

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



System FUCCI ako výkonný nástroj na identifikáciu fáz
bunkového cyklu

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: **Katarína Štočková**

Študijní program: B1501 Experimentálna biológia

Študijní obor: Experimentálna biológia

Forma štúdia: Prezenčná

Vedúci práce: **Mgr. Alžběta Srovnalová Ph.D**

Termín odovzdania práce: 2023

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Katarína Štočková
Názov práce	Systém FUCCI ako výkonný nástroj na identifikáciu fáz bunkového cyklu
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	Mgr. Alžběta Srovnalová, Ph.D
Rok obhajoby práce	2023
Jazyk	Slovenský

Abstrakt

Fluorescenčný indikátor bunkového cyklu založený na ubikvitinácii (systém FUCCI) je nástroj používaný na vizualizáciu fáz bunkového cyklu živých buniek v reálnom čase. Metóda je založená na koordinácii Cdt1, ktorého hladina vrcholí počas G₁ fázy a prudko klesá v S fáze, a jeho inhibítora geminín, ktorého hladina je vysoká počas G₂, vo fázy M klesá. Spojenie fluorescenčných proteínov s Cdt1 a geminínom umožňuje nepretržitú vizualizáciu buniek vo fázach G₁, S alebo G₂/M bunkového cyklu.

Cieľom tejto práce bolo vytvorenie nových transformovaných, reportérových bunkových línií, a to nádorovej bunkovej línie BJ a nádorovej bunkovej línie HCT-116, na základe lentivírusovej transdukcie. Na týchto líniách bolo testované pôsobenie protinádorových liečiv so známou aktivitou na jednotlivé fázy v bunkovom cykle. Testovanie liečiv bolo prevedené na polyklonálnych a následne monoklonálnych líniách buniek. Celkovo bolo testovaných sedem protinádorových látok pri dvoch rôznych koncentráciách. Vplyv liečiv na bunkový cyklus pri testovaných líniách bol vyhodnotený pomocou obrazovej analýzy, vďaka čomu bolo zistené percentuálne zastúpenie buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu.

Kľúčové slová	apoptóza, bunkový cyklus, cytostatiká, kontrolné body, transdukcia
Počet strán	67
Počet príloh	0

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Katarína Štočková
Title of thesis	FUCCI system as a powerful tool for the cell cycle phases identification
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Alžběta Srovnalová Ph.D
The year of presentation	2023
Language	Slovak

Abstract

The Fluorescence Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (FUCCI system) is a tool used to visualize the cell cycle phases of living cells in real time. The method is based on the coordination of Cdt1, whose level peaks during G₁ phase and declines sharply in S phase, and its inhibitor geminin, whose level is high during G₂, declines in M phase. The association of fluorescent proteins with Cdt1 and geminin allows continuous visualization of cells in the G₁, S, or G₂/M phases of the cell cycle.

The aim of this work was to establish new transformed, reporter cell lines, namely the non-tumor cell line BJ and the tumor cell line HCT-116, based on lentiviral transduction. The action of anticancer drugs with known activity on different phases in the cell cycle was tested in these lines. Drug testing was performed on polyclonal and subsequently monoclonal cell lines. A total of seven anticancer agents were tested at two different concentrations. The effect of the drugs on the cell cycle in the tested lines was evaluated by image analysis, which revealed the percentage of cells in the certain phase of the cell cycle.

Keywords	apoptosis, cell cycle, cytostatics, checkpoints, transduction
Number of pages	67
Number of appendices	0

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracovala samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci 09.05.2023

POĎAKOVANIE

Týmto by som chcela poďakovať vedúcej práce Mgr. Alžbete Srovnalovej, Ph. D. za odborné vedenie bakalárskej práce, trpezlivosť, cenné rady a pripomienky. Taktiež by som chcela poďakovať za možnosť pracovať na mojej bakalárskej práci na pracovisku a všetkým pracovníkom Laboratória experimentálnej medicíny z Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V neposlednom rade by som chcela poďakovať mojej rodine a partnerovi, ktorí ma v priebehu štúdia podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD	- 9 -
2 CIELE PRÁCE	- 10 -
3 TEORETICKÁ ČASŤ	- 11 -
3.1 Bunkový cyklus všeobecne	- 11 -
3.2 G ₁ fáza	- 12 -
3.2.1 Kontrolný bod G ₁ /S	- 12 -
3.3 G ₀ fáza	- 14 -
3.4 S fáza	- 14 -
3.5 G ₂ fáza	- 15 -
3.5.1 Kontrolný bod G ₂ /M:	- 16 -
3.6 M fáza	- 17 -
3.6.1 Kontrolný bod M	- 19 -
3.7 Apoptóza	- 20 -
3.8 Regulácia bunkového cyklu	- 21 -
3.8.1 Cyklíny	- 22 -
3.8.2 Cyklín-dependentné kinázy	- 23 -
3.8.3 Tumor supresorové gény	- 24 -
3.8.4 Protoonkogény	- 26 -
3.9 FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)	- 28 -
3.10 Význam Cdt1	- 28 -
3.11 Význam geminínu	- 29 -
3.12 Vzájomné ovplyvnenie Cdt1 a geminínu	- 29 -
3.13 Cytostatiká a ich mechanizmus účinku	- 30 -
4 PRAKTICKÁ ČASŤ	- 32 -
4.1 MATERIÁL A METÓDY	- 32 -
4.1.1 Požité bunkové línie	- 32 -
4.1.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky	- 32 -
Použité chemikálie	- 32 -
Použité liečivá	- 32 -
Použité súpravy	- 32 -
Použité roztoky	- 33 -
4.1.2.1 Príprava roztokov	- 33 -
4.1.3 Prístrojové vybavenie	- 33 -
4.2 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	- 34 -
4.2.1 Rozmrazenie buniek	- 34 -
4.2.2 Pasážovanie, počítanie a kultivácia	- 34 -

4.2.3 Zamrazenie buniek	- 35 -
4.2.4 Testovanie na prítomnosť mykoplazmy	- 35 -
4.2.5 Izolácia plazmidu	- 35 -
4.2.6 Agarózová elektroforéza	- 36 -
4.2.7 Určenie minimálnej inhibičnej koncentrácie.....	- 37 -
4.2.8 Transfekcia.....	- 38 -
4.2.8 Transdukcia	- 38 -
4.2.9 Monoklonálna línia	- 39 -
4.2.10 Príprava buniek na testovanie látok pomocou multidropu.....	- 39 -
4.2.11 Testovanie koncentrácie buniek	- 40 -
4.2.12 Nanesenie testovaných liečiv	- 40 -
4.2.13 Analýza fluorescenčnou mikroskopiou.....	- 41 -
4.2.14 Obrazová analýza	- 41 -
5 VÝSLEDKY	- 43 -
5.1 Stanovenie koncentrácie pBOB Fast Fucii.....	- 43 -
5.2 Vyhodnotenie MIC a ideálnych pomerov lentivírusovej transdukcie.....	- 43 -
5.3 Vyhodnotenie koncentrácie buniek	- 44 -
5.4 Testovanie polyklonálnej bunkovej línie BJ a monoklonálnej línie HCT-116.....	- 45 -
6 DISKUSIA	- 57 -
7 ZÁVER	- 60 -
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	- 61 -

ZOZNAM SKRATIEK

APC	anafázu podporujúci komplex
APC/CCdh1	APC/C aktivačný proteín Cdh1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
Cdc	fosfatáza delenia bunkového cyklu
CDK	cyklín dependentná kináza
CDKs	cyklín dependentné kinázy
Cdt1	licenčný faktor pre zahájenie DNA replikácie
cyc	cyklín
cyc-CDK	komplex cyklín a cyklín dependentná kináza
DMSO	Dimetyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMEM	Eagle's minimal essential medium
FBS	fetálne hovädzie sérum
FUCCI	fluorescenčný indikátor bunkového cyklu založený na ubikvitinácii
GDP	guanozindifosfát
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GTP	guanozíntrifosfát
Chk	kináza kontrolneho bodu
IC50	polovica inhibičnej koncentrácie
MCM	mikrochormozómy
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
ORC	komplex rozpoznávania počiatkov
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pRB	retinoblastómový proteín
pre-RC	pre-replikačný komplex
RB	retinoblastómový gén
RFP	červený fluorescenčný proteín
RNA	ribnukleová kyselina
SAC	kontrolný bod zastavenia vretienka
Skp2	proteín 2 asociovaný s kinázou S-fázy
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
TBE	Tris-borát-EDTA
TGF	transformujúci rastový faktor
TP53	tumor supresorový gén
TSG	tumor supresorový gén

1 ÚVOD

Podľa najnovších výskumov rakoviny hrubého čreva sa vyskytuje v Európskej únii toto ochorenie u 10 % populácie s diagnostikovaným onkologickým ochorením. Rakovina hrubého čreva sa lieči podľa rozsahu a štádií ochorenia lokálnou, systematickou alebo kombinovanou liečbou. Táto práca je zameraná na protinádorové liečiva a teda prispieva k určeniu potenciálnych liečiv, ktoré sú schopné zablokovať bunkový cyklus.

Cytostatiká inhibujú rast buniek a ich delenie, nejedná sa však iba o bunky rakovinotvorné ale aj bunky zdravé. Liečivá, ktoré boli v tejto práci testované pôsobia na bunky zastavením v špecifickej fáze bunkového cyklu podľa mechanizmu pôsobenia týchto látok. Experiment bol prevádzaný okrem nádorovej bunkovej línie hrubého čreva súčasne aj na nenádorovej bunkovej línii fibroblastov predkožky. K vyhodnocovaniu účinku použitých liečiv bol použitý systém FUCCI, ktorý vizualizuje bunky v priebehu bunkového cyklu v reálnom čase. Zhodnotením percentuálneho zastúpenia buniek v určitých fázach bol vyhodnotený účinok liečiva na bunky. Taktiež bol sledovaný celkový počet buniek, ktorý bol smerodajným ukazovateľom apoptózy buniek. Použité testované látky vykazujú vysoký potenciál na liečbu rakoviny hrubého čreva.

