do mitotické fáze (29). Protože však jeho cytostatické účinky nepatří k nejvyšším, byly vyvinuty další deriváty, substituované rozdílnými skupinami, jako například 2-(3-hydroxypropylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin neboli Bohemin, Roskovitin a Olomoucín II (obr. 5) (30).

Bohemin je inhibitor, u kterého byly prokázány cytotoxické účinky in vitro a in vivo. Způsobuje zadržení buněčného cyklu prostřednictvím blokády Cdk7, což je kináza zodpovědná za aktivační fosforylaci ostatních buněčných Cdk, které jsou tak nepřímě také inhibovány. Nejvyššího účinku Bohemin nabývá na rozhraní fází G1/S buněčného cyklu, kdy vrcholí katalytická aktivita Cdk4 (31). Ta je, jak již bylo řečeno, nepřímě inaktivována zamezením fosforylace prostřednictvím Cdk7.

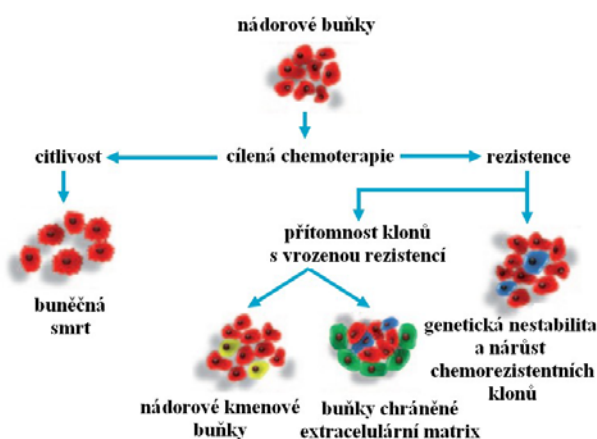


Obr. 5 Strukturální vzorce Olomoucínu, Bohemínu a Roskovitinu (32)

6. REZISTENCE NA CYTOSTATIKA

Rezistence nádorových buněčných linií k cytostatikům je v dnešní době jedna z nejzávažnějších příčin selhání protinádorové terapie (viz obr. 6). Za vznik tohoto závažného fenoménu je odpovědná celá řada mechanismů, které ať samostatně, tak v kombinaci, zapříčínují vážné komplikace při léčbě nádorových onemocnění. Základní dělení buněčné rezistence je na primární (přirozenou) a sekundární (získaná) (33). Primární rezistence je vrozená, buňky tedy mají vyvinuté přirozené ochranné mechanismy, kterými se brání cytotoxické léčbě a jeví tak odolnost k cytostatiku již při prvním podání léčiva. Sekundární rezistence je zapříčiněna opakovaným vystavováním účinkům protinádorových léčiv, kdy se původně citlivé buňky stávají vůči konkrétní látce rezistentní (34).

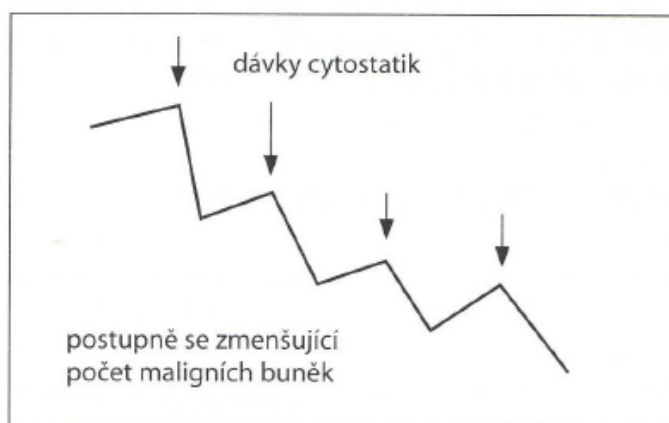
Problém terapie nádorových onemocnění je z velké části vysoká různorodost nádorů. Při cílené léčbě se obvykle nepodaří efektivně inhibovat růst všech nádorových subpopulací, což vede k expanzi buněčné linie, která vykazuje nejvyšší chemorezistenci. Tímto selektivním tlakem a opětovnou zvýšenou proliferací nádorových buněk dochází k recidivě nemoci (3).



Obr. 6 Předpokládaný účinek chemoterapie na nádorové buňky (upraveno) (34)

6.1 Mechanismus vzniku rezistence

Cytostatika působí dominantně na proliferující buněčné populace. Všechny nádorové linie však mají určité procento buněk, vyskytujících se v klidové G0 fázi, kdy neproliferují a mají omezenou citlivost na cytostatika. Při chemoterapii tato subpopulace tedy neodpovídá na léčbu – je relativně rezistentní. Aby se bylo dosaženo nejlepších výsledků při léčbě, je nutné léčiva správně dávkovat tak, aby došlo ke zničení co nejvíce proliferujících buněk. Toho je dosaženo opakovaným podáváním léčiva v intervalech, kdy v pauze mezi terapiemi dochází k malému nárůstu nádorové populace, ale po podání léčiva se počet maligních buněk opět výrazně sníží (viz obr. 7). V případě, že je nárůst mezi terapiemi příliš rychlý, může docházet ke vzniku rezistence a nádorové buňky nejsou nadále redukovány (35).



Obr. 7 Dávkování antiproliferačních terapeutik pro dosažení optimálních výsledků (35)

Způsoby, kterými vzniká buněčná rezistence na protinádorovou léčbu, jsou velmi komplexní. V zásadě jsou však tři hlavní mechanismy, které se zde nejčastěji uplatňují, a to změny farmakokinetické, cytokinetické a funkční změny buňky (6). Při změnách farmakokinetiky dochází ke změnám v metabolismu léčiva, ať už se jedná o urychlení biotransformace a vylučování nebo naopak o snížení resorpce cytostatika. Tyto změny jsou nejméně významné. Cytostatické změny doprovází změny v buněčném cyklu, kdy většina buněk přejde do G0 fáze cyklu, kdy, jak již bylo řečeno, je jejich citlivost k chemoterapii omezená. S rostoucí nádorovou masou zároveň také dochází ke zvýšené mutaci buněk, což zvyšuje heterogenitu populace a tím i rozdílnou citlivost jednotlivých klonů na cytostatika (6). V neposlední řadě, jednou z nejčastějších příčin vzniku chemorezistence jsou změny ve fyziologické funkci buňky, kdy je snížena koncentrace či aktivita enzymů nutných pro konverzi cytostatika na účinnou látku. Problém však může nastat i v opačném případě, tedy pokud je koncentrace enzymů zvýšená – cytostatika nedostatečně blokují jejich aktivitu a

buňka tím získává rezistenci. Dalšími možnostmi vzniku rezistence může být nedostatečná možnost transportu cytostatika buněčnou membránou či jeho aktivní transport z buňky (3).

6.2 Mnohočetná léková rezistence (MDR)

Rezistence na konkrétní léčivo může vyústit v rozmanité změny v buněčné fyziologii, které oslabují účinky nejen použitého terapeutika, ale i dalších, strukturně odlišných sloučenin. Tento fenomén se nazývá mnohočetná léková rezistence (MDR) a vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k novým cytostatikům, nepoužitým v původní terapii (6).

Lékové rezistence jsou rozděleny podle biochemických změn v buňce buďto na klasickou (typickou) MDR, nebo neklasickou (atypickou) MDR (36). Při klasické MDR dochází k nadprodukci membránového glykoproteinu P (Pgp), který je produktem tzv. MDR-genu a je členem rodiny transportních proteinů, které zodpovídají za transport toxinů z intracelulárního prostoru do vnějšího prostředí (3). Jako neklasická MDR jsou označovány všechny ostatní mechanismy, kterých se neúčastní Pgp. Mezi tyto mechanismy je zahrnuta například změna subcelulární distribuce léčiva nebo poškození cílové struktury léčiva (6).

Mechanismů vzniku MDR je nespočet některým z nich budou věnovány následující podkapitoly. Identifikace mechanismů účastnících se vzniku MDR je důležitá pro budoucí vývoj nových, efektivnějších léčiv, které by mohly potenciálně přispět k překonání tohoto problému.

6.2.1 Efluxové ABC transportéry způsobující MDR

Biologickými změnami nelze přesně vysvětlit všechny projevy MDR, byla však popsána řada proteinů, které jsou spojovány s jejím vznikem. Ve většině případů se jedná o ABC transportéry. Jejich název získaly podle toho, že ve své struktuře obsahují ATP-vazebnou kazetu (ATP-binding cassette) – jedná se tedy o ATP-dependentní proteiny (potřebují k transportu látek molekulu ATP). V současné době bylo popsáno 49 členů rodiny ABC transportérů, přičemž se tyto proteiny navíc dělí do 7 podskupin, pojmenovaných ABCA až ABCG (37).

Tyto proteiny ovlivňují kumulaci terapeutika v buňce a způsobují jeho exkreci do extracelulárního prostoru. Tento děj probíhá za spotřeby ATP, který je v buňce hydrolyzován na ADP a uvolněná energie z této reakce je poté dále využita na transport

substrátu ven z buňky směrem proti koncentračnímu gradientu (38). Jednou z hlavních charakteristik těchto transportérů je také jejich biochemické složení. Základní jednotkou proteinu je transmembránová doména (TMD), která je následována hydrofilní cytoplazmatickou nukleotid-vázající doménou (NBD) (39).

Z důvodu velmi široké substrátové specifity existuje několik hypotéz o mechanismech transportu přes membránu. Patří mezi ně například tzv. teorie konvenčního transportu, která udává, že transport substrátu z buňky probíhá přes vodní porus, tedy „průchod“, který má přizpůsobivé vazebné místo pro substrát. Další významnou teorií je také model „hydrofobního vakuového čističe“, kdy mají ABC-přenašeče schopnost rozeznat hydrofobní sloučeniny díky jejich inkorporaci do lipidové dvojvrstvy v cytoplazmatické membráně. Tato teorie zatím byla nejvíce podpořena (6).

Mezi nejvýznamnější zástupce patří již zmiňovaný protein Pgp, MRP (multidrug resistance associated protein) a LRP (lung resistance related protein) (6) (40).

Multidrug resistance associated protein (MRP)

MRP je lokalizován na cytoplazmatické membráně a membránách endoplazmatického retikula. Jedná se o ATP-dependentní transportní protein, který napomáhá vylučování xenobiotických látek, konkrétně hydrofobních, záporně nabitých substrátů, z intracelulárního prostředí a zabraňuje též jejich kumulaci uvnitř buňky. Skládá se z 1531 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 190 kDa. Jeho gen lokalizován na 16. chromozom. U člověka bylo doposud identifikováno 6 zástupců MRP proteinů, z nichž pouze MRP1 má význam pro navození lékové rezistence (40).

Zajímavou skutečností je fakt, že snížením exprese MDR dochází opět k obnovení chemosenzitivity (40).

Lung resistance related protein (LRP)

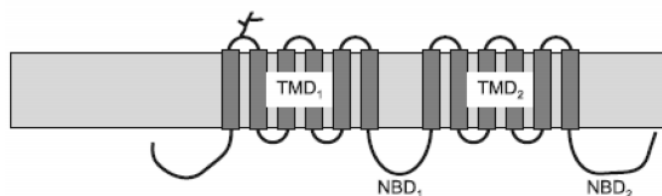
LRP byl poprvé identifikován na buněčné linii plicního karcinomu na začátku 90. let (41). Tento protein, známý též pod jménem MVP (major vault protein) se nachází ve velké míře v lékově rezistentních buněčných liniích (42). Jeho molekulová hmotnost je 110 kDa a je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 16, blízko genu pro MRP.

LRP je složkou tzv. vaults, což jsou ribonukleoproteinové komplexy složené z proteinových částic a z malých molekul RNA (40). Tyto organely jsou přítomny v cytoplazmě u všech eukaryotických organismů. Na základě výzkumů se předpokládá, že

funkce LRP je transport xenobiotik z jádra buňky do cytoplazmy a zabraňuje kumulaci toxických látek v jádře (42).