2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše zameranej na bunkový cyklus, jeho kontrolne mechanizmy, reguláciu; FUCCI systém
2. Získanie zručností v laboratóriu tkanivových kultúr – práca s bunkovými líniami za sterilných podmienok
3. Vytvorenie a charakterizácia reportérových línii za použitia plazmidu pBOB-Fast FUCCI pomocou lentivírusovej transdukcie
4. Selekcia monoklonálnej populácie na základe sortovania prietokovou cytometriou
5. Testovanie protinádorových liečiv na vytvorenej bunkovej línii, určenie mechanizmu pôsobenia testovaných liečiv
6. Vyhodnotenie účinku liečiv na jednotlivé fáze bunkového cyklu pomocou obrazovej analýzy

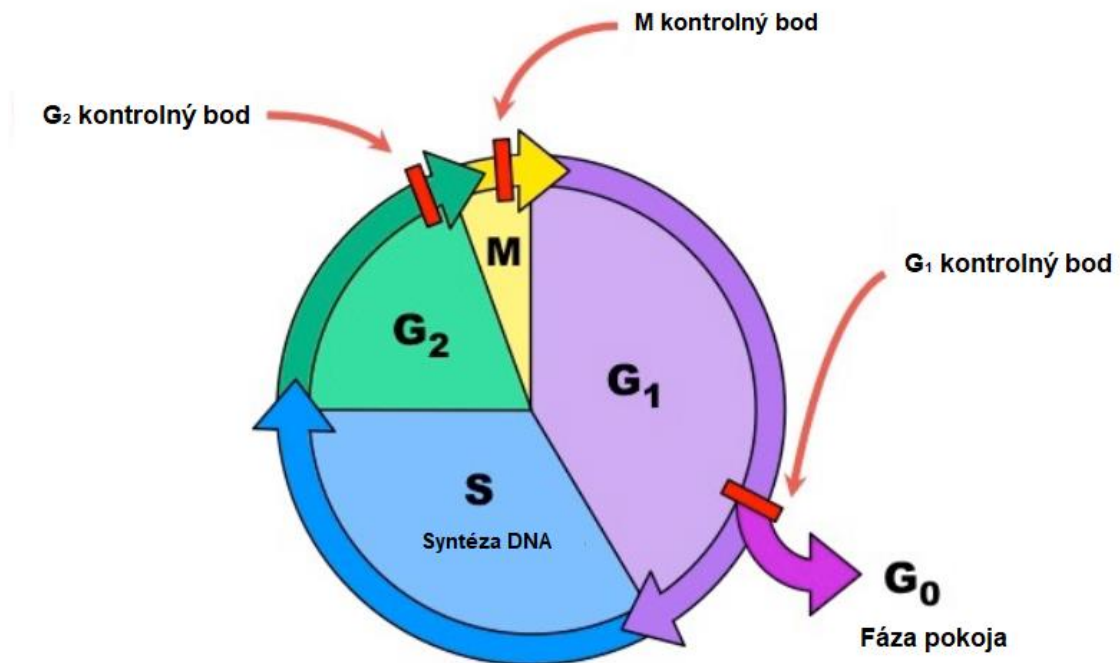
3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Bunkový cyklus všeobecne

Bunkový cyklus je séria udalostí, ktoré prebiehajú v bunke počas jej rastu a delenia. Bunka trávi väčšinu času v interfáze, počas ktorej rastie, replikuje svoje chromozómy a pripravuje sa na delenie. Po opustení interfázy prejde mitózu a dokončí delenie. Výsledné bunky, dcérske, vstupujú každá do vlastnej interfázy a začínajú nové kolo bunkového cyklu (National Institutes of Health, 2022).

Ide o štvorstupňový proces. Vo fáze G_1 bunka zväčšuje svoju veľkosť, fáza S je typická kopírovaním svojej DNA, nasleduje G_2 fáza, kde sa bunka pripravuje na delenie a delí sa v poslednej fáze M. Prvé tri stupne bunkového cyklu G_1 , S, G_2 tvoria interfázu, ktorá predstavuje rozpätie medzi deleniami buniek (Telser, 2002).

Na základe stimulačných a inhibičných správ, ktoré bunka dostáva, sa rozhoduje, či má vstúpiť do bunkového cyklu a deliť sa. Bunky používajú špeciálne proteíny a kontrolné signalizačné systémy, aby zabezpečili správny priebeh bunkového cyklu (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2022). Hlavné kontrolné body sú na konci G_1 fázy, na začiatku G_2 fázy a kontrolný bod počas priebehu mitózy. Ak sa v týchto kontrolných bodoch zistia poškodenia DNA alebo abnormality, bunka je nútená podstúpiť apoptózu (De Zio et al., 2013). Kontrolne systémy však môžu byť sabotované chybnými proteínmi alebo génmi, ktoré spôsobujú malígnu transformáciu bunky, čo môže viesť k rakovine.



Obrázok 1: Kontrolné body bunkového cyklu. Bunkový cyklus je kontrolovaný v troch kontrolných bodoch. Integrita bunky je kontrolovaná v 1. kontrolnom bode G₁. Správna duplikácia chromozómov sa hodnotí v G₂ kontrolnom bode. Pripojenie každého kinetochoru k vláknu vretienka sa kontroluje v kontrolnom bode M. (Prevzaté a upravené podľa: Hein et al., 2014)

3.2 G₁ fáza

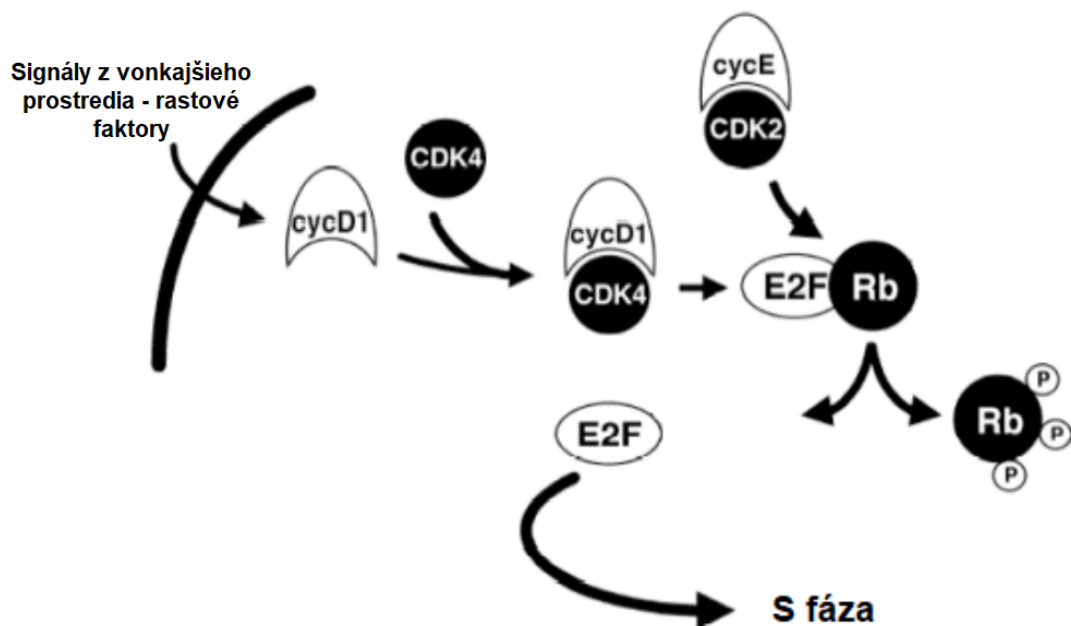
Po ukončení jadrového delenia a vzniku dvoch dcérskych buniek, kedy je bunka schopná samostatného prežitia, začína fáza G₁. Táto fáza je špecifická vysokou metabolickou aktivitou, proteosyntézou, syntézou RNA v jadre. Bunka sa zväčšuje, vytvára sa zásoba nukleotidov a syntetizujú sa enzýmy pre budúcu replikáciu jadrovej DNA. Počas tejto fázy je bunka schopná reparácie častí DNA, ktoré boli poškodené mutáciami. Nachádza sa tu kontrolný uzol, ktorý zaisťuje, aby materská bunka prešla do ďalšej fázy bez poškodenia genetickej informácie. Ukončenie tejto fázy je zahájené replikáciou jadrovej DNA. Bunka prechádza do fázy syntetickej (Figulová, 2012).

3.2.1 Kontrolný bod G₁/S

Hlavný kontrolný bod, označovaný ako bod reštrikcie. Rozhoduje o delení bunky alebo oddialení bunkového delenia, prípadný vstup bunky do pokojovej fázy G₀ (Garofalo, 2010). Úsek je dostatočne dlhý na reparačné mechanizmy, odstránenie chýb spôsobených mutáciami. Pri zlyhaní týchto opravných mechanizmov môžu vzniknúť nádorové bunky (Paulovich a Toczyski, 1997).

Rastové faktory sú gény, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri regulácii bunkového delenia a proliferácie buniek. Prítomnosť rastových faktorov v extracelulárnom priestore aktivuje signálne dráhy, k produkcii cyklínu D, ten sa viaže na CDK 4/6 (Goel et al., 2018). Komplex cyklín D s CDK 4/6 zaisťujú expresiu génu pre cyklín E, ktorý s CDK vytvára komplex. Tento komplex fosforyluje retinoblastómový proteín (pRB). Modifikovaný pRB uvoľňuje proteín E2F slúžiaci ako transkripčný faktor k regulácii expzie génov pre proliferáciu buniek, ktoré sa podieľajú na postupe cez G₁ do S fázy bunkového cyklu produkciu. Gény regulované E2F sú zložky replikačného aparátu, zahrňujú enzýmy zaisťujúce syntézu nukleotidov, opravy poškodenej DNA a v neposlednom rade sú to súčasťou riadiace neskorší nástup a priebeh mitózy alebo apoptózy (Polager et al., 2002).

Zmeny v dôsledku genetických mutácií ako delécia, bodová mutácia alebo nadmerná expresia génov vedie k zmene rovnováhy medzi fosforylovaným a defosforylovaným Rb (Hall a Peters, 1996). Dochádza k poškodeniu kontrolného bodu G₁/S, čo má za dôsledok nezávislosť bunky na regulačných signáloch. Bunka sa môže deliť aj v podmienkach, ktoré by boli za normálnych okolností zabrzdené (Paulovich a Toczyski, 1997).



Obrázok 2: Kontrolný bod G₁/S. Tento bod slúži k opravným mechanizmom, zastaveniu cyklu, prípadnému prestúpeniu bunky do pokojovej fázy G₀. Prítomné rastové faktory indikujú k naviazaniu cyklínu D na CDK 4/6. Vzniknutý komplex s cyklínom E fosforyluje Rb, ktorý uvoľňuje E2F. Transkripčný faktor E2F slúži ako zložka replikačného aparátu. (Prevzaté a upravené podľa: Dong, 2015)

3.3 G₀ fáza

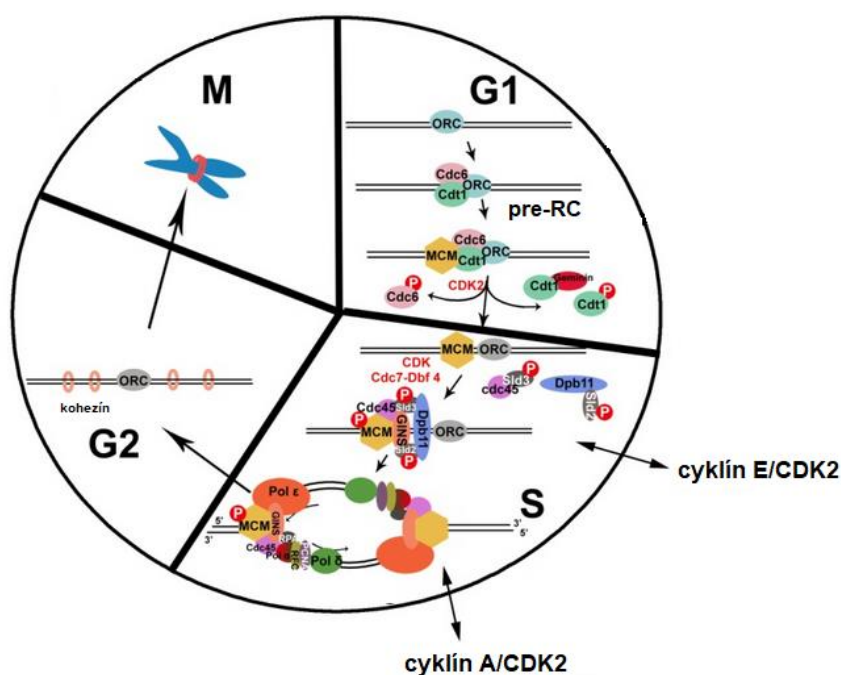
Väčšina buniek sa nachádza v pokojovej fáze G₀. V tejto fáze môžu byť natrvalo alebo opätovne vstúpiť do G₁ fázy bunkového cyklu. V pokojovej fáze sa bunky nereplikujú ani nedelia, ale sú životaschopné (Pouget, 2022). Mitogény, cyklíny a cyklín-dependentné kinázy potrebné na delenie bunky zanikajú. Mitotické delenie je zastavené, avšak bunky zostávajú metabolicky aktívne. Proces opätovného vrátenia bunky do bunkového cyklu je zabezpečený stimuláciou pomocou rastových faktorov a je pod kontrolou komplexu cyklinu D s CDK4/6. Bunky môžu prejsť do G₀ fázy po ukončení mitózy alebo preto, že nie je potrebné aby sa delili. Do pokojovej fázy môžu vstúpiť aj z dôvodu nedostatku energie a živín, ktoré sú potrebné, aby sa bunka delila (Michie et al., 2018).

3.4 S fáza

Po prechode kontrolným bodom G₁/S sa bunka dostáva do fázy S. Dochádza k replikácii DNA. Zvyšovanie hladiny cyklinu A prebieha počas celej fázy. Cyklin A sa viaže s CDK2, tento komplex fosforyluje proteín Cdc6. Dochádza k replikácii DNA, vznikajú dve vlákna s identickou genetickou informáciou. Vznikajú dvojchromatídové chromozómy (Ayad, 2005).

Počas S fázy bunka premieňa pre-replikačné komplexy (pre-RC) na aktívne replikačné vidlice, aby mohla začať replikácia DNA. Tento proces závisí od kinázovej aktivity Cdc 7 a cyklín-dependentných kináz (CDKs), ktoré sú pri vstupe do S fázy regulované. Aktivácia pre-RC je prísne regulovaná. Po tom ako Cdc 7 a CDK fosforyluje substrát, sa s pre-RC spája súbor replikačných faktorov. Dochádza k podnecovaniu helikázy, aby došlo k rozvinutiu úseku rodičovskej DNA na dve vlákna ssDNA, ktoré pripoja replikačný proteín A, proteín viažuci ssDNA. Pripojenie proteínu A pripravuje replikačnú vidličku na naviazanie replikačných polymeráz DNA a posúvanie svoriek. Naviazanie týchto faktorov dokončí aktívnu replikačnú vidličku a iniciuje sa syntéza novej DNA (Takeda a Dutta, 2005).

V priebehu S fázy dochádza k oprave chybných nukleotidov, taktiež sú syntetizované proteínové komponenty chromatinu, telomeráza syntetizuje DNA na konci chromozómu. V prípade poškodenia DNA vo fázy S, nenastáva zastavenie bunkového cyklu, len jeho spomalenie (Fischer et al., 2018; Mendoza, 2009).



Obrázok 3: Syntetická fáza bunkového cyklu. V G₁ fáze sa helikázy pripájajú k replikačným začiatkom na vytvorenie pre-RC. Po vstupe do S fázy sa proteíny GINS a Cdc45 pripájajú na replikačné počiatky, sú závislé od faktorov kontrolujúcich zahájenie počiatku (Dpb11, sld2 a sld3) pod reguláciou kináz cyklín E/CDK2 a Cdc7. Fosforylovaná helikáza MCM2-7 spolu s Cdc45 a GINS tvoria komplex CMG a slúžia na odvíjanie miesta replikačného počiatku DNA. Následne sa polymeráza ε a δ pripoja k replikačnej vidlici a začína replikácia DNA. Replikované duplexy DNA sú vo fáze G₂ udržiavané koheziínom a v mitóze sa oddeľujú (Prevzaté a upravené podľa: Huang a Zhang, 2011).

3.5 G₂ fáza

Druhá prípravná fáza závislá na dokončení replikácie DNA vo fázy S. Na začiatku fázy sa množia organely ako sú mitochondrie a lipozómy. Vďaka vlastnej DNA sa môžu deliť nezávisle na zvyšku bunky (Markgraf, 2019).

Prípravná fáza má dve hlavné funkcie. Musí skontrolovať pripravenosť bunky na fázu mitózy a prípadné nedostatky okamžite odstrániť. V prípade, že dôjde k zisteniu závažných chýb nastáva prerušenie bunkového cyklu a zastavenie procesu delenia. K prerušeniu a zastaveniu delenia dochádza v neprítomnosti cyklínov alebo pomocou aktivovaného proteínu p53. (Stark a Taylor, 2004).

Druhá funkcia G₂ fázy je zaistenie prítomnosti dostatku materiálu pre dve bunky. Počas trvania fázy sa často syntetizujú nové bielkoviny, množia sa organely, vytvárajú sa lipidy pre

membránu, až pokiaľ nie je dostatok pre dve bunky. Veľkosť bunky sa pôsobením týchto činností výrazne zväčší (Matson a Cook, 2017).

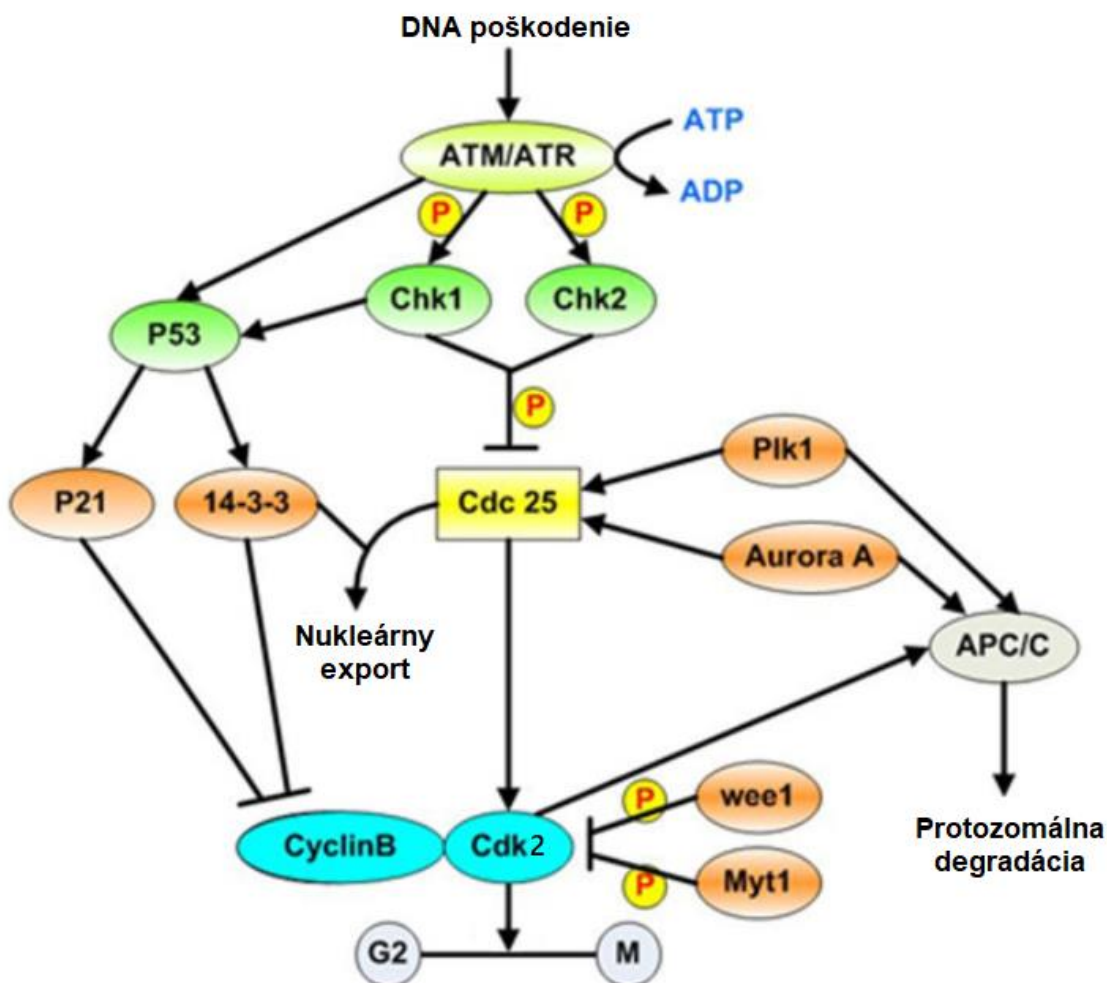
3.5.1 Kontrolný bod G₂/M:

Na konci G₂ fázy rozhoduje kontrolný bod G₂/M o vstupe do mitotickej fázy. Zvyšuje sa koncentrácia cyklinu B, ktorý vytvára komplex s Cdk2. Jeho úloha je nevpustiť bunky do mitózy, pokiaľ je syntéza DNA nedokončená alebo poškodená. V závislosti na type zistenia poškodenia bunky, reagujú kinázy spustením signálnych kaskád. Prítomnosť poškodenia DNA spúšťa dráhy ATM alebo ATR, vďaka ktorým dochádza k aktivácii kináz kontrolného bodu Chk1 a Chk2, dochádza k následnej inaktivácii komplexu cyklín B-Cdk2. Nastáva zabránenie fosforylačnej aktivity a označenie komplexu na degradáciu ubiquitínom (Cuddihy a O'Connell, 2003; Morgan, 2007).

V prípade, že došlo k zlyhaniu kontrolného bodu v dôsledku prítomnosti nereplikovanej DNA alebo poškodenej DNA, sa Cdk2 udržiava v neaktívnom, fosforylovanom stave a mitotickému vstupu sa zabráni (O'Connell a Walworth, 2003).

Prvá kaskáda okamžite inhibuje progresiu Chk do mitózy, fosforyláciou a inaktiváciou Cdc25. Druhá pomalšia paralelná kaskáda zahŕňa fosforyláciu p53, dochádza k aktivácii väzby na DNA. Proteín p53 reguluje funkciu inhibítora Cdk2, p21 a proteínov 14-3-3, ktoré fosforylujú a tým inaktivujú Cdk v cytoplazme (Gould a Nurse, 1989).

Kináza kontrolného bodu 1 fosforyluje Wee1. Aktivovaný Wee1 udržiava cyklín B v komplexe s Cdk2 inaktívovaný a zabraňuje vstupu bunky do mitózy. Zároveň Chk1 inhibuje Cdc25, ktorý aktivuje komplex cyklínB/Cdk2 a podporuje obnovu bunkového cyklu. Na reakcii kontrolného bodu sa podieľa viacero dráh, a preto zacielenie na Cdc25, nie je jediným mechanizmom, ktorý spravuje bunkový cyklus (Song et al., 2020).



Obrázok 4: Kontrolný bod G₂/M. V reakcii na poškodenie DNA sa aktivuje signálna dráha ATM/ATR, ktorá vedie k fosforylácii a aktivácii Chk1 a Chk2 a k následnej fosforylácii Cdc25. Fosforylovaný Cdc25 je udržiavaný v cytoplazme proteínmi 14-3-3, čo zabraňuje aktivácii cyklínuB/Cdk2 a vedie k zastaveniu v G₂. Aktivované dráhy ATM/ATR tiež aktivujú signalizáciu závislú od p53, ktorý udržiava Cdk2 v cytoplazme pomocou proteínov 14-3-3, čím ponecháva zastavený cyklus v G₂. Okrem toho p53 indukuje aktiváciu p21, inhibítora Cdk, ktorý sa viaže na komplex cyklínuB/Cdk2 a inhibuje ho (Wang et al., 2009).