P-glykoprotein

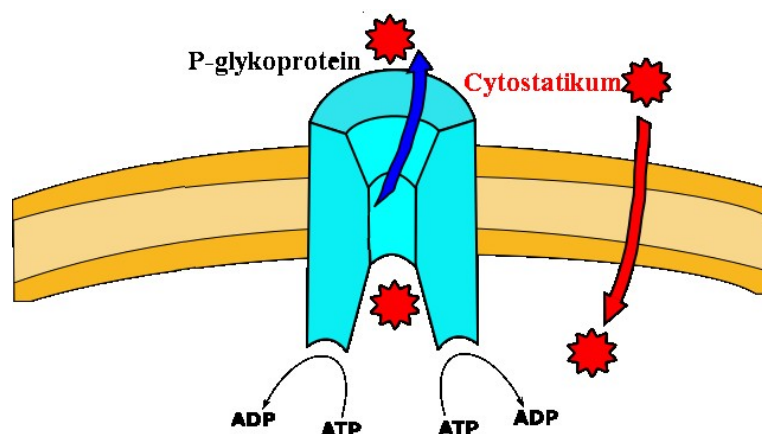
P-glykoprotein, neboli ABCB1, neboli protein p170, je neznámější člen rodiny transportních ABC proteinů a jak již bylo zmíněno, je produktem tzv. MDR-genu, který je lokalizován na delším raménku 7. chromozomu. Jeho molekulová hmotnost je asi 170 kDa, v závislosti na jeho glykosylaci, a jedna molekula je složena z 1280 aminokyselin (6). Pgp má klasickou strukturu ABC transportéru; je složen z dvou TMD a dvou NBD (viz obr. 8) (39). Exprese tohoto proteinu se v jednotlivých nádorových tkáních liší – nejvyšší bývá u kolorektálních karcinomů a u karcinomů jater, ledvin a pankreatu (3).



Obr. 8 Struktura glykoproteinů P tvořená 2 transmembránovými doménami TMD a dvěma nukleotid-vázacími doménami NBD (39)

Hlavní funkcí tohoto ABC transportéru je ochrana před xenobiotiky a toxiny a jejich transport do extracelulárního prostoru (viz obr. 9). Jeho zvýšená exprese způsobuje, že je buňka rezistentní jak k chemoterapeutickým substrátům, tak i k dalším neutrálně či kladně nabitým hydrofobním sloučeninám (40).

Předpokládá se, že nadměrná exprese Pgp je způsobena více faktory, a to například amplifikací nebo mutací ABCB1 genu nebo změnami v jeho translaci (37).



Obr. 9 Mechanismus transportu cytostatika buněčnou membránou prostřednictvím Pgp

6.2.2 Změny na úrovni apoptotické dráhy způsobující MDR

Množství výzkumů bylo věnováno možnosti vzniku MDR skrz skupinu genů/proteinů, kontrolujících apoptózu (programovanou buněčnou smrt). Nejznámější z nich je rodina proteinů Bcl-2, které regulují mitochondriální apoptotickou dráhu.

Apoptóza mitochondriální dráhou je způsobena situacemi, které jsou pro buňku stresující, například poškození DNA zapříčiněné ozářením, chemoterapeutiky apod. Poškození DNA vede k aktivaci tumor-supresorového proteinu p53, což je transkripční faktor a indukuje expresi právě proteinů Bcl-2 (43). Tyto proteiny jsou lokalizovány převážně v membránách mitochondrií, ale také i v cytosolu a v membráně endoplazmatického retikula (44).

Průběh apoptózy vnitřní dráhou je regulován poměrem proapoptotických a antiapoptotických zástupců z rodiny Bcl-2 v mitochondriích. Proapoptotické proteiny z podrodiny BAK a BAX permeabilizují vnější membránu mitochondrie a indukují apoptózu uvolněním dalších proapoptotických proteinů do cytoplazmy. Antiapoptotické proteiny, oproti tomu, tyto proapoptotické proteiny blokují (45). V nádorových buněčných liniích je tato „harmonie“ často narušena a buňky tak unikají apoptóze, což může vést ke vzniku rezistence.

6.2.3 Změny v aktivitě topoizomerázy II

Topoizomeráza II (TOPO II) je enzym zapojující se do replikace a je také cílovou strukturou pro mnoho protinádorových léčiv (40) (46). TOPO II během replikace rozštěpuje dvoušroubovici DNA a zároveň kontroluje, aby při rozpojování vazeb mezi dusíkatými bázemi nedošlo k „zamotání“ vlákna DNA. Několik tříd antiproliferačních léčiv, včetně

antracyklinů, epipodofylotoxinů a amidoakridinů inhibují katalytickou aktivitu TOPO II (46).

Její nedostatečná produkce, nebo mutace v primární struktuře, hraje roli při vzniku lékové rezistence – rezistentní populace vyžadují pro aktivaci TOPO II větší množství ATP, než nerezistentní klony a proto je její aktivita omezena (40).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. POUŽITÝ MATERIÁL

7.1 Buněčné linie

Pro účely této bakalářské práce byly použity nádorové linie HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/- (Horizon), odvozené od lidského kolorektálního karcinomu. Linie HCT 116 p53 -/- byla uměle vytvořena delecí genu pro tvorbu tumor-supresorového proteinu p53. Jedná se o buňky adherentního typu, jejich nárůst tedy probíhal na stěně plastové kultivační lahve.

Buněčné linie byly kultivovány v médiu McCoy's 5A s přidavkem L-glutaminu do koncentrace 1,5 mM, antibiotik penicilinu-streptomycinu a 10% přidavkem fetálního bovinního séra (FBS). Kultivace buněk probíhala v kultivačních lahvích o ploše 75 cm². Láhve byly uchovávány v inkubátoru v prostředí s 5% obsahem CO₂, 95% vlhkostí a za teploty 37°C.

7.2 Chemikálie

Tab. 1: Chemikálie použité při experimentech společně s jejich výrobcí

5-bromo-2'-deoxyuridin	125H0932, Sigma-Aldrich, USA
5-bromouridin	850187, Sigma-Aldrich, USA
ATB (penicilin, streptomycin)	115M4795V, Sigma-Aldrich, USA
Bohemin	poskytla LEM ÚMTM
BSA (bovinní sérový albumin)	A7906, Sigma-Aldrich, USA
Cell Wash	BD Biosciences, USA
Citrát trisodný dihydrát	S4641, Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 médium	RNBF1543, Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	605458, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR
FC receptor saturation reagent	732802, Beckman Coulter, USA
Formaldehyd	20120625, Dr Kulich Pharma s.r.o., ČR
FBS (fetální bovinní sérum)	P110704, PAN-Biotech, Německo
Glutamin	G6392, Sigma-Aldrich, USA
Glycin	14864, Serva, Německo
HCl	A150273/01, Lachema, ČR
MTS	G1111, Promega, USA
Mc Coy's 5A médium	M8403, Sigma-Aldrich, USA

Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	30870, Lach-Ner, s.r.o., ČR
Nonidet P 40 (NP-40)	74385, Sigma-Aldrich, USA
Propidium jodid	SLBH8362V, Sigma-Aldrich, USA
Permeabilizační činidlo	340973, BD Biosciences, USA
Ribonukleáza A	060M7000V, Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100	1000009002931, Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	37470, Serva, Německo 37470

7.2.1 Seznam použitých protilátek

Pro analýzu syntézy RNA a DNA

Primární protilátka Anti-BrdU-FITC (11-286-C100, Exbio, ČR)

Sekundární protilátka Anti-Mouse-IgG-FITC (F2883, Sigma-Aldrich, USA)

Pro analýzu DNA byl poměr ředění obou protilátek v promývacím roztoku 1:250.

Pro analýzu RNA byl poměr ředění primární protilátky v promývacím roztoku 1:500, sekundární protilátky v promývacím roztoku 1:250.

Pro analýzu fosforylace histonu H3-P

Primární protilátka Anti- H3^{pSer10}-FITC (06-570, Merck Millipore, Canada)

Sekundární protilátka Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific USA)

Pro analýzu fosforylace histonu byl poměr ředění primární protilátky v promývacím roztoku 1:200, sekundární protilátky 1:250.

Pro analýzu exprese glykoproteinu P

Primární protilátka Monoclonal Anti-P Glycoprotein produced in mouse (P7965, Sigma-Aldrich, USA)

Sekundární protilátka Anti-Mouse-IgG-FITC (F2883, Sigma-Aldrich, USA)

Izotypová kontrola IgG2 Isotype control from murine myeloma (M5534, Sigma-Aldrich, USA)

Pro analýzu exprese glykoproteinu P byl poměr ředění primární i sekundární protilátky v blokačním roztoku 1:250, izotypová kontrola pak byla ředěna v poměru 1:400.

7.3 Přístroje

Tab. 2: Přístrojová technika použitá při experimentech společně s jejími výrobci

Laminární box HeraSafe	ThermoScientific, USA
Inkubátor s CO ₂ atmosférou	Thermo Scientific, USA
Světelný inverzní mikroskop	Olympus IX51, Japonsko
Počítadlo buněk Vi-Cell XR	Beckman Coulter, USA
Čtečka mikrotitračních destiček	Perkin Elmer, USA
Pipetovací přístroj ECHO 555 Liquid handler	LabCyte, USA
Průtokový cytometr FACS Calibur	BD Biosciences, USA
centrifuga	Eppendorf, Německo
Analytické váhy	Scaltech, USA
Vodní lázeň Sub aqua 12 plus	Grant Instruments, Velká Británie
Vortex Genie 2T	Scientific Industries, USA
Magnetická míchačka MSH3	Biosan, Lotyšsko

7.4 Spotřební materiál

Plastové kultivační lahve (TPP Trasadigen, Švýcarsko)

šestijamkové a dvanáctijamkové panely (TPP Trasadigen, Švýcarsko)

cytometrické zkumavky (BD Falcon, USA)

1536-jamkový panel (Perkin Elmer)

Petriho misky (TPP Trasadigen, Švýcarsko)

8. METODIKA PRÁCE

Pro tuto bakalářskou práci bylo využito stanovení střední inhibiční koncentrace (IC₅₀) pro Bohemin (BOH) pomocí MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium) testu pro buněčné linie HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/-. Na základě těchto měření byly poté stanoveny výsledné koncentrace (3×IC₅₀), kterých mělo být dosaženo pravidelným ošetřováním buněk syntetickým inhibitorem Cdk BOH za účelem získání rezisteních klonů. Tyto rezistentní a nerezistentní klony byly poté podrobeny analýzám pomocí metody průtokové cytometrie pro porovnání jejich vybraných vlastností.

Průtoková cytometrie je běžná, často využívaná metoda v laboratořích medicínského či biologického zaměření. Má velmi široké využití; lze ji použít například k vyhodnocení

a charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností buněk jako k analýze syntézy DNA a RNA, k hodnocení míry apoptózy, ale také k vyhodnocení exprese mnohých membránových a intracelulárních proteinů (47).

Průtokový cytometr využívá inkorporace fluorescenčního barviva do rozdílných buněčných komponent, například do DNA či RNA. Takto označené buňky jsou nesený v kapiláře a poté vstřikovány do proudu nosné kapaliny, která soustřeďuje buňky v centrálním kanálku. Následně jsou buňky dopraveny do měřicí cely, kde je fluorescenční signál detekován laserovým paprskem (47).

8.1 Pasážování buněčných linií

Buňky byly kultivovány v médiu McCoy's 5A v inkubátoru v prostředí s 5% obsahem CO₂, 95% vlhkostí a za teploty 37°C. (viz kapitola 7.1). Pro opakovatelnost pokusů byly buňky každý druhý den pasážovány. Tento proces byl nutný k jejich správnému naředění v kultivačním médiu a zároveň umožňoval další nerušený nárůst buněčných linií. Pasážování probíhalo ve sterilním prostředí ve flowboxu s laminárním prouděním vzduchu.

Pro vyloučení kontaminace byly buňky před každou pasáží nejprve pozorovány pod inverzním světelným mikroskopem a následně byla stanovena jejich viabilita pomocí přístroje Vi-Cell XR. Pro experimenty byly používány buněčné linie s viabilitou vždy větší než 95%.

Při pasážování se nejprve slilo staré médium a kultivační lahve byly dvakrát propláchnuty 10 % roztokem fosfátového pufru (PBS) v deionizované vodě. Po odstranění média bylo do lahví odpipetováno několik ml roztoku TrypLE, díky kterému byly buňky enzymaticky uvolněny z podkladu. Lahve s buněčnou suspenzí byly poté propláchnuty kultivačním médiem a přebytek byl slit do odpadní lahve. Následně byl zbytek buněčné suspenze doplněn čerstvým médiem na objem 15 ml. Na víkend byl celkový objem navyšován na 20 ml.