3.6 M fáza

Počas mitotickej fázy dochádza k prerozdeleniu duplikovanej DNA a cytoplazmy, následnému vytvoreniu dvoch buniek (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2020). Správne fungovanie bunky je zaistené komplexami cyklínu B a CDC2, ktoré fosforylujú proteíny (Hohenberg, 2022). Fáza zahŕňa dva odlišné procesy, a to samotnú mitózu a cytokinézu.

Počas mitotickej fázy sa jadrová DNA bunky kondenzuje do viditeľných chromozómov a je od seba oddelená mitotickým vretienkom. Mitóza prebieha vo fázach: profáza, prometáfaza, metafáza, anafáza, telofáza.

Profáza je prvá fáza mitózy, ktorá oddeľuje zdvojený genetický materiál, v jadre materskej bunky, na dve identické dcérske bunky. Dochádza ku kondenzácii chromatinu, ktorý sa vinie a stáva sa viac kompaktnjším, čo vedie k jeho zviditeľneniu. Začína sa vytvárať mitotické vretienko tvorené mikrotubulmi na opačných póloch bunky. Vretienko je zodpovedné za rozdelenie sesterských chromatíd na dve bunky (Castro et al., 2003).

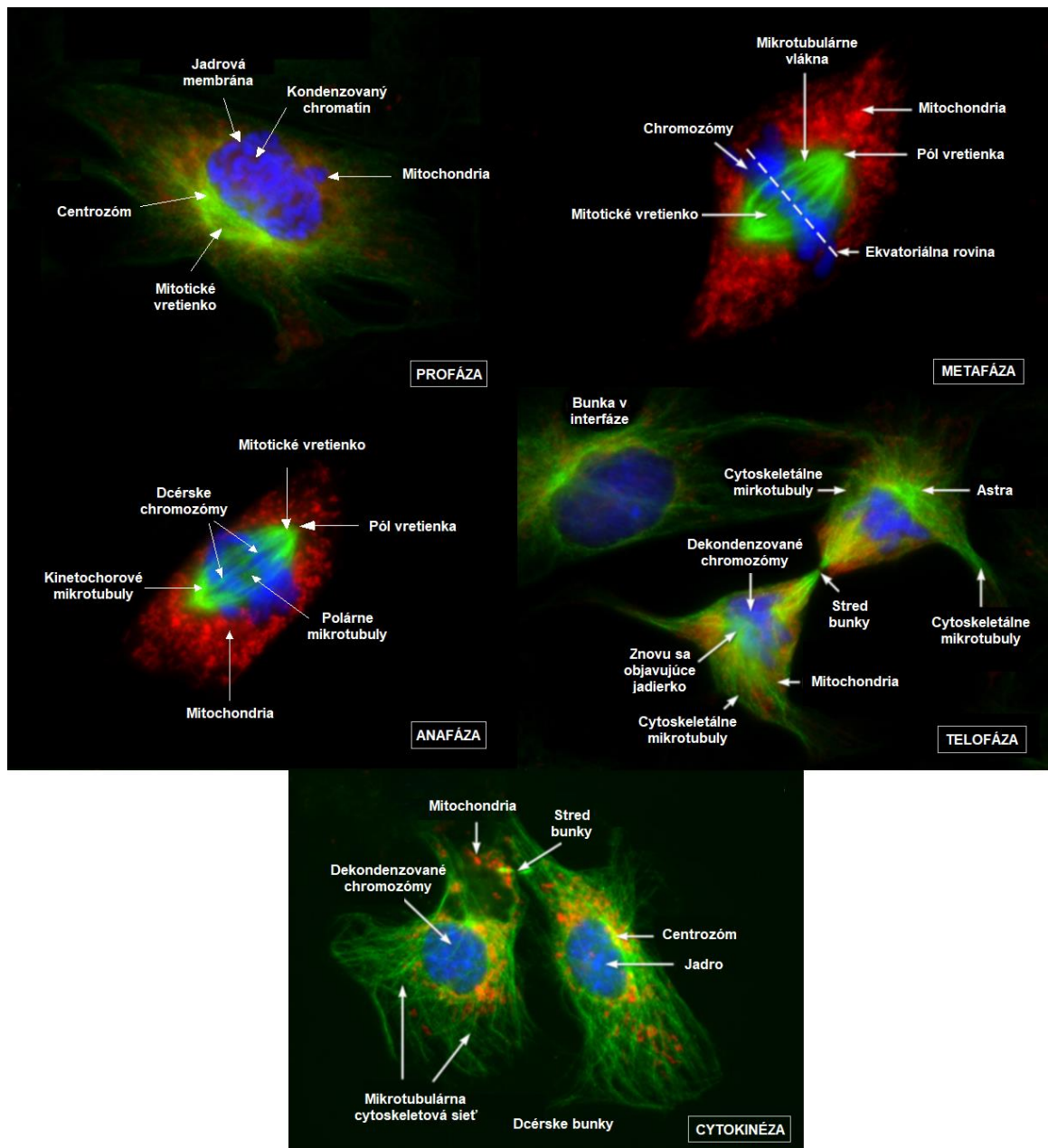
Po ukončení profázy vstupuje bunka do prometáfázy. V druhej fáze dochádza k fosforylácii jadrových lamín pomocou komplexu cyklínu B a cyklín dependentnej kinázy (cycB-CDK) spôsobujúcich rozpad jadrovej membrány na množstvo malých vezikúl. Následkom čoho majú mikrotubuly vretienka priamy kontakt s genetickým materiálom bunky. Mikrotubuly sú dynamické a rastú smerom von z centrozómu, kde nachádzajú chromozóm a spájajú sa s ním v oblasti kinetochoru. Na každý kinetochor sa pripája aspoň jeden mikrotubul z každého pólu. Následne nastáva preťahovanie a chromozómy sa pohybujú k jednému aj druhému pólu bunky (Castro et al., 2003).

Počas metafázy má každý chromozóm aspoň dva mikrotubuly vychádzajúce z kinetochoru a ku každému pólu bunky je pripojený aspoň jeden mikrotubul. Kinetochórne mikrotubuly ťahajú sesterské chromatídy z jednej strany na druhú, až pokiaľ sa nezosúladi v ekvatoriálnej rovine bunky (Castro et al., 2003).

Oddelenie a presun chromozómov k opačným pólom bunky prebieha počas anafázy. Dochádza k enzymatickému rozpadu kohezínu, ktorý spájal sesterské chromatídy. V prvej časti anafázy sa mikrotubuly kinetochoru skracujú a priťahujú chromozómy k pólom vretienka. Počas druhej časti anafázy astrálne mikrotubuly, ukotvené na bunkovej membráne, ťahajú póly ďalej od seba a interpolárne mikrotubuly sa posúvajú okolo seba, čím sa vytvára ťah na chromozómy (Castro et al., 2003).

Počas poslednej fázy, telofázy, sa chromozómy dostávajú k pólom bunky. Mitotické vretienko sa rozpadne a vezikuly, ktoré obsahujú fragmenty pôvodnej jadrovej membrány, sa zhromaždia okolo dvoch súborov chromozómov. Prítomná fosfatáza slúži na následnú defosforyláciu lamín na oboch koncoch bunky. Táto defosforylácia vedie k vytvoreniu novej jadrovej membrány okolo každej skupiny chromozómov (Castro et al., 2003).

Pri cytokinéze sa cytoplazma bunky rozdelí na dve časti, čím vznikajú dve dcérske bunky. Zvyčajne sa cytokinéza začína po ukončení mitózy. V prípade živočíšnych buniek dochádza k deleniu bunky pomocou cytoskeletálnych vlákien. Vzniknutý kontraktilný prstenec sa sťahuje dovnútra a zovrie bunku na dve časti, dochádza ku kontraktilnej cytokinéze (Telser, 2002).



Obrázok 5: Jednotlivé štádia mitózy. Na obrázku sú zobrazené štádia mitózy získané pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Bunková DNA bola zafarbená DAPI (modrá), zatiaľ čo mitochondrie boli zafarbené MitoTracker Red CMXRos (červená) a mikrotubuly zafarbené na zeleno pomocou Alexa Fluor 488 značeného sekundárnymi protilátkami. Na vizualizáciu mitózy boli využité živé epitelové bunky obličiek klokánka krysieho (*Potorous tridactylus*) (Prevzaté a upravené podľa: Griffin et al., 2015).

3.6.1 Kontrolný bod M

Nevyhnutná kontrola naviazania chromozómov na mikrotubuly deliaceho vretienka, nastáva na konci metafázy mitózy. Kontrolný bod vretienka určuje (SAC), či sú všetky sesterské chromatídy správne pripojené k mikrotubulom vretienka. Keďže oddelenie sesterských chromatíd počas anafázy je nezvratný krok, cyklus nepokračuje, pokiaľ kinetochory každého páru sesterských chromatíd nie

sú pevne pripojené k aspoň dvom vláknam vretienka vychádzajúceho z opačných pólů bunky (Boundless, 2016). Kontrolný bod zastavenia vretienka aktívne zabraňuje pripojeniu kinetochoru k mitotickému vretienku. Takto nepripojené kinetochory aktivujú proteín SAC na tvorbu difúzneho inhibítora anafázy. Kinetochory prestávajú produkovať tento inhibítor, keď sú mikrotubuly mitotického vretienka pripojené (Kops a Shah, 2012).

3.7 Apoptóza

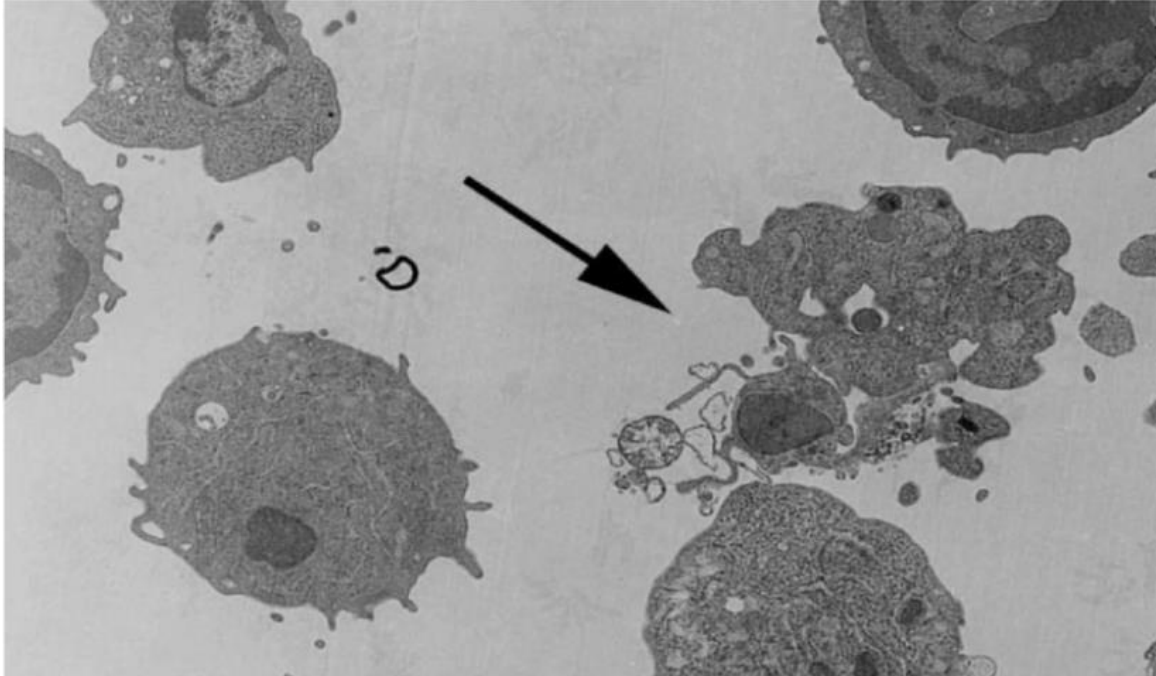
Apoptóza alebo programovaná bunková smrť je regulačný mechanizmus, vďaka ktorému môže bunka vykonať svoju vlastnú smrť v reakcii na extracelulárne signály alebo z dôvodu nenapraviteľného poškodenia buniek či DNA (Ameisen, 2002). Schopnosť vyhnúť sa apoptóze má väčšina nádorových buniek. Častou príčinou je strata nádorového supresora p53. Inaktivácia proteínu p53 spôsobuje, že bunka nie je schopná vnímať poškodenie DNA, ktoré podnecuje apoptózu (Hanahan, 2022). Antiapoptotické zložky rodiny Bcl-2 a inhibítory apoptózy (IAP), ktoré znemožňujú činnosť kaspáz, sú zvýšené a pôsobia proti proapoptotickým účinkom proteínov BH3 (Vo a Letai, 2010). Bcl-2 sa dokáže viazať na proapoptotické regulátory Bax a Bak, čím zabraňuje tvorbe pórov. Môže tiež inhibovať proteíny BH3, čím zabraňuje reakciám na poškodenie DNA. Zabránenie bunkovej smrti v prípade poškodenia bunky spolu s pokračujúcim delením buniek vedie k rastu nádoru (Hanahan, 2022). Apoptóza je nevyhnutný proces pri vývojových mechanizmoch ako prevencia nadmerného rastu bunkových línii.

Autofágia, proces pri ktorom bunka rozkladá a ničí poškodené alebo abnormálne proteíny a iné látky, a apoptóza sú prepojené. Dochádza medzi nimi k vzájomnému ovplyvňovaniu. Autofágia je nevyhnutný proces bunky, aby bola schopná prežitia a fungovania. Nadmerná autofágia však môže viesť k bunkovej smrti, čo je proces morfológicky odlišný od apoptózy (Aman et al., 2021).

Apoptická bunka nepoškodzuje susedné bunky prebiehajúcim procesom. Bunka sa zmenší a zahustí, dochádza ku kondenzácii cytoplazmy. Cytoskelet sa odbúra, jadrový obal sa rozpadne a DNA sa rozpadne na fragmenty. Najpodstatnejšia je zmena povrchu bunky (Maderna a Godson, 2003). Pozmenená bunka je ľahko fagocytovaná susednou bunkou alebo makrofágom, skôr ako dôjde k úniku obsahu bunky do okolia. Tým sa zabraňuje škodlivým následkom a je možná recyklácia organických zložiek mŕtvej bunky bunkou, ktorá ju pohltí.

Vnútro-bunkový mechanizmus zodpovedný za apoptózu závisí od proteáz, ktoré majú vo svojom aktívnom mieste cysteín. Dochádza k štiepeniu cieľových proteínov na špecifických asparagových kyselinách (Elmore, 2007). Kaspázy sa syntetizujú v bunke ako prokaspázy, ktoré sa zvyčajne aktivujú štiepením na kyseline asparágovej inými kaspázami. Po aktivácii sa kaspázy

štiepia, a tým aktivujú ďalšie prokaspázy, čo vedie k zosilneniu proteolytickej kaskády (Thornberry a Lazebnik, 1998). Niektoré z aktivovaných kaspáz štiepia jadrové laminy, čoho dôsledok jej nezvratný rozpad. Iné kaspázy štiepia proteín, čím uvoľnia DNAzu na rozdelenie DNA v bunkovom jadre. Bunka je rýchlo pohltaná susednou bunkou.

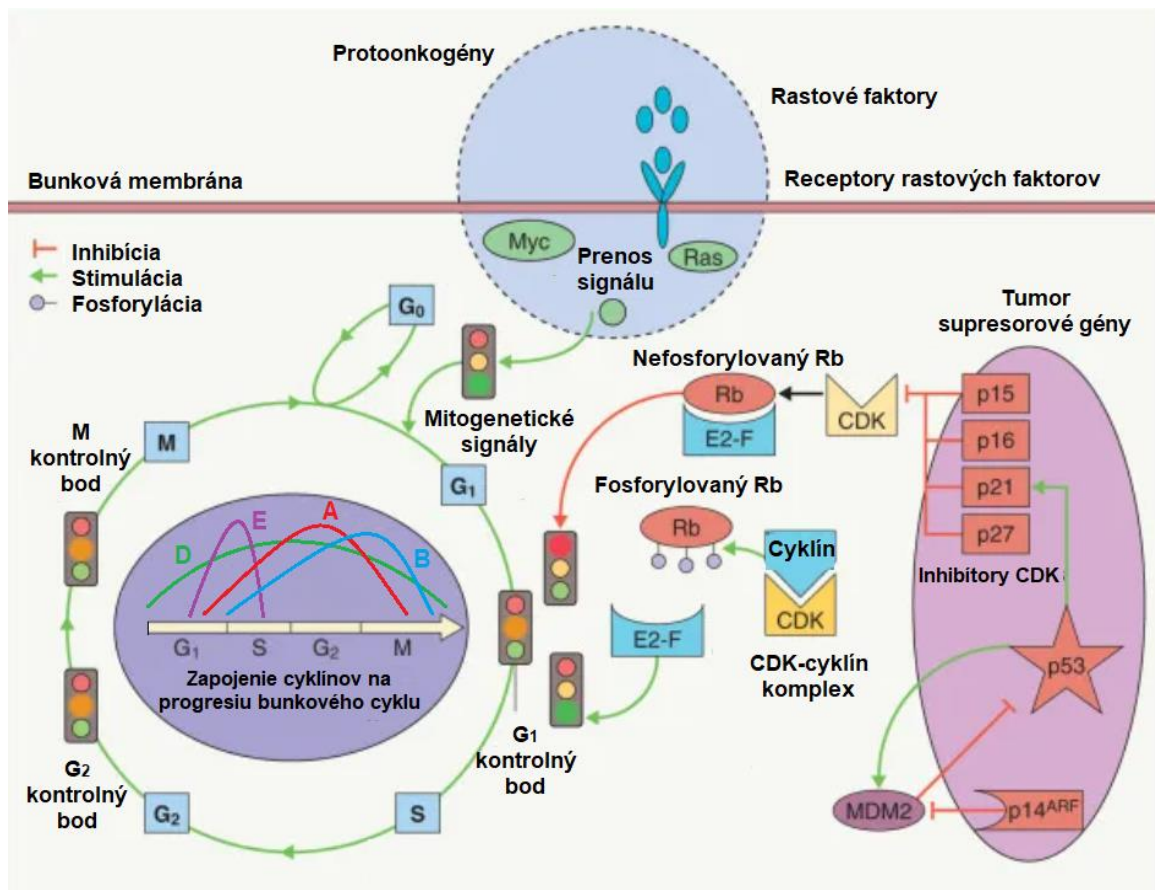


Obrázok 6: Programovaná bunková smrť. Fotografia zhotovená transmisnou elektrónovou mikroskopiou zobrazujúca apoptickú bunku kostnej drene myši BALB/c. Bunka ktorá prechádza apoptózou, vykazuje kondenzáciu jadra na fragmenty a zmenšenie bunky. Jadro a cytoplazma sa rozpadnú na apoptické telieska, ktoré sú fagocytované okolitými bunkami (Prevzaté a upravené podľa: Tamaki et al., 2003).

3.8 Regulácia bunkového cyklu

Okrem vnútorných kontrolných bodov existujú ďalšie dve skupiny intracelulárnych zložiek, ktoré regulujú bunkový cyklus. Tieto regulačné mechanizmy buď podporujú vstup bunky do ďalšej fázy alebo zastavujú bunkový cyklus. Pozitívna regulácia, postup v bunkovom cykle, je zabezpečená cyklínmi a cyklín-dependentnými kinázami. Negatívna regulácia je zabezpečená tumor supresorovými génmi (Lim a Kaldis, 2013).

Regulačné zložky môžu pôsobiť samostatne alebo môžu ovplyvňovať produkciu iných proteínov a ich aktivitu. Vďaka čomu zlyhanie jedného regulátora nemusí mať takmer žiadny vplyv na bunkový cyklus, najmä v prípade ak je jedna udalosť kontrolovaná viacerými mechanizmami. Prípadne účinok nedostatočného alebo nefunkčného regulátora môže byť rozsiahly a mať pre bunku fatálny dôsledok, v prípade, že je ovplyvnených viacero procesov (Lim a Kaldis, 2013).

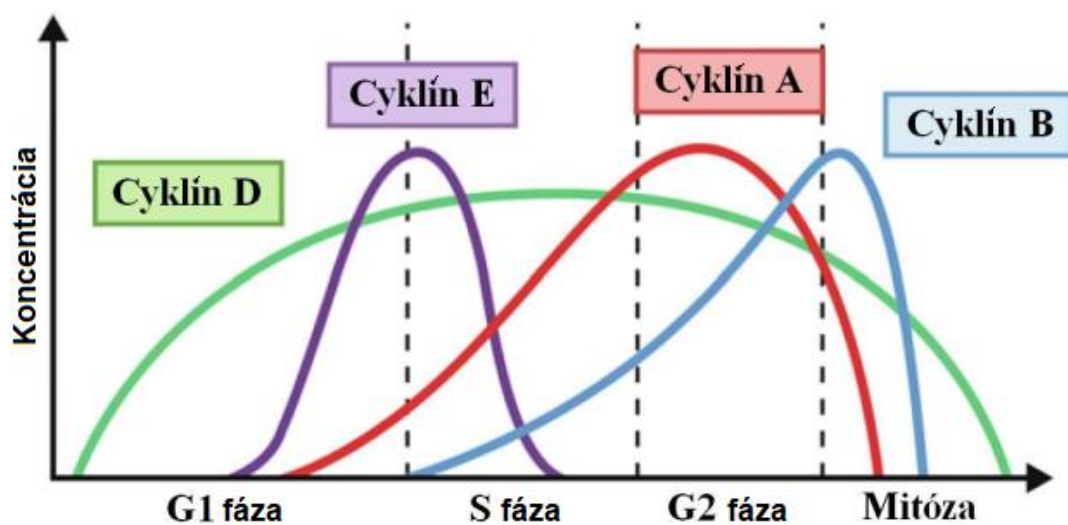


Obrázok 7: Regulácia bunkového cyklu. Základný mechanizmus progresie bunkového cyklu, hladiny cyklínov, sú znázornené vo vnútri bunkového cyklu. Proteínové produkty protoonkogénov, ktoré pôsobia ako hnacie sily bunkového cyklu (zelené semafore), sú znázornené zelenou farbou. Proteínové produkty nádorových supresorových génov, ktoré regulujú kontrolný bod G₁ (červený semafor) bunkového cyklu, sú znázornené červenou farbou. Symboly zeleného semaforu predstavujú kontrolné body bunkového cyklu. (Prevzaté a upravené podľa: Plastic Surgery Key, 2019)

3.8.1 Cyklíny

Patria medzi najdôležitejšie regulátory bunkového cyklu. Cyklíny sú skupinou proteínov, vyskytujú sa v štyroch základných typoch: cyklín D, cyklín E, cyklín A, cyklín B. Každý cyklín je spojený s určitou fázou, prechodom alebo súborom fáz bunkového cyklu, kde pomáha riadiť udalosti danej fázy alebo obdobia (Galderisi et al., 2003).