8.2 Příprava Cdk rezistentních linií

Rezistentní klony odvozené od buněčných linií HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/- byly vyselektovány po dlouhodobém vystavení účinkům syntetického inhibitoru Cdk. Během tohoto procesu buňky získaly rezistenci k prostředí s koncentrací Cdk iontů převyšující jejich běžnou IC₅₀.

Pro účely této bakalářské práce byl použitý syntetický Cdk inhibitor BOH, který se chová jako kompetitivní inhibitor vazby ATP na Cdk a tím blokuje proliferaci (5). Byly u něj prokázány silné cytotoxické účinky k mnoha nádorovým liniím v podmínkách in vitro. Byl však rovněž účinný v podmínkách in vivo, kdy docházelo k blokaci Cdk7, který zajišťuje aktivační fosforylaci ostatních Cdk, které tak byly nepřímo inhibovány (31).

Rezistentní linie byly kultivovány ve dvanáctijamkových panelech za přítomnosti média. Do každé jamky byly vysety buňky v koncentraci 5×10^4 buněk/1 ml. Buněčné linie byly pravidelně ošetřovány BOH rozpuštěným v DMSO do koncentrace 10 mmol/dm^3 .

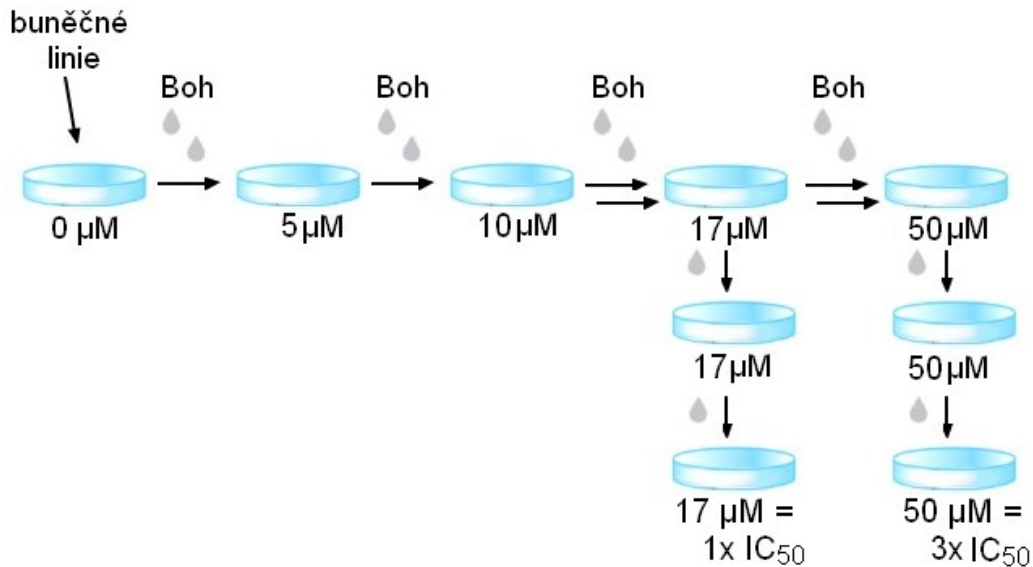
Příprava rezistentních klonů probíhala vždy nejméně tři měsíce a byla prováděna dvěma způsoby, a to postupným navyšováním koncentrace a empirickým stanovením koncentrace optimální pro růst rezistentních klonů.

8.2.1 Postupné navyšování koncentrace

Tato metoda spočívala v postupném zvyšování koncentrace inhibitoru. Buňky byly inkubovány ve dvanáctijamkovém panelu za přítomnosti média s cytostatikem o předem dané koncentraci po dobu 48 hodin. Poté bylo médium vyměněno a aplikováno nové cytostatikum o totožné koncentraci. Při každé výměně média byly pod mikroskopem pozorovány morfologické změny a množství buněk uvolněných z povrchu dna jamky, které indikovalo míru vlivu cytostatika na linii. Pouze buňky, které vykazovaly normální růst, byly dále kultivovány.

Množství přidaného BOH bylo vždy po 7 dnech inkubace v prostředí s odpovídající koncentrací zvyšováno tak, aby skok koncentrací nebyl větší než $5 \text{ } \mu\text{M}$ a aby bylo dosaženo optimální viability buněk v dané koncentraci (viz obr. 10). Tato změna koncentrace byla stanovena po optimalizaci postupu.

Buňky byly takto udržovány pod terapeutickým vlivem cytostatika nejméně 3 měsíce.



Obr. 10 Schéma přípravy BOH rezistentních klonů na buněčné linii HCT 116 parental

8.2.2 Stanovení optimální koncentrace vhodné pro růst rezistentních klonů

Dalším způsobem pro získání rezistentních klonů bylo empirické stanovení optimální koncentrace pro růst rezistentních klonů na základě pozorované proliferace nádorových linií po ovlivnění BOH. Buňky byly kultivovány ve dvanáctijamkovém panelu, kdy bylo do jednotlivých jamek aplikováno cytostatikum v různých koncentracích, přičemž nejnižší koncentrace byla stanovena jako $1 \times IC_{50}$ a nejvyšší jako $5 \times IC_{50}$. Po 48 hodinové inkubaci se vizuálně pod inverzním mikroskopem vyhodnotilo množství uvolněných buněk z povrchu kultivační lahve. Buňky, které vykazovaly nejlepší viabilitu, byly přeneseny do kultivační lahve, kde probíhalo další ošetřování BOH.

V dané koncentraci byly v kultivačních lahvích buňky udržovány 14 dní, poté byla zvýšena vždy o $20 \mu M$. Ovlivnění BOH probíhalo do té doby, než vznikla stabilní rezistentní buněčná linie.

8.3 Stanovení hodnoty IC_{50} pomocí MTS testu

Testy životaschopnosti buněk využívajících tetrazoliové soli se staly jedněmi z nejvíce užívaných biologických metod pro měření metabolické aktivity buněčných linií (48). Tyto testy se používají především na měření cytotoxických účinků rozmanitých sloučenin na buňky. Hlavní klady tohoto testu jsou jeho jednoduchost, přesnost a rychlá indikace antiproliferační aktivity (49).

MTS test je založen na konverzi tetrazoliové soli na barevný, ve vodě rozpustný formazan. Tato přeměna je způsobena mitochondriálními dehydrogánázami metabolicky

aktivních buněk a probíhá při 37°C. Množství přeměněného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk přítomných ve vzorku (49).

Pro MTS test byly buňky připraveny v koncentraci $1,38 \times 10^6$ buněk/ml, nanесeny na 1536-jamkové destičky a ponechány 24 hodin v inkubátoru, při teplotě 37°C, vlhkosti 95% a 5% obsahem CO₂. K buňkám byl následně přidán BOH v koncentraci 50 μM a destička byla inkubována po 72 hodin v inkubátoru. Po uplynutí této doby byl k vzorkům přidán 1 μl MTS (8,5 mM) a destičky byly opět inkubovány, tentokrát 90 minut. Následně byla na přístroji EnVisionMultimode Plate Reader změřena absorbance ($\lambda = 490$ nm).

V druhém kroku byl BOH testován v koncentračním rozmezí 0,12-50 50 μM. Takto se stanovila hodnota IC₅₀, tedy střední inhibiční koncentrace, při které dochází k 50% inhibici životaschopnosti buněk. Vyhodnocení poté probíhalo v programu Dotmatics. Výsledky byly poté zpracovány v programu Microsoft Excel.

8.4 Analýza vlastností buněčné linie pomocí průtokové cytometrie

Mnohé laboratoře využívají průtokovou cytometrii jako metodu pro kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení a charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností buněk. V současné době se jedná o jeden z nejmodernějších způsobů analýzy buněčných populací.

V této bakalářské práci je průtoková cytometrie využita pro stanovení míry syntézy DNA a RNA, analýzu buněčného cyklu a fosforylace histonu H3, detekci procentuálního zastoupení apoptotických buněk a analýzu exprese glykoproteinu P.

8.4.1 Fixace buněk pro analýzu na průtokovém cytometru

Při izolaci vzorku linie z jeho přirozeného prostředí (v našem případě z kultivačního média) dochází rychle k autolýze, tedy posmrtným změnám na buňce. Aby bylo tomuto procesu zabráněno, provádí se tzv. fixace, při které je autolýze zamezeno díky rychlé denaturaci bílkovin a enzymů.

Pro analýzu syntézy DNA je využíván zásobní roztok BrdU v koncentraci 10 mM a pro analýzu syntézy RNA roztok BrU v koncentraci 100 mM, rozředěné v kultivačním médiu RPMI 1640. Oba roztoky jsou poté naředěny tak, aby jejich finální koncentrace v buněčné suspenzi byla 10 μM.

Fixace pro analýzu DNA, buněčného cyklu a fosforylace histonu se provádí do ledově vychlazeného 70% ethanolu, pro fixaci buněk na analýzu RNA je využito PBS s 1% přídavkem formaldehydu a 0,05% přídavkem NP-40. Fixace pro analýzu exprese glykoproteinu P se provádí do vychlazeného 99% methanolu.

8.4.2 Analýza syntézy DNA

V případě, že jsou buňky vystaveny účinkům média obsahujícího BrdU, dochází k interkalaci tohoto pyrimidinového analogu do nově vznikající DNA u proliferujících buněk v místě deoxynukleosidu thymidinu. Míra BrdU, které se navázalo na jadernou DNA je přímo úměrná množství buněk syntetizujících DNA, tedy nacházejících se v S fázi buněčného cyklu. Takto označená DNA je následně denaturována fixací do ethanolu a detekována díky použité fluorescenční protilátce, která se na BrdU váže. Aby byl zaručen co nejlepší výsledek, pro analýzu bylo použito nejméně 1×10^6 buněk.

Pro analýzu syntézy DNA byly buňky vysazeny do šestijamkových panelů v koncentraci 3×10^5 buněk/1 ml a byly ponechány přilnout na dno jamky. Následně byly inkubovány po dobu 24 hodin s BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$ v inkubátoru při teplotě $37^\circ C$. Před ukončením inkubační doby byly buňky značeny roztokem BrdU po dobu 30 minut. Následně byly buňky sesbírány a převedeny do cytometrických zkumavek, ve kterých byly centrifugovány při $4^\circ C$ a 500 g, po dobu 5 minut. Po promytí roztokem PBS byly vzorky zafixovány v ledově vychlazeném 70% ethanolu a uschovány při $-20^\circ C$ do druhého dne.

Po vytažení z mrazáku byly buňky centrifugovány po dobu 5 minut, 500 g při laboratorní teplotě. Následně byl přidán roztok HCl/Triton X-100 a suspenze buněk byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly dále propláchnuty boraxem o koncentraci 0,1 M, centrifugovány a promyty roztokem PBS-T. K peletám buněk poté byla přidána zředěná primární látka (viz seznam protilátek) anti-BrdU a směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Vzorky byly následně opět promyty roztokem PBS-T a následoval přídavek sekundární protilátky Anti-Mouse-IgG-FITC a opětovná 30 minutová inkubace. K peletám byla po promytí PBS-T přidána ribonukleáza A o koncentraci 10 mg/ml a vzorky byly ponechány ve vytemperované vodní lázni na $37^\circ C$ po dobu 15 minut. Poté byl na dalších 15 minut přidán roztok PI.

Vzorky byly inkubovány 30 minut při $4^\circ C$ a poté analyzovány na průtokovém cytometru FACS Calibur s použitím argonového laseru. Výsledné grafy byly následně zpracovány v programu Microsoft Excel.

8.4.3 Analýza syntézy RNA

Analýza RNA syntézy využívá fosforylaci a následné zabudování 5-bromuridinu (BrU) do nově vznikající RNA. Inkorporované BrU je detekováno pomocí fluorescenční protilátky a jeho množství je pak přímo úměrné nově vznikající RNA. Pro nejlepší výsledek bylo na analýzu použito nejméně 1×10^6 buněk.

Buňky byly vysazeny do šestijamkových panelů v denzitě 3×10^5 buněk/1 ml a byly ponechány přilnout na dno jamky. Následovalo 24 hodinové ošetření BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$ v inkubátoru při teplotě $37^\circ C$. Buňky byly 30 minut před ukončením inkubace značeny roztokem BrU. Následně byly buňky sesbírány, převedeny do cytometrických zkumavek a centrifugovány při $4^\circ C$, 500 g po dobu 5 minut. Po promytí roztokem PBS byly vzorky zafixovány v 1% roztoku formaldehydu s 0,05% přídavkem NP-40, 15 minut promíchávány na rotátoru a následně uchovány 24 hodin při $4^\circ C$ v lednici.

Zafixované buňky byly centrifugovány při $4^\circ C$, 500 g, 5 minut a promyty roztokem PBS s 1% přídavkem glycinu. Následně byly 45 minut inkubovány při laboratorní teplotě s primární protilátkou, anti-BrdU-FITC a opět promyty, tentokrát roztokem PBS s 0,1% NP-40 +0,1% BSA. Po odsání supernatantu byla přidána sekundární protilátka, anti-mouse-IgG-FITC a směs byla inkubována při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 minut. Dalším krokem bylo promytí roztokem PBS s NP-40 a BSA. K peletě buněk byl poté po kapkách přidán fixační roztok (PBS s 1% formaldehydu a 0,05% NP-40) a celá směs byla ponechána při $4^\circ C$ v lednici po dobu 1 hodiny.

Zafixované vzorky se poté centrifugovaly, supernatant byl odsán a k buňkám byla přidána ribonukleáza A a po 15 minutách inkubace i PI. Vzorky byly poté inkubovány dalších 15 minut a následně byly měřeny na cytometru stejným postupem, jako při analýze RNA.

8.4.4 Detekce fosforylace histonu H3-P^{Ser10}

Fosforylace histonů úzce souvisí s kondenzací chromozomů, která probíhá v mitotické fázi buněčného cyklu; míra fosforylace histonu H3 tedy umožňuje detekci buněk, které se nacházejí v M fázi. Pro analýzu bylo použito 1×10^6 buněk.

Nasazené buňky o koncentraci 3×10^5 buněk/1 ml v šestijamkovém panelu byly ošetřeny BOH v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$, stejně jako v předchozích metodách. Následně byly buňky převedeny do cytometrických zkumavek, centrifugovány ($4^\circ C$, 500 g, 5 minut), promyty PBS a zafixovány v 70% ethanolu. Vzorky byly uchovány přes noc při $-20^\circ C$.

Následující den byly buňky promyty roztokem PBS s 1% přídavkem FBS a centrifugovány ($4^\circ C$, 500 g, 5 minut). V dalším kroku byl přidán vychlazený roztok 0,25% Tritonu X-100 v PBS a vzorky byly umístěny na led, kde byly 15 minut inkubovány. Buněčné suspenze byla poté opět promyta PBS s 1% FBS a následně byla hodinu při laboratorní teplotě inkubována s primární protilátkou, Anti-H3^{p^{Ser10}}-FITC. Vzorky byly poté promyty PBS s 1% FBS a inkubovány se sekundární protilátkou, Alexa Fluor 488 goat anti-

rabbit IgG po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po promytí vzorků (PBS + 1% FBS) byl přidán PI a všechny zkuševky s buňkami byly inkubovány ve tmě při 37°C po dobu 30 minut. Vzorky byly následně analyzovány na průtokovém cytometru za použití softwaru CellQuest.

8.4.5 Analýza buněčného cyklu

Pomocí inkorporace fluorescenčního barviva propidium jodidu do dvoušroubovice DNA byly určeny jednotlivé fáze buněčného cyklu. V závislosti na množství syntetizované DNA se tak mohou jednotlivé části cyklu semikvantitativně stanovit. Zároveň s inkorporací PI do DNA byl při analýze použit i citrátový pufr ke stanovení subdiploidní populace subG0, která je typická pro probíhající apoptózu. Pro analýzu buněčného cyklu bylo opět použito nejméně 1×10^6 buněk.

Buňky o denzitě 3×10^5 buněk/1 ml v šestijamkovém panelu byly podrobeny ovlivnění BOH v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$. Po 24 hodinách byly sesbírány do cytometrických zkuševek, centrifugovány (4°C, 500 g, 5 minut), promyty PBS a zafixovány v 70% ethanolu. Vzorky byly uchovány před noc při -20°C.

Následujícího dne byly vzorky centrifugovány (5 minut, 500g), promyty PBS a peleta buněk byla rozsuspendována v citrátovém pufru. Po centrifugaci (5 minut, 500 g) byl přidán PI a vzorek byl vortexován při maximální rychlosti. Následně byl inkubován 15 minut ve vodní lázni vytemperované na 37°C. Posledním krokem bylo přidání ribonukleázy A a inkubace na dalších 15 minut za stejných teplotních podmínek. Před měřením byly vzorky uchovány nejméně 1 hodinu v lednici při 4°C.

Vzorky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru a zpracovány v programu CellQuest.

8.4.6 Analýza exprese glykoproteinu P

Glykoprotein P je ATP-dependentní membránový transportér zodpovědný za přenos xenobiotik přes buněčnou membránu. Jeho zvýšená exprese je ve většině případů spojována se získanou MDR. Díky analýze exprese tohoto proteinu lze vyhodnotit, zda je buněčná rezistence způsobena právě nadměrnou produkcí tohoto proteinu, nebo zda se jedná o jiný mechanismus, který může být následně dalšími analýzami blíže specifikován. U zjišťování exprese Pgp se provádí izotypová kontrola, která slouží jako ověření nespecifické vazby protilátky.

Pro analýzu buněčného cyklu bylo použito nejméně 2×10^6 buněk. Analýza byla provedena pomocí metody průtokové cytometrie a probíhala ve třech opakováních pro obě rezistentní buněčné linie. Jako kontrola byly použity nerezistentní linie.

Buňky zafixované v methanolu byly centrifugovány (5 min, 500 g) a poté propláchnuty RB. Následně byl přidán permeabilizační roztok, směs byla inkubována 10 minut a poté byla opět centrifugována a propláchnuta RB. Dalším krokem byl přídavek saturačního reagentu pro receptory FC. Po desetiminutové inkubaci byl vzorek opět centrifugován a promyt. V následujícím kroku byly suspenze buněk rozděleny do dvou setů, přičemž jeden set sloužil jako negativní izotypová kontrola a do druhého byla přidána primární protilátka (PgP Mouse). Oba sety byly dále inkubovány 30 minut ve tmě a následně centrifugovány a propláchnuty. Do všech vzorků byla poté přidána sekundární protilátka (Mouse FITC). Po třicetiminutové inkubaci byly vzorky centrifugovány, propláchnuty a rozsuspendovány v blokačním činidlu. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 4°C a ihned analyzovány na průtokovém cytometru a zpracovány v programu Cell Quest.

9. VÝSLEDKY

9.1 Stanovení IC_{50} pro nerezistentní a rezistentní buněčné linie pomocí MTS

K určení proliferace při působení Boheminu (BOH) a pro určení jeho hodnoty IC_{50} pro nerezistentní (nerezistentní) buňky HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/-, byl proveden antiproliferační test MTS. Na základě jeho výsledků byly poté stanoveny koncentrace BOH, jejichž násobky byly žádané při získávání rezistentních klonů. Buněčné linie byly ošetřeny BOH po dobu 24 hodin, poté ihned následoval MTS test a vyhodnocení IC_{50} . Po ukončení jejich dlouhodobého ovlivňování BOH byla měřena IC_{50} i u rezistentních klonů buněk. U klonů HCT 116 parental byl pozorován výrazný nárůst IC_{50} , u klonů HCT 116 p53 -/- nebyl nárůst žádný.

Pro následující analýzy na průtokovém cytometru se používaly násobky hodnot IC_{50} pro jednotlivé nerezistentní linie.

Údaje uvedené v tabulce 3, včetně jejich směrodatné odchylky, jsou průměrem ze tří na sobě nezávislých opakování.

Tab. 3 Hodnoty IC_{50} pro nerezistentní a rezistentní linie HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/- získané během MTS testu

HCT 116 parental		HCT 116 p53 -/-	
$IC_{50} \pm SD$ ($\mu\text{mol/l}$)		$IC_{50} \pm SD$ ($\mu\text{mol/l}$)	
Nerezistentní linie	16,89 \pm 0,58	Nerezistentní linie	26,89 \pm 2,47
Rezistentní linie	47,68 \pm 3,88	Rezistentní linie	26,94 \pm 2,36

9.2 Analýza syntézy DNA

Nerezistentní buňky byly tímto cytostatikem ošetřeny v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$. Výsledky ukazují, že během 24 hodin inkubace míra syntézy DNA u těchto buněk ošetřených BOH o koncentraci $3 \times IC_{50}$ vykazují mnohem menší míru schopnosti syntézy DNA, než buňky ošetřené koncentrací pouze $1 \times IC_{50}$. Rezistentní klony, oproti tomu, nevykazují žádnou signifikantní změnu.

Údaje uvedené v tabulce 4, včetně jejich směrodatné odchylky, jsou aritmetickým průměrem ze tří na sobě nezávislých opakování.

Tab. 4 Hodnoty syntézy DNA (%) pro buněčné linie HCT 116 parental a HCT p53 -/- po ovlivnění BOH. Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze tří nezávislých opakování.

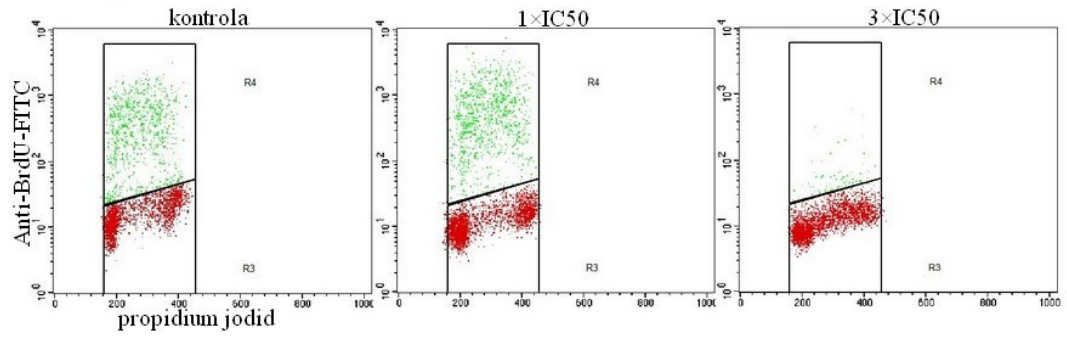
HCT 116 parental	Kontrola \pm SD	$1 \times IC_{50} \pm$ SD	$3 \times IC_{50} \pm$ SD
Nerezistentní linie	29,3 \pm 1,8	28,3 \pm 1,7	2,6 \pm 0,1
Rezistentní linie	22,6 \pm 0,3	19,6 \pm 1,0	17,8 \pm 1,6

HCT 116 p53 -/-	Kontrola \pm SD	$1 \times IC_{50} \pm$ SD	$3 \times IC_{50} \pm$ SD
Nerezistentní linie	35,2 \pm 0,9	34,4 \pm 0,8	5,9 \pm 1,7
Rezistentní linie	24,5 \pm 0,7	25,3 \pm 0,8	21,6 \pm 2,0

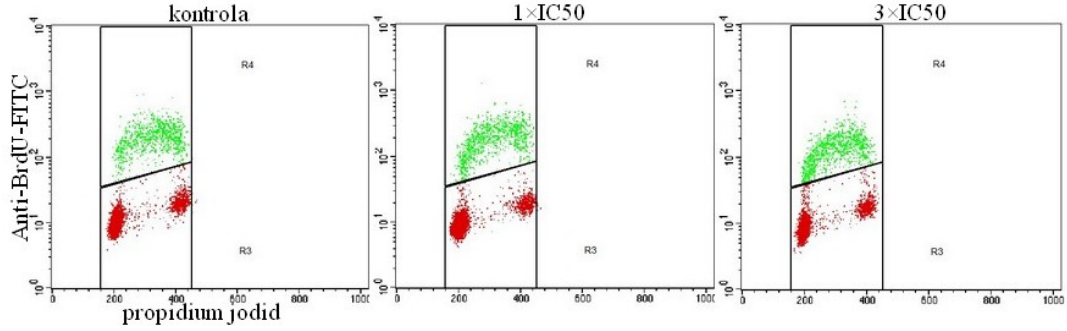
Histogramy analýzy DNA ukazují inhibici syntézy DNA po ovlivnění BOH v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$.