Hladiny všetkých štyroch cyklínov kolíšu v priebehu cyklu, sú periodicky syntetizované a degradované. Zvýšená koncentrácia cyklínových proteínov je vyvolaná intracelulárnymi aj extracelulárnymi signálmi. Po prechode bunky do ďalšej fázy sa aktivované cyklíny v predchádzajúcej fáze odbúravadajú (Chandrasekaran et al., 2011).



Obrázok 8: Časová os cyklínov v priebehu bunkového cyklu. Jednotlivé cyklíny sú exprimované v rôznych štádiách bunkového cyklu. Cyklín-dependentné kinázy vyžadujú pre správne fungovanie špecifické cyklíny, vďaka tejto vlastnosti dochádza k regulácii aktivity CDK v priebehu bunkového cyklu. Napríklad cyklín A je produkovaný v neskoršej fáze G₁, vzostupuje v S fáze a najvyššiu aktivitu dosahuje v G₂ fáze. (Prevzaté a upravené podľa: Lents a Baldassare, 2016)

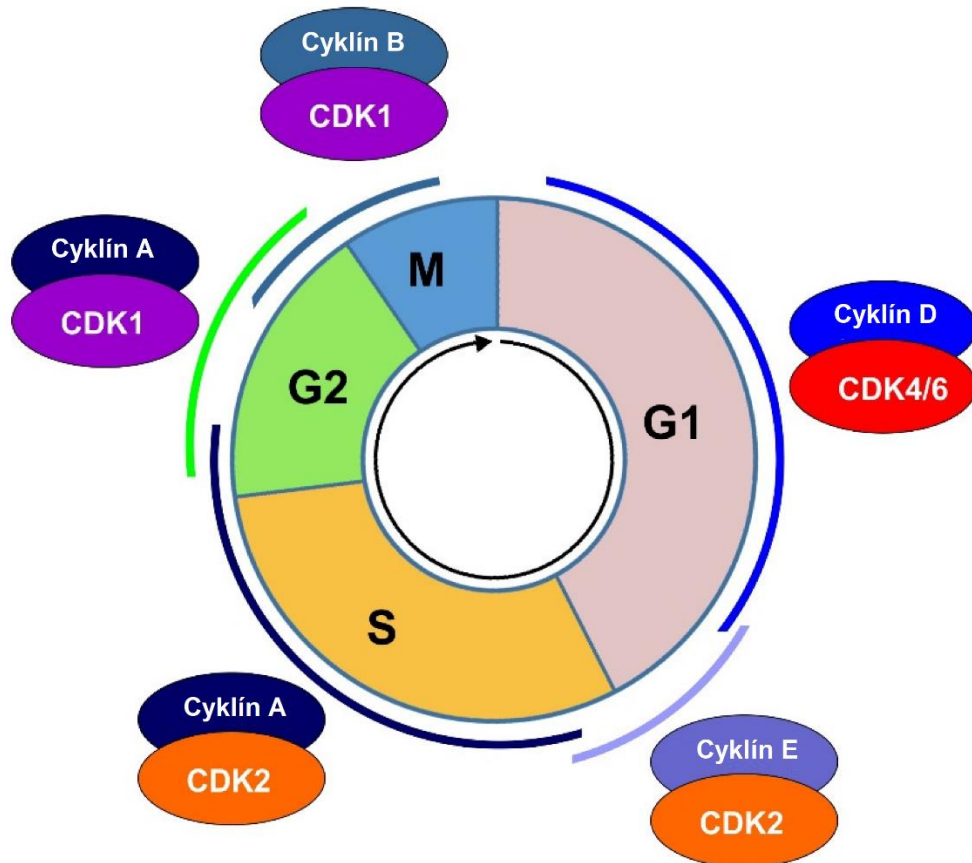
3.8.2 Cyklín-dependentné kinázy

Cyklíny regulujú bunkový cyklus len v prípade, že sú viazané s enzýmami CDKs. Samostatná CDK nie je aktívna, ale väzba cyklínu ju aktivuje, čím sa z nej stane funkčný enzým. Takýto enzým umožňuje modifikovať cieľové proteíny. Tvorba komplexu cyc-CDK riadi progresiu bunkového cyklu prostredníctvom fosforylácie cieľových génov, ako je napríklad nádorový supresorový pRb. Aktivácia cyc-CDK je indukovaná mitogénnymi signálmi a inhibovaná aktiváciou kontrolných bodov bunkového cyklu v reakcii na poškodenie DNA (Otto a Sicinski, 2017).

Cyklín-dependentné kinázy, ktoré fosforylujú špecifické cieľové proteíny. Pripojená fosfátová skupina funguje ako spínač. Ten umožňuje aby sa cieľový proteín stal viac alebo menej aktívnym (Grana a Reddy, 1995). Keď sa cyklín pripojí k CDK nastáva aktivácia kinázy a nasmerovanie CDK na špecifický súbor cieľových proteínov, ktoré sú vhodné pre obdobie bunkového cyklu riadené cyklínom (Obaya a Sedivy, 2002). Hladiny CDK sú počas bunkového cyklu relatívne konštantné, ich aktivita a aktivita cieľových proteínov sa mení, podľa toho, ako klesajú a stúpajú hodnoty rôznych cyklínov (Grana a Reddy, 1995).

Vytvorenie komplexu cycD-CDK4/6 iniciuje fosforyláciu rodiny pRb vo včasnej fáze G₁. Fosforylácia Rb stimuluje uvoľňovanie transkripčného faktora E2F, ktorý následne stimuluje transkripciu včasných génov reagujúcich na E2F, ktoré sú potrebné na progresiu bunkového cyklu.

Medzi skoré gény reagujúce na E2F patria cyklíny typu A a E. V neskorej fáze G₁ sa cyklín E viaže na Cdk2 a aktivuje ho, čo vedie k úplnej fosforylácii Rb a ďalšej aktivácii transkripcie sprostredkovanej E2F. Tieto udalosti spoločne vedú bunky na hranicu fázy G₁/S a iniciujú fázu S. Na začiatku S fázy sa syntetizujú cyklíny typu A a vytvárajú komplex s Cdk2, ktorý fosforyluje proteíny zapojené do replikácie DNA a poháňa prechod bunky do fázy G₂. V neskorej fáze G₂ sa vytvára a aktivuje cycA-Cdk1, ktorý je potrebný na prechod G₂/M a začatie profázy. Nakoniec sa komplexy cycB-CDK1 tvoria vo fáze M a riadia dokončenie mitózy (Wang, 2021).



Obrázok 9: Regulácia bunkového cyklu pomocou cyklínov cyklín-dependentných kináz. Vo fáze G₁ bunkového cyklu sa zvyšuje syntéza cyklínu D, ktorý je viazaný s CDK4/6 a podporuje vstup do bunkového cyklu a jeho priebeh v G₁. Prestup medzi G₁ a S fázou je zabezpečený komplexom cycE-CDK2. Počas S fázy cyklín A s CDK2 riadi priebeh replikácie DNA. Vo fáze G₂ je primárnym regulátorom bunkového cyklu CDK1. Cyklín B dosahuje v M fáze najvyššiu expresiu a v komplexe s CDK1 riadi fázu mitózy (Prevzaté a upravené podľa: Wang, 2021).

3.8.3 Tumor supresorové gény

Nádorové supresory sú gény, ktoré pôsobia v rámci genómu a regulujú viaceré bunkové funkcie. Sú nevyhnutné pre rast buniek a ich progresii v bunkovom cykle, proliferáciu, opravy DNA a ďalšie

klúčové funkcie bunkovej signalizácie ako je zahájenie apoptózy. V prípade nefunkčnosti tumor supresorových génov (TSG) vzniká vysoké riziko poruchy regulácie bunkového rastu, ktorý je známym mechanizmom vzniku rakoviny (Sherr, 2004).

TSG možno funkčne rozdeliť do piatich typov (Joyce et al., 2022)

3.8.3.1 gény kódujúce intracelulárne proteíny, ktoré sú klúčové pri kontrole progresie štádií bunkového cyklu

3.8.3.1.1 Retinoblastóm

Gén RB kóduje pRB, ktorý reguluje rast buniek a zabraňuje príliš rýchlemu alebo nekontrolovateľnému deleniu. Za určitých podmienok pRB bráni iným proteínom spúšťať replikáciu DNA. Keďže replikácia DNA prebieha pred samotným delením bunky, táto regulácia kontroluje delenie buniek a pomáha predchádzať rastu nádorov. Okrem iného pRB integruje s ďalšími proteínmi a ovplyvňuje prežívanie buniek, apoptózu a diferenciáciu (vid' Obrázok 2) (Herwig a Strauss, 1997).

Mutácie ovplyvňujúce funkcie RB, CDK4 a amplifikácie génu cyklínu D, strata inhibítorov CDK a inhibícia môžu zrušiť antiproliferačný účinok RB pri nádorových ochoreniach (Javanmard et al., 2019).