Uvedené histogramy v obrázku 11 jsou vždy reprezentativními příklady z 3 opakování.

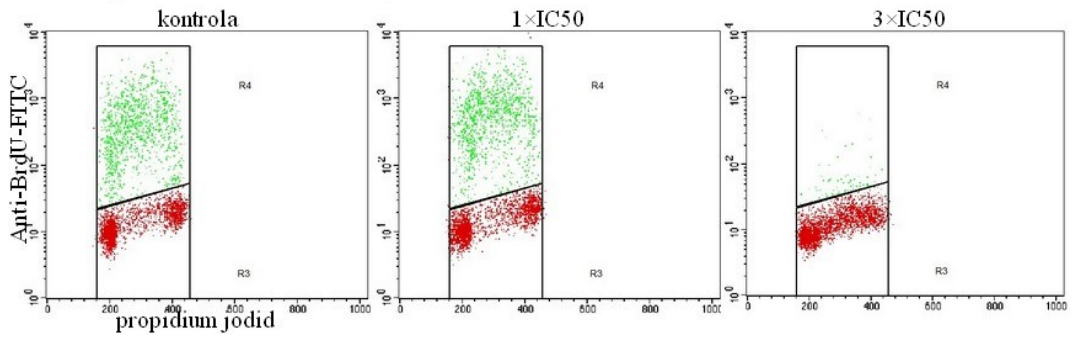
HCT 116 parental nezizistentní klony



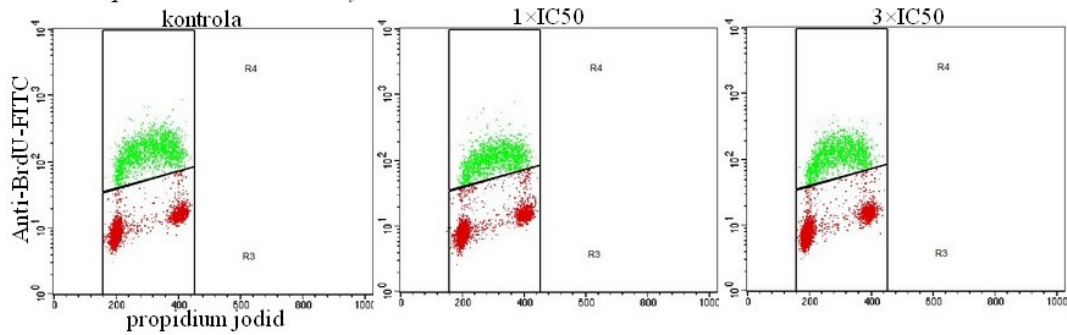
HCT 116 parental rezizistentní klony



HCT 116 p53 -/- nezizistentní klony



HCT 116 p53 -/- rezizistentní klony



Obr. 11 Histogramy znázorňující změny v syntéze DNA po ovlivnění BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$

9.3 Analýza syntézy RNA

Nerezistentní buněčné linie byly ošetřeny BOH v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$. Po 24 hodinách inkubace buňky ovlivněné BOH v koncentraci $3 \times IC_{50}$ vykazovaly signifikantně zvýšenou míru inhibice syntézy RNA. Rezistentní klony také vykazovaly po ovlivnění BOH zvýšenou inhibici syntézy RNA, ovšem ne tak velkou, jako klony nerezistentní.

Údaje uvedené v tabulce 5, včetně směrodatné odchylky, jsou aritmetickým průměrem ze tří na sobě nezávislých opakování.

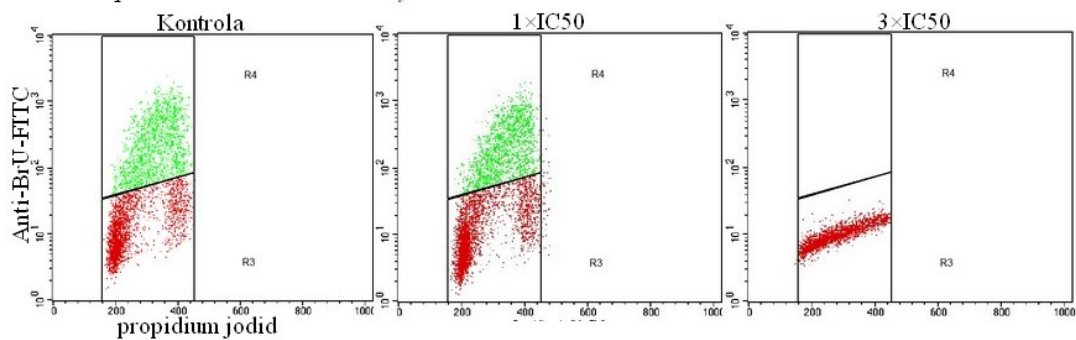
Tab. 5 Hodnoty syntézy RNA (%) pro buněčné linie HCT 116 parental a HCT p53 -/- po ovlivnění BOH. Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze tří nezávislých opakování.

HCT 116 parental	Kontrola \pm SD	$1 \times IC_{50} \pm$ SD	$3 \times IC_{50} \pm$ SD
Nerezistentní linie	36,5 \pm 1,4	34,6 \pm 3,0	0,6 \pm 0,1
Rezistentní linie	33,1 \pm 0,2	34,7 \pm 2,9	21,2 \pm 3,0

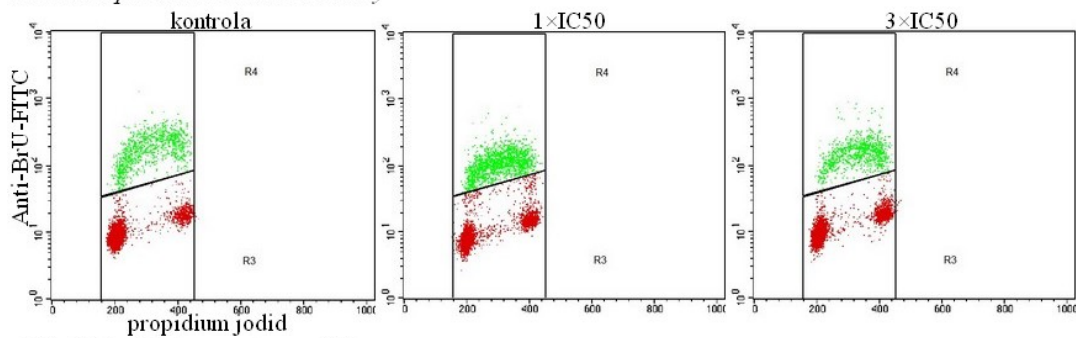
HCT 116 p53 -/-	Kontrola \pm SD	$1 \times IC_{50} \pm$ SD	$3 \times IC_{50} \pm$ SD
Nerezistentní linie	42,6 \pm 2,7	41,1 \pm 3,2	0,3 \pm 0,1
Rezistentní linie	41,2 \pm 1,1	40,2 \pm 2,1	28,3 \pm 3,2

Histogramy analýzy RNA ukazují inhibici syntézy RNA po ošetření BOH v koncentracích $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$. Uvedené histogramy v obrázku 12 jsou vždy reprezentativními příklady z 3 opakování.

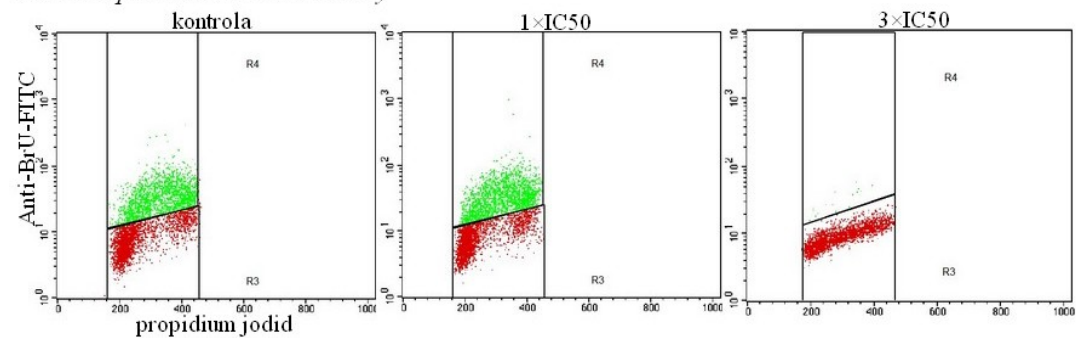
HCT 116 parental nerezistentní klony



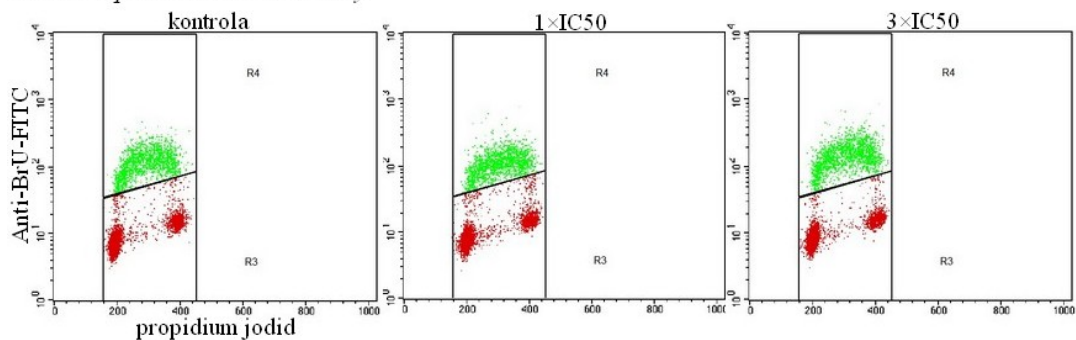
HCT 116 parental rezistentní klony



HCT 116 p53 -/- nerezistentní klony



HCT 116 p53 -/- rezistentní klony



Obr. 12 Histogramy znázorňující změny v syntéze RNA po ovlivnění BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$

9.4 Analýza buněčného cyklu a apoptózy

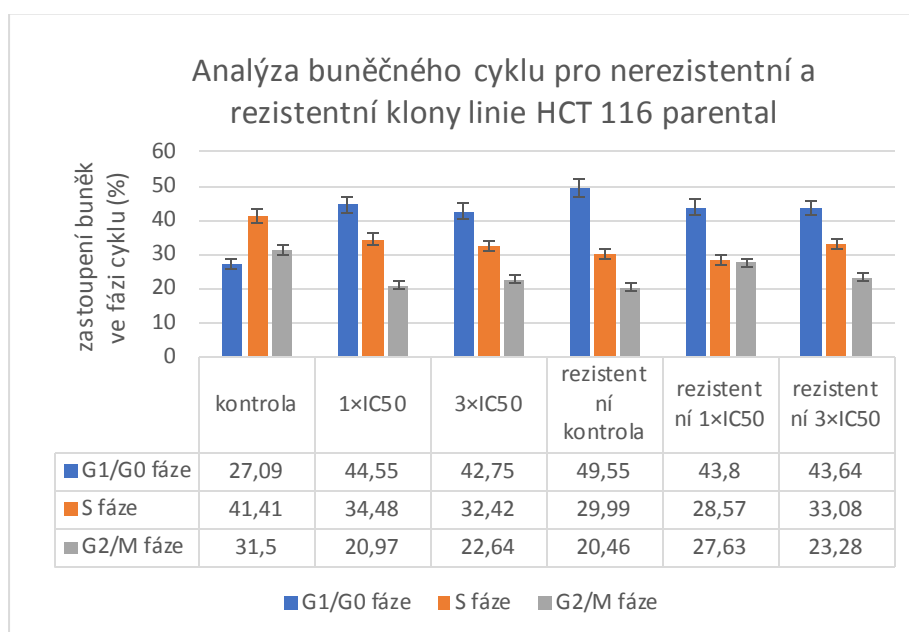
Díky analýze buněčného cyklu je možné určit změny v jednotlivých fázích cyklu a tak blíže identifikovat mechanismus účinku BOH na buněčnou linii HCT 116.