3.8.3.2 gény, ktoré kódujú receptory alebo prenášače signálu, ktoré inhibujú proliferáciu buniek

3.8.3.2.1 transformujúci rastový faktor (TGF)- β

3.8.3.2.2 proteín adenomatóznej polypózy coli (APC)

3.8.3.3 gény ktoré kódujú proteíny kontrolného bodu, užitočné pri zastavení a cyklu v prípade poškodenia DNA alebo chromozomálnych defektov

3.8.3.3.1 proteíny p16 a p14

3.8.3.3.2 tumor supresorový gén BRCA1

3.8.3.4 gény, ktoré kódujú proteíny užitočné na zahájenie apoptózy

3.8.3.4.1 proteín p53

3.8.3.4.2 proapoptický gén Bax

3.8.3.5 gény, ktoré kódujú proteíny podieľajúce sa na oprave DNA

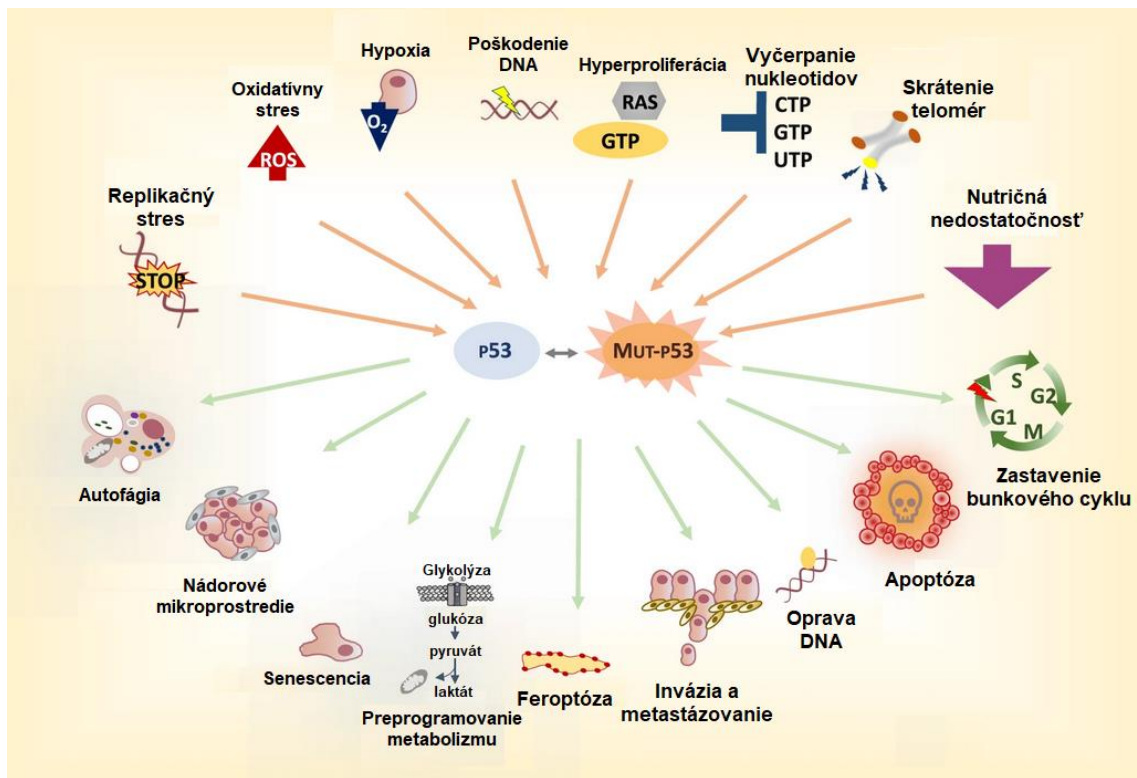
3.8.3.5.1 Tumor supresorový gén TP53

Nádorový supresor TP53 slúži na monitorovanie bunkového stresu, anoxiu, identifikáciu poškodenia DNA alebo nevhodnej signalizácie mutovanej onkoproteínmi. Gén TP53 kóduje

proteín p53, ktorý kontroluje expresiu proteínov a ich aktivitu pri zastavení bunkového cyklu, oprave DNA a apoptóze (Chen, 2016).

Strata funkcie p53 môže spôsobiť pokračovanie replikácie buniek aj v prípade poškodenia ich DNA a neaktivovanie apoptózy. Aktívny p53 reguluje expresiu dôležitých proteínov ako je inhibítor cyklín-dependentnej kinázy p21, ktorý zastavuje kontrolný bod G₁/S. V prípade, že poškodenie nie je opraviteľné, p53 aktivuje gén BAX kódujúci proapoptický proteín, ktorý nakoniec vedie k apoptóze. Taktiež pôsobí na inhibíciu antiapoptického génu BCL2 a stimuluje uvoľnenie cytochrómu c z mitochondrii. Cytochróm c aktivuje v bunke kaspázy zodpovedné za apoptózu. (Ozaki a Nakagawara, 2011).

Proteín p53 môže byť inaktivovaný vírusovými onkoproteínmi, čo vedie k zrušeniu jeho antiproliferačného a ostatného dôležitého účinku na bunku (Tornesello et al., 2018).



Obrázok 10: Proteín p53 odpovedajúci na stres. Proteín p53 slúži ako centrálny prvok medzi vonkajšími faktormi a odpoveďou bunky. Podporuje mechanizmy, ako sú apoptóza, oprava DNA, senescencia, autofágia a mnoho ďalších, čím plní ochrannú funkciu. V prítomnosti mutantnej formy p53 sa fyziologická odpoveď môže meniť, čo vedie k podpore procesov nádorového bujnenia (Prevzaté a upravené podľa: Amelio a Melino, 2020).

3.8.4 Protoonkogény

V ľudskom tele bolo objavených viac ako štyridsať rôznych typov protoonkogénov. Je to skupina zdravých génov, ktoré sa nachádzajú v bunke. Každý z protoonkogénov je zodpovedný za tvorbu

proteínov, ktoré sa podieľajú na stimulácii delenia buniek, inhibujú ich diferenciáciu a zastavujú smrť. Všetky tieto procesy sú dôležité pre normálny vývoj človeka a zachovanie tkanív a orgánov (Chial et al., 2008).

V prípade mutovanej alebo defektnej verzie spôsobenej bodovou mutáciou, deléciou, inzerciou alebo chromozomálnou translokáciou sa zvyšuje expresia proteínov, vznikajú chromozomálne kópie protoonkogénov, génový produkt je hyperaktívny, vzniká fúzny proteín s onkogénnou aktivitou (Chial et al., 2008). Tieto zmeny vedú k neregulovanému deleniu buniek, pomalšej diferenciácii a zvýšenej inhibícii bunkovej smrti. Tieto vlastnosti spoločne definujú bunky, ktoré sa stali nádorovými (Cafasso, 2018).

3.8.4.1 *Ras*

Podľa výskumov ide prvý protoonkogén, ktorý sa pravdepodobne zmenil na onkogén.

Ras je dôležitou súčasťou signálnych transdukčných dráh, ktoré regulujú rast, proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu. Ras funguje ako molekulárny spínač, ktorý sa pohybuje medzi aktívnou formou viazanou na guanozíntrifosfát (GTP) a neaktívnou formou viazanou na guanozín difosfát (GDP). Premena z formy viazanej na GTP na formu viazanú na GDP je sprostredkovaná vnútornou GTPázovou aktivitou Ras-u. Porucha hydrolytickej reakcie je najčastejším biochemickým defektom spojeným s onkogénnymi mutáciami Ras. V prípade mutácie, kóduje proteín, ktorý spôsobuje nekontrolovateľný signál podporujúci rast (Hall et al., 2002).

3.8.4.2 *HER2*

Vytvára proteínové receptory, ktoré sa podieľajú na raste a delení buniek v prsníku. Mnoho ľudí s rakovinou prsníka má amplifikáciu HER2 (Jiang et al., 2012).

3.8.4.3 *Myc*

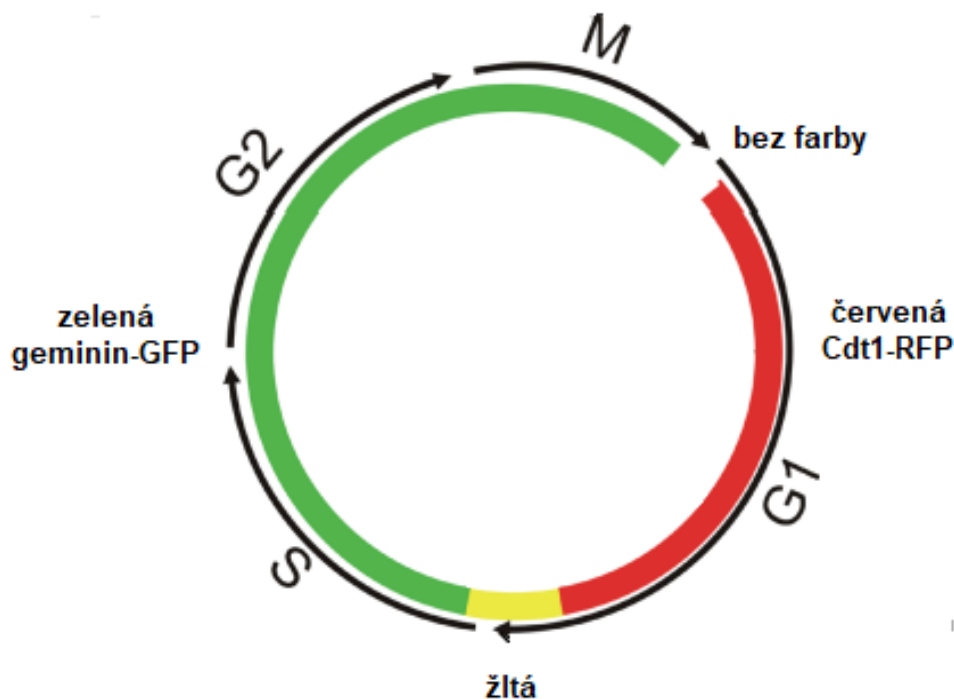
Proteíny Myc sú rodinou transkripčných faktorov, ktoré regulujú rast a vstup do bunkového cyklu. Myc regulujú predlžovanie transkripcie aktívne prepisovaných génov prostredníctvom zapojenia transkripčných elongačných faktorov. Vo fyziologickom stave sú Myc prísne kontrolované transkripčnými aj posttranskripčnými zložkami. Zlyhanie kontroly Myc zintenzívňuje expresiu cieľových génov, ako aj ďalších necieľových génov, čím sa zvyšuje tumorigenéza (Wang, 2021).

3.8.4.4 *Cyklín D*

Bežnou úlohou cyklínu D je deaktivovať nádorový supresor pRb. Po mutácii cyklínu D, nie je schopný vykonávať túto činnosť, a tým dochádza k nekontrolovateľnému rastu buniek (Qie a Diehl, 2020).

3.9 FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)

Fluorescenčný indikátor bunkového cyklu založený na ubikvitinácii, FUCCI systém, je súbor geneticky kódovaných fluorescenčných indikátorov určený na neinvazívne monitorovanie priebehu bunkového cyklu. Je založený na fluorescenčných proteínoch dvoch alebo viacerých farieb, ktoré sú spojené s degradáciou závislou od bunkového cyklu. Bunky exprimujú FUCCI, vyžarujú svetlo jednotlivých farieb v rôznych fázach, čo poskytuje spoľahlivý spôsob monitorovania progresie bunkového cyklu pomocou fluorescenčnej mikroskopie a prietokovej cytometrie (Shirmanova et al., 2021).



Obrázok 11: Dynamická zmena farby FUCCI senzora bunkového cyklu. FUCCI je fluorescenčný, dvojfarebný senzor priebehu bunkového cyklu a delenia živých buniek. Bunky menia farbu z červenej v G₁ fázy na žltú v interfázy G₁/S a na zelenú vo fázach S, G₂ a M. Geminín a Cdt1 sú fúzované s jedným proteínom a preto dochádza k exprimácii v špecifických bodoch bunkového cyklu (Prevzaté a upravené podľa: Held a Larson, 2017).

3.10 Význam Cdt1

Licenčný faktor pre zahájenie DNA replikácie (Cdt1) dáva signál na tvorbu proteínu, ktorý je dôležitý pre replikáciu DNA pred deleníím bunky. Proteín produkovaný týmto génom je jedným zo skupiny prereplikačného komplexu. Zložky tohto komplexu sa v niekoľkostupňovom procese viažu

na začiatkové oblasti replikácie DNA. Keď sa prereplikačný komplex pripojí na počiatok, replikácia sa môže začať na tomto mieste. Tento prísne regulovaný proces, licencovanie chromozómu, pomáha zabezpečiť, aby sa replikácia DNA uskutočnila len raz za jedno delenie bunky a aby sa bunky mohli deliť (Ballabeni, 2013).