Analýza buněčného cyklu probíhala ve třech opakováních a naměřená data, včetně směrodatných odchylek, jsou shrnuta v grafech 1 a 2.

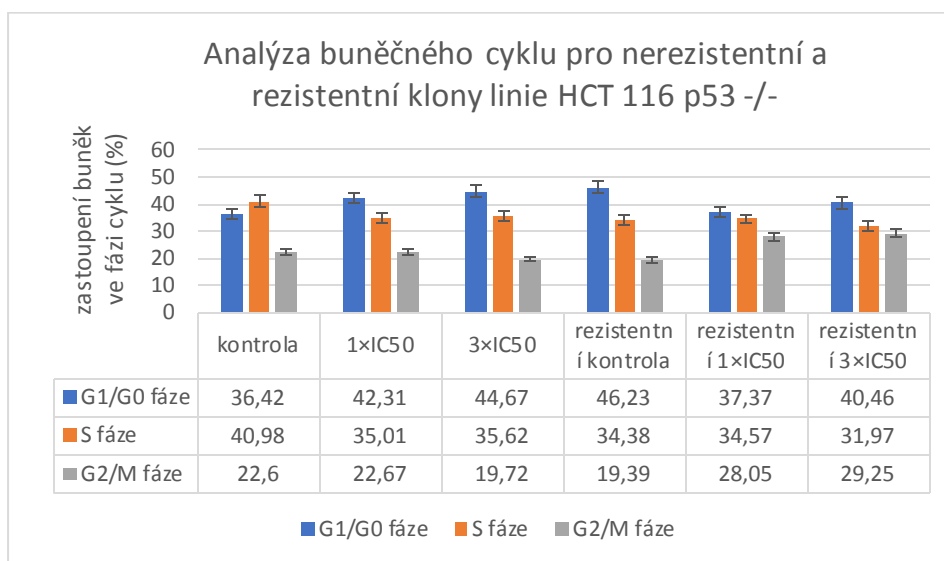
V porovnání s kontrolním vzorkem, který nebyl ovlivněn, se u nerezistentních linií HCT 116 parental po 24 hodinovém ošetření BOH snížil počet buněk v G2/M i S fázi a došlo naopak k výrazné kumulaci buněk vyskytujících se v G0/G1 fázi cyklu. Rezistentní klony oproti tomu nevykazovaly tak velké změny, po ošetření se pouze nepatrně snížil počet buněk v G1/G0 fázi a došlo naopak k nárůstu buněk vstupujících do mitózy.

Buněčná linie HCT 116 p53 -/- po ovlivnění BOH vykazovala podobné změny – opět narostl počet buněk zadržovaných v G0/G1 fázi a snížil se počet buněk v G2/M a S fázích, ovšem ne tak markantně, jako u linie HCT 116 parental. Oproti nerezistentní linii, S fáze u rezistentních klonů zůstala téměř beze změny a výrazná změna nastala pouze u fází G2/M, kdy došlo k nárůstu, a G0/G1, kdy došlo naopak k poklesu počtu buněk.

Graf 1: Procentuální zastoupení jednotlivých fází v buněčném cyklu pro nerezistentní a rezistentní linie HCT 116 parental Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze třínezávislých opakování.



Graf 2: Procentuální zastoupení jednotlivých fází v buněčném cyklu pro nerezistentní a rezistentní linie HCT 116 p53 -/- Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze tří nezávislých opakování.



Společně s vyhodnocením buněčného cyklu bylo také vyhodnoceno zastoupení populace subG1, která je typická pro buňky nacházející se v apoptotické fázi.

Pro nerezistentní buňky je znatelný nárůst apoptotických buněk již při ovlivnění koncentrací 1×IC₅₀, obzvláště u linie p53 -/-, kde byl nárůst téměř trojnásobný. Koncentrace BOH 3×IC₅₀ pak u obou linií zapříčinila nárůst apoptotických buněk téměř desetinásobně, oproti kontrolnímu vzorku. Rezistentní linie vykazovaly také nárůst apoptotických buněk, rozdíl zde však nebyl tak markantní jako u buněk, které nebyly vůči BOH rezistentní.

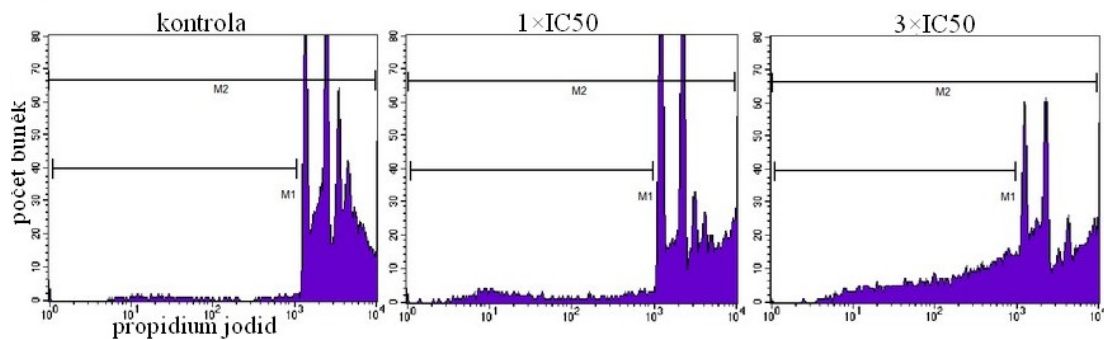
Měření probíhalo vždy ve třech opakováních a analyzovaná data jsou zaznamenána v tabulce 6. Histogramy na obrázku 13 vyobrazují reprezentativní příklady ze 3 nezávislých opakování.

Tab. 6 Analýza apoptotických buněk (%) pro buněčné linie HCT 116 parental a HCT p53 -/- po ovlivnění BOH. Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze tří opakování.

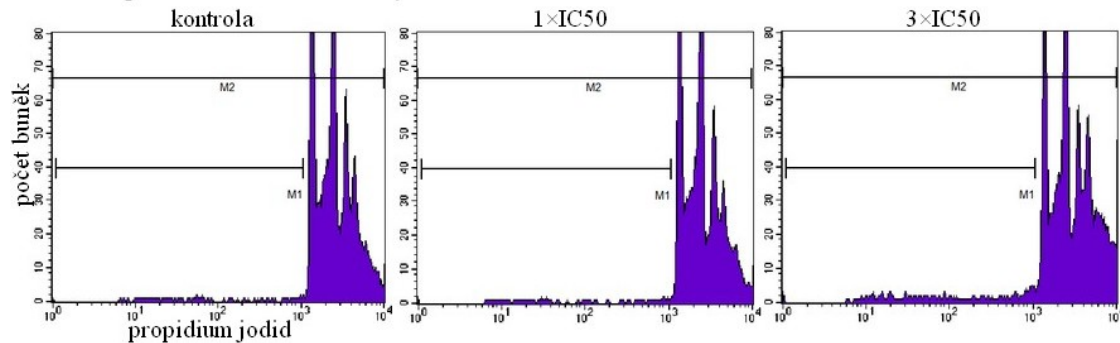
HCT 116 parental	Kontrola ±SD	1×IC ₅₀ ± SD	3×IC ₅₀ ± SD
Nerezistentní linie	4,1 ± 0,2	6,7 ± 0,5	38,1 ± 0,3
Rezistentní linie	4,2 ± 0,2	5,2 ± 0,7	9,0 ± 0,2

HCT 116 p53 -/-	Kontrola ± SD	1×IC ₅₀ ± SD	3×IC ₅₀ ± 0,6
Nerezistentní linie	3,5 ± 0,1	10,3 ± 0,6	36,6 ± 1,6
Rezistentní linie	9,5 ± 0,4	10,6 ± 0,5	10,3 ± 0,6

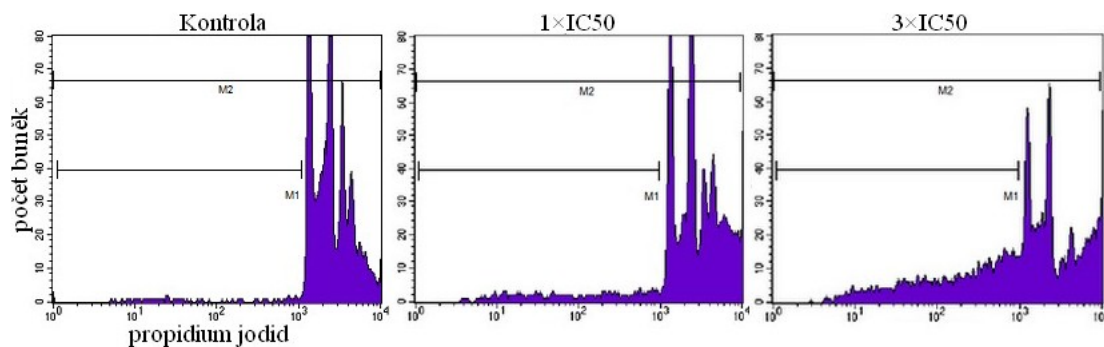
HCT 116 parental nerezistentní klony



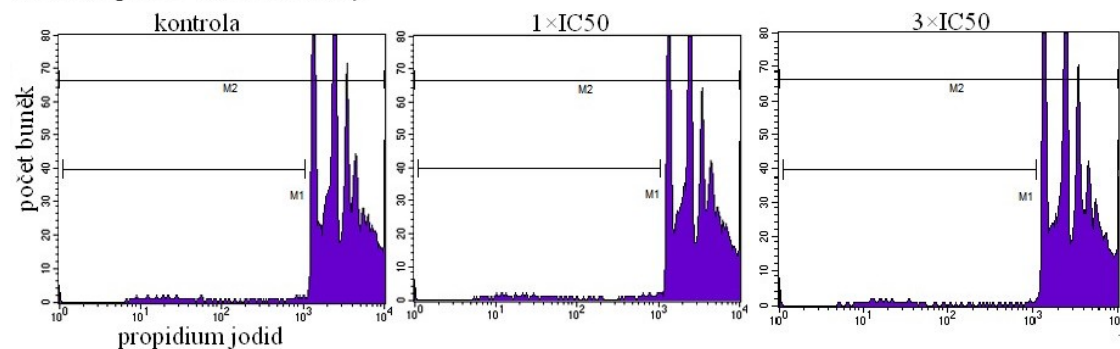
HCT 116 parental rezistentní klony



HCT 116 p53 -/- nerezistentní klony



HCT 116 p53 -/- rezistentní klony



Obr. 13 Histogramy znázorňující indukci apoptózy u nerezistentních a rezistentních buněčných populací

9.5 Fosforylace histonu H3

Fosforylace histonu H3 v místě aminokyseliny Ser10 představuje marker mitózy a pomocí detekce míry fosforylace, je možné určit změny ve fázi G2/M fázi, tedy ve fázi, kdy buňka vstupuje do mitózy.

Jak u nerezistentních, tak u rezistentních populací linie HCT 116 parental, docházelo se zvyšující se koncentrací BOH k zamezování fosforylace Histonu H3. U rezistentních klonů byla navíc fosforylace již u kontrolních vzorků třikrát menší, než u klonů, které ošetřeny BOH nikdy nebyly.

Nerezistentní linie HCT 116 p53 -/- měly fosforylaci histonu po ošetření BOH také utlumenou, ovšem klony rezistentní vykazovaly zajímavý obrat a fosforylace u nich byla naopak podpořena.

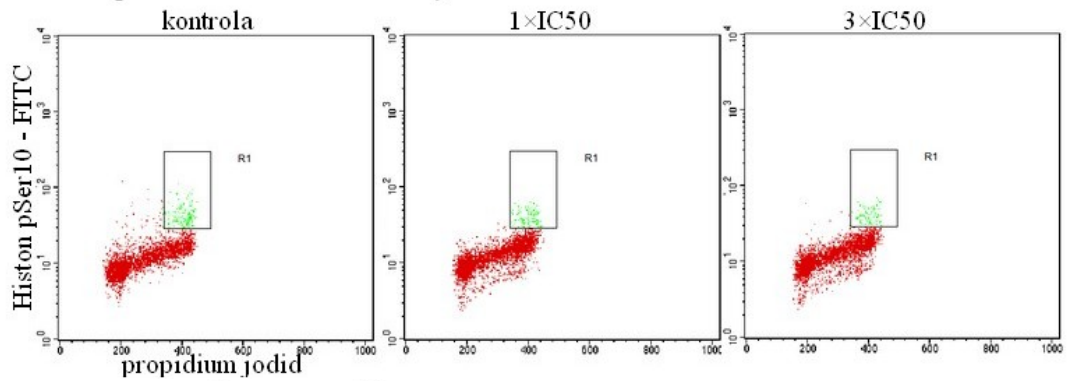
Měření probíhalo vždy ve třech opakováních a analyzovaná data jsou zaznamenaná v tabulce 7. Následující histogramy na obrázku 14 vyobrazují reprezentativní vzorky.

Tab. 7 Analýza fosforylace histonu H3 (%) pro buněčné linie HCT 116 parental a HCT p53 -/- po ovlivnění BOH. Uvedené hodnoty včetně SD jsou průměrem ze tří opakování.

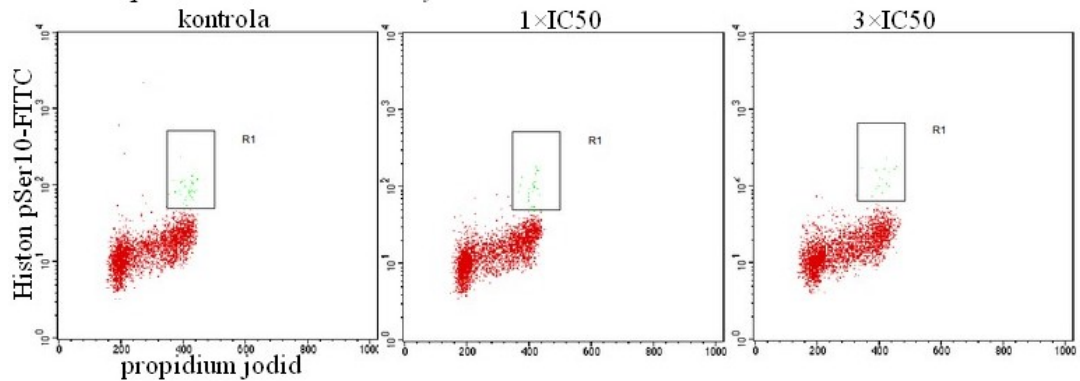
HCT 116 parental	Kontrola \pm SD	1 \times IC ₅₀ \pm SD	3 \times IC ₅₀ \pm SD
Nerezistentní linie	3,6 \pm 0,1	2,1 \pm 0,7	2,2 \pm 0,3
Rezistentní linie	0,8 \pm 0,4	1,0 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2

HCT 116 p53 -/-	Kontrola \pm SD	1 \times IC ₅₀ \pm SD	3 \times IC ₅₀ \pm SD
Nerezistentní linie	3,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1
Rezistentní linie	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0	1,2 \pm 0,1

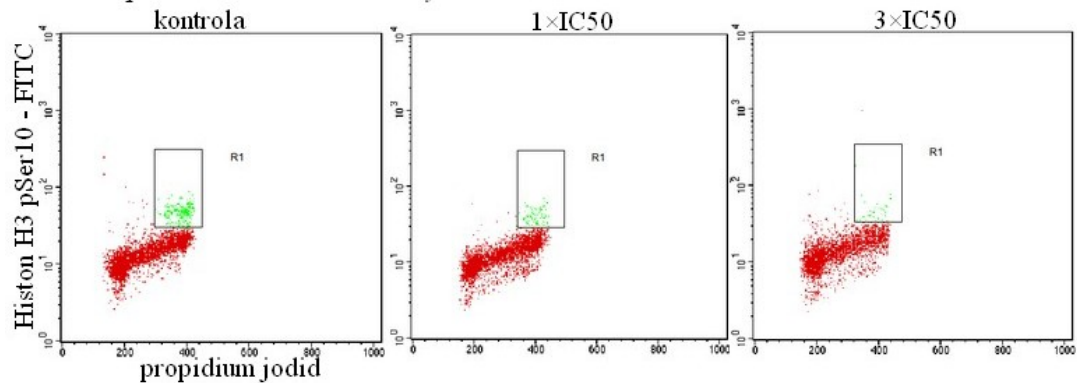
HCT 116 parental nerezistentní klony



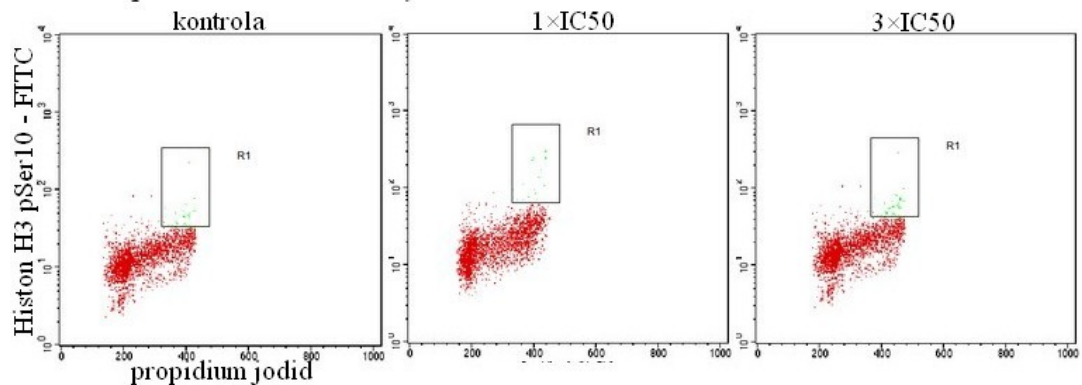
HCT 116 parental rezistentní klony



HCT 116 p53 -/- nerezistentní klony



HCT 116 p53 -/- rezistentní klony

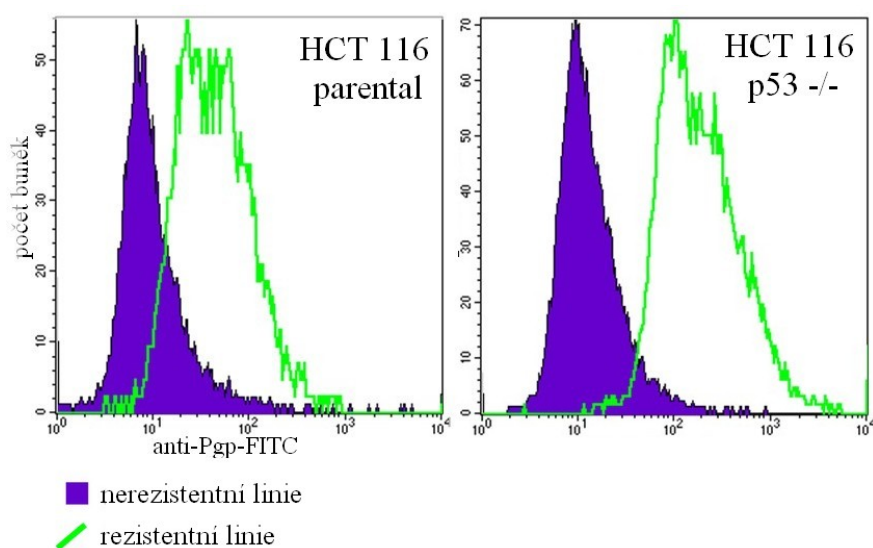


Obr.14 Histogramy znázorňující změny ve fosforylaci histonu po ovlivnění BOH v koncentracích 1×IC₅₀ a 3×IC₅₀

9.6 Analýza exprese glykoproteinu Pgp

Analýza exprese Pgp se prováděla na rezistentních a nerezistentních buňkách, tentokrát bez ovlivnění BOH. Na histogramu je zaznamenána změna fluorescence, indikující nárůst exprese Pgp u obou buněčných linií.

Měření probíhalo ve třech nezávislých opakováních a společně s nimi se měřil i kontrolní vzorek s izotypovou kontrolou. Hodnoty naměřených mediánů jsou zaznamenány v tabulce 8. Histogramy na obrázku 15 vyobrazují reprezentativní příklady kontrolního vzorku a příslušného vzorku rezistentní linie



Obr. 15 Histogramy znázorňující změnu fluorescence indikující nárůst exprese glykoproteinu

Tab. 8 Analýza exprese glykoproteinu P pro nerezistentní a rezistentní buněčné linie HCT 116 parental a HCT p53 -/- Uvedené hodnoty mediánu byly naměřeny na reprezentativním vzorku.

HCT 116 parental	Medián	HCT 116 p53 -/-	Medián
Nerezistentní linie	0,94	Nerezistentní linie	1,24
Rezistentní linie	31,47	Rezistentní linie	126,38

10.DISKUZE

Tato práce se zabývá studiem a porovnáním vlastností rezistentních a nerezistentních buněčných linií odvozených od kolorektálního karcinomu HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/-. Pro účely práce byl použit syntetický inhibitor Cdk Bohemin (BOH), poskytnutý LEM ÚMTM. Použité linie vykazují k BOH poměrně vysokou chemosenzitivitu, a proto byly vybrány jako vhodné modely ke studiu rozdílů mezi rezistentními a nerezistentními klony.

Hlavním cílem práce byla příprava stabilních rezistentních klonů, které byly schopné růst a dělit se v koncentracích BOH přesahujících trojnásobek jejich IC_{50} pro BOH. Dalším cílem byla charakterizace této linie pomocí metody průtokové cytometrie (konkrétně analýza syntézy nukleových kyselin, analýza buněčného cyklu spolu s identifikací subpopulace subG1, měření fosforylace histonu H3 a exprese glykoproteinu P) a následné porovnání vlastností rezistentních klonů s vlastnostmi původní populace.

Kultivace rezistentních klonů probíhala dvěma způsoby založenými buď na postupném zvyšování koncentrace, nebo na experimentálním stanovení optimální koncentrace vhodné pro růst rezistentních klonů. Po optimalizaci postupu byla metoda experimentálního stanovení koncentrace určena jako vhodnější způsob kultivace rezistentních klonů z důvodu efektivnějšího nárůstu buněk po ošetření BOH. Roztok BOH v DMSO byl připravován čerstvý před každým ošetřením buněk, z důvodu nestability BOH v roztoku.

Analýza na průtokovém cytometru ukázala změny na buněčném cyklu po krátkodobém působení BOH na nerezistentních i na rezistentních klonech. U buněčných linií HCT 116 parental i HCT 116 p53 -/- došlo po ošetření k úbytku buněk v G2/M a S fázi a naopak ke kumulaci buněk v G0/G1 fázi. Rezistentní klony obou linií reagovaly na ošetření naopak snížením počtu buněk v G0/G1 a došlo u nich k nárůstu buněk vstupujících do G2/M fáze. Fáze S zůstala prakticky beze změny.

Společně s buněčným cyklem bylo detekováno zastoupení apoptotických subpopulací subG1. Procentuální množství apoptotických buněk se lišilo v závislosti na použité koncentraci ($1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$). U nerezistentních linií HCT 116 parental i HCT 116 p53 -/- byl nárůst po ovlivnění BOH v koncentraci $1 \times IC_{50}$ pouze nepatrný. Při ošetření o koncentraci $3 \times IC_{50}$ však došlo u linie parental k nárůstu apoptotických buněk o 34 % a u linie p53 -/- byl nárůst 33 %. Rezistentní klony po ošetření také vykazovaly zvýšení počtu apoptotických buněk, to bylo ovšem výrazně menší než u nerezistentních buněk – linie HCT

116 p53 -/- po ovlivnění BOH o koncentraci $1 \times IC_{50}$ vykazaly nárůst apoptotických buněk o 1 % a rezistentní klony linie HCT 116 parental o cca 5 %.

Analýza nukleových kyselin prokázala, že jak u DNA, tak u RNA dochází k inhibici jejich syntézy po ošetření BOH. I zde sehrála velkou roli koncentrace. Při ovlivnění koncentrací $1 \times IC_{50}$ nebyly změny v syntéze příliš výrazné, ale při jejím trojnásobku klesla míra syntézy DNA a RNA u obou linií pod 5 % – u nerezistentní buněčné populace HCT 116 parental došlo k inhibici syntézy DNA o více než 26 %, u syntézy RNA dokonce více než o 35 % a nerezistentní linie HCT 116 p53 -/- zaznamenala sníženou syntézu DNA o 30 % a syntézu RNA dokonce o 42 %. Rezistentní linie také zaznamenaly pokles syntézy nukleových kyselin, byl ovšem výrazně menší než u linií nerezistentních. Tyto výsledky byly shodné s měřeními při analýze buněčného cyklu, kdy docházelo ke kumulaci buněk ve fázi G1 a naopak ke snížení počtu buněk přítomných v syntetické fázi cyklu.

Fosforylace histonu H3 u nerezistentní buněčné linie HCT 116 parental byla po ošetření BOH utlumena a ten samý fenomén byl pozorovaný i u jejích rezistentních klonů. Nerezistentní linie HCT 116 p53 -/- také vykazovala pokles fosforylace, ovšem u rezistentních klonů fosforylace naopak narůstala.

Expresse glykoproteinu P byla pozorována u nerezistentních i rezistentních klonů. U obou rezistentních linií byl pozorován nárůst míry fluorescence, který indikoval zvýšení exprese glykoproteinu P. To napovídá, že za vznik rezistence je pravděpodobně částečně odpovědná zvýšená produkce tohoto membránového transportéru. Pro specifikaci mechanismů rezistence je nutné provést další experimenty, které by dokázaly konkretizovat příčiny vzniku rezistentních populací.

U rezistentních klonů obou buněčných populací byla po ukončení ovlivňování BOH stanovena IC_{50} pomocí MTS testu tato a hodnota byla srovnána s IC_{50} původních, nerezistentních klonů. U linie HCT 116 parental došlo k téměř trojnásobnému nárůstu IC_{50} , zatímco u linie HCT 116 p53 -/- nedošlo k žádné změně. Tato anomálie mohla být způsobena vznikem Bohemin-dependentní linie, která pro svoje dělení vyžaduje přítomnost BOH, který byl při MTS testu vysazen, čímž byl indukován buněčný stres, který buňky směřoval k apoptóze.

Na základě naměřených výsledků je možné usuzovat, že mechanismus vlivu BOH koreluje s hypotézou, že se tento inhibitor váže do aktivního místa v kontrolním bodě G1/S, a zde buněčný cyklus zastavuje (31). Tuto myšlenku podporují korelace mezi sníženou akumulací buněk v S fázi, a naopak zvýšenou hodnotou buněk zadržovaných v G1 fázi, stejně jako inhibice syntézy nukleových kyselin.

11. ZÁVĚR

Bakalářská práce se věnuje charakterizaci vlastností buněčných linií HCT 116 parental a HCT 116 p53 -/- odvozených od kolorektálního karcinomu, které jsou rezistentní na vybraný syntetický inhibitor Cdk, Bohemin. Pro charakterizaci bylo využito stanovení jeho střední inhibiční koncentrace pomocí MTS testu a vlastnosti nerezistentních a rezistentních byly analyzovány pomocí metody průtokové cytometrie. Hodnoty uvedené v bakalářské práci jsou průměrem 3 na sobě nezávislých měření, z nichž byla vypočítána střední hodnota a směrodatná odchylka.

Během výzkumu byly provedeny série experimentů, které charakterizovaly vlastnosti buněčného cyklu. Z výsledků experimentů vyplývá, že inhibitor Cdk Bohemin působí u nerezistentních klonů na buněčný cyklus v místě kontrolního bodu G1/S, kde se váže do aktivního místa v komplexu cyklin/Cdk. Tak zabraňuje jeho fosforylaci a zastavuje celý buněčný cyklus, včetně inhibice syntézy nukleových kyselin, čímž nepřímo směřuje buňku k apoptóze.

Rezistentní linie vykazovaly rozdílné vlastnosti než linie nerezistentní, především v zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a množství apoptotických buněk. Nezanedbatelná je také změna v syntézách nukleových kyselin, kdy i přes ovlivnění Boheminem docházelo stále k jejich produkci. Důležitou součástí je také analýza exprese membránového transportéru glykoproteinu P, jehož zvýšená exprese indikuje jeho možnou účast na vzniku lékové rezistence.

Cíle bakalářské práce byly splněny.

12.CITOVANÁ LITERATURA

1. Causes of death statistics. *Statistics Explained*. [Online] Eurostat, 2016. [Citace: 7. Březen 2017.] http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_ ISSN 2443-8219.
2. Národní onkologický program. *Česká onkologie v číslech: stručné shrnutí*. [Online] 8. 10 2014. [Citace: 6. 2 2017.] <http://www.onconet.cz/index.php?pg=aktuality&aid=981>.
3. **Pavel, Klener.** *Základy klinické onkologie*. Praha : Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-755-4.
4. **A., Sudhakar.** History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer science and Therapy*. 2009, Sv. 1, 2, stránky 1-4.
5. **Veselý, J, Havlíček, L a Strnad, M.** Inhibition of cyclin-dependant kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry*. 1994, 224, stránky 771-786.
6. **Nosková, V. a Hajdúch, M.** Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie*. 2000, speciál 2, stránky 4-9.
7. **Raguz, S a Yagüe, E.** Resistance to chemotherapy: New treatments and novel insights into an old problem. *British Journal of Cancer*. 2008, Sv. 99, 387-391.
8. **Gerald, Karp.** *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. místo neznámé : John Wiley & Sons, Inc., 2003. ISBN 0-471-45119-3.
9. **Harvey, Lodish a Arnold, Berk.** *Molecular Cell Biology*. 4. místo neznámé : W.H.Freeman, 2000. ISBN 0-7167-3136-3.
10. **Alberts, B a Bray, D.** *Essential Cell Biology*. 3. místo neznámé : Garland Science, 2009. ISBN 9780815341291.
11. **Alberts, Bruce a Bray, Dennis.** *Základy buněčné biologie*. místo neznámé : Espero Publishing, 1998. 80-902906-2-0.
12. **Li, M a Zhou, X.** Study on the activity of the signaling pathways regulating hepatocytes from G0 phase into G1 phase during rat liver regeneration. *Cellular and molecular biology letters*. 2014, 19, stránky 181-200.
13. **Závodská, Radka.** *Biologie buněk*. Praha : Scientia, 2006. ISBN 80-86960-15-3.
14. **Campbell, N a Reece, J.** *Biology, A Global Approach*. 10. London : Pearson Education Ltd., 2015. ISBN 1-292-00865-2.
15. **Alberts, Bruce a Bray, Dennis.** *Essential Cell Biology*. 2. místo neznámé : Garland Science, 2004. ISBN 0-8153-3481-8.

16. **Cooper, G.M. a Hausmann, R.E.** *The Cell: A molecular approach*. místo neznámé : ASM Press, 2006. ISBN-10: 0878932194.
17. **Malumbres, M a M., Barbacid.** Cell cycle kinases in cancer. *Current opinion in Genetics and Development*. 2007, 17, stránky 60-65.
18. **Malumbres, M a P., Pevarello.** CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007, Sv. 29, 1.
19. **S.R., Whittaker a A., Mallinger.** Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2017.
20. **Veselý, Jaroslav a Chmela, Zdeněk.** Regulace buněčného cyklu cyklin-dependantními kinázami. *Zpravodaj klinické farmakologie a farmacie*. 1998, 12 (1-2).
21. **Giacinti, C a Giordano, A.** RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006, 25, stránky 5220-5227.
22. **Nakayama, K a K, Nakayama.** Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays*. 12 1998, 20, stránky 1020-1029.
23. **Cánepa, E.T. a Scassa, M.E.** INK4 Proteins, a Family of Mammalian CDK Inhibitors with Novel Biological Functions. *IUBMB Life*. 7 2007, stránky 419-426.
24. **Sherr, Ch. J. a Roberts, J.M.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*. 7 1999, stránky 1501-1512.
25. **Besson, A a Dowdy, S.F.** CDK Inhibitors: Cell cycle regulators and Beyond. *Developmental Cell*. 2008, stránky 159-169.
26. **Strnad, M a J., Veselý.** Syntetické inhibitory cyklin-dependenčních kináz. *Zpravodaj klinické farmakologie a farmacie*. 1-2, 1998, 12, stránky 10-14.
27. **Kitagawa, M a Higashi, H.** A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene*. 1994, 9, stránky 2549-2557.
28. **Patel, V a Senderowicz, A.M.** Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998, 102, stránky 1674-1681.
29. **Hajduch, M a Skalnikova, H.** Cyclin-Dependent Kinase inhibitors and Cancer: Usefulness of Proteomic Approaches in Assessment of the Molecular Mechanisms and Efficacy of Novel Therapeutics. [autor knihy] J Van Dyk a M.J Dunn. *Clinical Proteomics: From diagnosis to therapy*. místo neznámé : Wiley-VCH, 2008.
30. **Holý, A.** *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2004. 80-244-0855-4.

31. **Stýskalová, L a Cwiertka, K.** Cytotoxická aktivita Boheminu in vitro na primárních nádorových buňkách. *Farmakologie v onkologii*. 2006, stránky 197-201.
32. Chemspider. [Online] www.chemspider.com.
33. **Mihál, V a M, Hajdúch.** Rezistence nádorových buněk na cytostatika a její výpovědní hodnota v léčbě dětské akutní leukemie. *Zpravodaj klinické farmakologie a farmacie*. 1995, 4, stránky 21-23.
34. **Hamilton, G a Rath, B.** A short update on cancer chemoresistance. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2014, 164, stránky 456-460.
35. **Adam, Z a Krejčí, M.** *Obecná onkologie*. místo neznámé : Galén, 2011. EAN 9788072627158.
36. **Clynes, M.** *Multiple Drug Resistance in Cancer: Cellular, Molecular and Clinical Approaches*. místo neznámé : Springer Science & Business Media, 2012. 9401108269.
37. **Kathawala, R.J a P, Gupta.** The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug resistance updates*. 2014.
38. **Locher, K.P.** Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004, stránky 426-431.
39. **Kunjachan, S a Rychlik, B.** Multidrug Resistance: Physiological Principles and Nanomedical Solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, stránky 1852-1865.
40. **Nosková, V a Hajdúch, M.** Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. *Klinická onkologie. speciál 2*, 2000, stránky 10-14.
41. **Scheper, R.J. a Broxterman, H. J.** Overexpression of a Mr 110,000 Vesicular Protein in Non-P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer research*. 1993, 53, stránky 1475-1479.
42. **Filipits, M.** Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 1, 2004, 2.
43. **Haupt, S.** Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science*. 2003, stránky 4077-4085.
44. **Reed, C.** Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 2008, stránky 3322–3330.
45. **Khan, K.H.** Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014, stránky 200–219.
46. **Bugg, B a Danks, M.** Expression of a mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, 88, stránky 7654-7658.

47. **Brown, M a Wittwer, C.** Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical chemistry*. 2000, stránky 1221-1229.

48. **Berridge, M.V. a Herts, P.M.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 7. říjen 2005, stránky 127-152.

49. **Malich, G a B., Markovic.** The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 21. únor 1997, 124, stránky 179-192.

13. PŘÍLOHA

Přípravy roztoků použitých při analýzách

1. **PBS** (fosfátový pufr): 8 g NaCl, 3,21 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , doplněno do 1 l deionizovanou H_2O
2. **70% ethanol**
3. **1% formaldehyd + 0,05% NP-40 v PBS**
4. **MTS**: 8,5 mM roztok MTS v PBS
5. **Citrátový pufr**: 0,5 M roztok $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v H_2O
6. **Roztok PI**
 - **PI 1** pro analýzu BrdU: 70 mM roztok v PBS
 - **PI 2** pro analýzu BrU: 7 mM roztok v PBS
 - **PI 3** pro analýzu fosforylace histonu: 14 mM roztok v PBS
7. **Roztok RNAzy A**: 0,7 mM roztok v PBS
8. **BrdU**: 1 mM roztok v RPMI 1640 médiu
9. **BrU**: 100 mM roztok BrU v RPMI 1640 médiu
10. **2 M HCl s 0,5% Triton X-100 v H_2O**
11. **0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$**
12. **PBS-T**: PBS + 0,5% Tween-100 + 0,1% BSA
13. **0,1% BSA + 0,1% NP-40 v PBS**
14. **1% roztok glycinu v PBS**
15. **1% FBS v PBS**
16. **Blokační činidlo**: 0,08 mM roztok BSA v Cell Wash
17. **Permeabilizační činidlo**: 10% roztok permeabilizačního činidla v deionizované vodě