3.11 Význam geminínu

Geminín je kritický faktor pri replikácii DNA a diferenciácii buniek v rôznych populáciách buniek. Jeho inhibičná interakcia s Cdt1 zabezpečuje kontrolované načasovanie replikácie DNA a následne genomickú stabilitu v aktívne sa množiacich bunkách. Geminín interaguje s transkripčnými faktormi a epigenetickými regulátormi, aby riadil programy génovej expresie (Patmanidi et al., 2017).

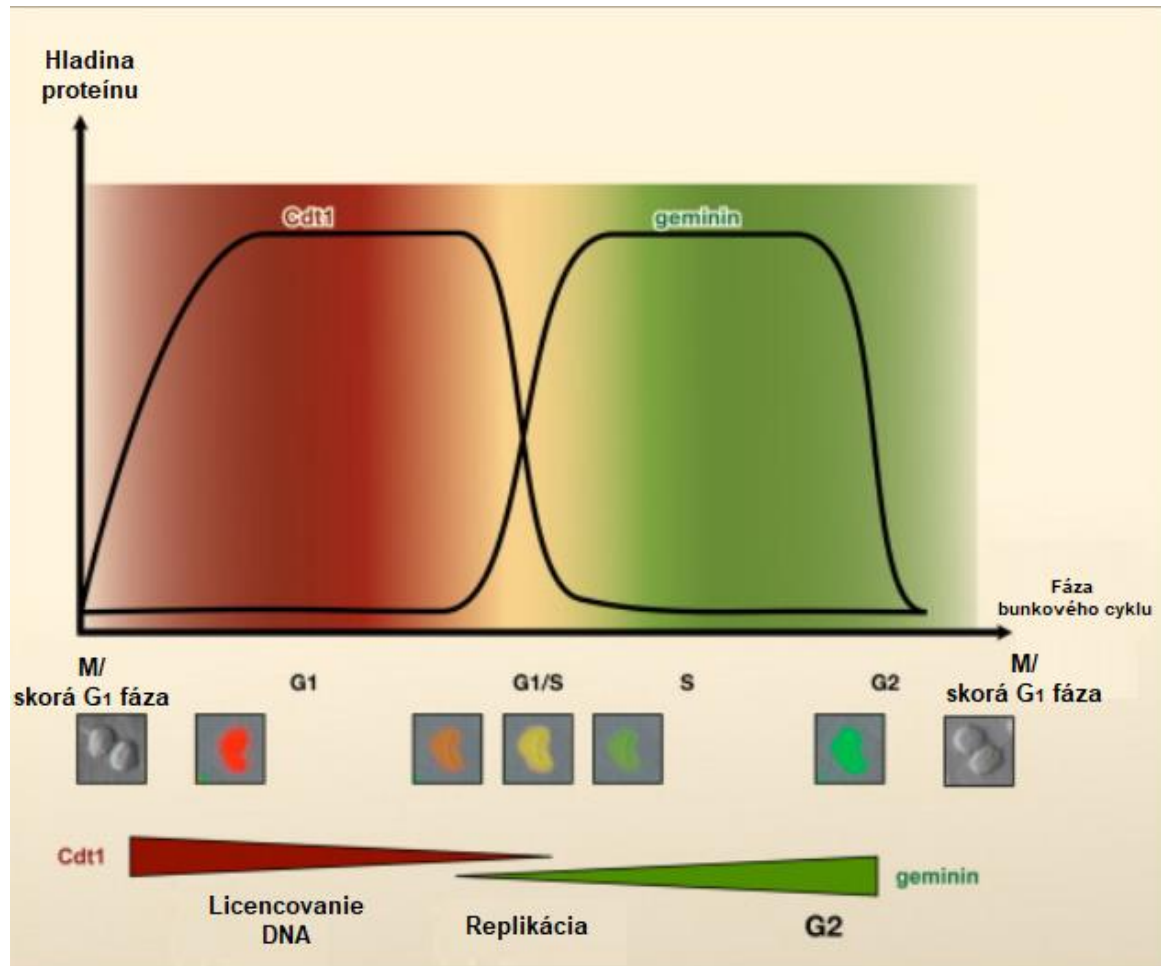
V priebehu G_1 fázy sa komplex rozpoznávania počiatkov (ORC) viaže na počiatky replikácie ako substrát pre replikačné faktory Cdc6 a Cdt1. Väzba Cdt1 indikuje naviazanie proteínového komplexu na udržiavanie mikrochromozómov (MCM) na chromatin, ktorý tvorí pre-RC. Po začatí replikácie DNA sa geminín, ktorého expresia je vysoká počas S fázy, viaže na Cdt1, zatiaľ čo proteíny MCM a Cdc6 sú fosforylované aktivitou cyc/CDKs a vytlačené z chromatinu. Dochádza k exportu Cdc6 do cytoplazmy a geminín zostáva vo väzbe s Cdt1, pokiaľ sa DNA nereplikuje. Vo fáze G_2 sa na chromatin viaže len ORC a hladina geminínu sa udržiava vysoká, aby sa zaistilo, že nežiaduca expresia Cdc6 a Cdt1 nepovedie k neštandardnému naviazaniu. Degradácia geminínu je zabezpečená komplexom podporujúcim anafázu na prechode metafáza/anafáza. Defosforylácia a aktivácia replikačných faktorov po ukončení mitózy umožňuje začatie nového cyklu replikácie DNA (Montanari et al., 2006).

3.12 Vzájomné ovplyvnenie Cdt1 a geminínu

Kontrola replikácie DNA je ovplyvnená licenčným faktorom Cdt1 a jeho inhibítorom geminínom. Cdt1 a geminín majú opačné účinky na replikáciu DNA, ich množstvo kolíše počas bunkového cyklu v inverznom zastúpení (Arias a Walter, 2007).

Proteín Cdk1 dosahuje vrchol vo fáze G_1 tesne pred začiatkom replikácie DNA a prudko klesá po začiatku fázy S (Nishitani et al., 2004; Liu et al., 2004). Naopak, hladina geminínu je vysoká počas S a G_2 fázy, ale nízke počas neskorej mitózy a G_1 fázy. Vzájomná expresia Cdt1 a geminínu je ovplyvnená postupnou aktiváciou ubikvitinových ligáz APC/ C^{Cdh1} a SCF^{Skp2} (Arias a Walter, 2007). Ubikvitinová ligáza APC/C smeruje geminín v G_1 fázy na proteazomálnu degradáciu, aby umožnila tvorbu prereplikačného komplexu. Od S po G_2 fázu je geminín stabilizovaný v dôsledku

inhibície ubikvitín ligázového komplexu APC/C, čo zabezpečuje inhibíciu tvorby predreplikačného komplexu. Počas M fázy je geminín stabilizovaný, fosforyláciou je zabránená degradácia sprostredkovaná komplexom APC/C ubikvitín ligáza. Ubikvitínová ligáza SCF^{Skp2} aktívna počas S a G₂ fázy a zameriava sa na degradáciu Cdt1 (Tsunematsu et al., 2013).



Obrázok 12: Vizualizácia fáz bunkového cyklu. V dôsledku syntézy červeného reportérového konštrukt Cdt1 dochádza k vytvoreniu červenej farby. Následne je konštrukt Cdt1 degradovaný. V tomto čase sa začína hromadiť zelený reportérový konštrukt geminín. Tieto dva procesy vytvárajú škálu sfarbenia buniek a menia sa v priebehu bunky od červenej v G₁ fázy do žltej v G₁/S fázy až po zelenú v G₂ a M fázach. Na konci M fázy sa z dôvodu degradácie geminínu bunka stáva na krátke obdobia bezfarebná (Prevzaté a upravené podľa: Méchali a Lutzmann, 2008).

3.13 Cytostatiká a ich mechanizmus účinku

Cytostatiká sú liečivá používané na blokovanie rastu rakovinových buniek. Ovplyvňujú metabolizmus buniek počas bunkového cyklu, inhibujú delenie a reprodukciu buniek. Cytostatiká nemajú lokálny účinok, ale pôsobia v celom organizme. Predovšetkým pôsobia na bunky, ktoré rastú veľmi rýchlo. Cytostatiká majú karcinogénne, mutagénne a teratogénne účinky (Resnik a Resnik,

2018). Nižšie uvedené látky boli vybraté v tejto práci k analýze bunkového cyklu pri nenádorovej bunkovej línii BJ a nádorovej bunkovej línii HCT-116.

Interkalačný účinok doxorubicínu spôsobuje vloženie aromatická časť molekuly medzi pár báz, čo vedie k štrukturálnym zmenám DNA a narušenie opráv DNA sprostredkovaných topoizomerázou II. Dochádza k zastaveniu bunkového cyklu v G₂/M fáze (Thorn et al., 2011). Druhý účinok doxorubicínu je zvýšenie expresie receptora smrti Fas a posilňuje aktiváciu kaspáz na podporu vnútrobunkovej apoptickej signalizácie, urýchľuje tým navodenie apoptózy (Kim et al., 2009).

Topoizomerázové DNA inhibítory ako je etoposid spôsobujú jednovláknové a dvojvláknové zlomy DNA inhibíciou topoizomerázy, enzýmu ktorý indukuje prechodné dvojvláknové zlomy. V prípade, že nedôjde k ich oprave môžu viesť k bunkovej smrti (Muslimović et al., 2009). Zastavenie bunkového cyklu v G₂/M fáze je spôsobené p21, ktorý inaktivuje komplex cyklín B/Cdk1 a nakoniec zabraňuje vstupu do mitózy (Nam et al., 2010).

Nadmerná exprimácia receptorov rastových faktorov, ktoré stimulujú proliferáciu buniek a rast nádoru sa dá potlačiť inhibítormi preotínkináz, ktoré zabraňujú signálizácii vyvolanej rastovými faktormi (Rang et al., 2019). Inhibícia aktivity komplexu cycD/CDK4/6 palbociclibom inhibuje fosforyláciu Rb, čím blokuje progresiu z fázy G₁ do fázy S bunkového cyklu (Goel et al., 2018).

Liečivo RO-3306 sa viaže na ATP a pôsobí ako ATP-kompetitívny inhibítor, čo vedie k inhibícii CDK1 a zastaveniu bunkového cyklu vo fázy G₂/M. (Vassilev et al., 2006). RO-3306 posilňuje signalizáciu p53 na podporu apoptózy (Kojima et al., 2009).

Zabránenie priebehu mitózy a indikácia apoptózy v nádorových bunkách môže byť spôsobená látkami viažucimi sa na β -tubulíny ako je nocodazol. Táto látka naruša dynamiku zostavenia a rozstavania mikrotubulov, zasahuje do tvorby mitotického vretienka (Weber-Schöndorfer a Schaefer, 2007). Taktiež môže byť zabránené deleniu buniek urýchľovaním tvorby mikrotubulov a zamedzením ich oddelenia, čo vedie k abnormálnej reorganizácii mikrotubulov pôsobením liečiva vincristín (Liu et al., 2017). Obe látky pôsobia na zastaveniu bunkového cyklu vo fázy G₂/M.

Väzbou liečiva bortezomibu na proteazóm a jeho následnou inhibíciou dochádza k zabráneniu degradácie proapoptických faktorov. Tým dochádza k aktivácii programovanej bunkovej smrti prostredníctvom kaspáz (Masaki, 2016). Bortezomib zastavuje prechod bunkového cyklu z fázy G₂ do M (Tamura et al., 2010). Systém FUCCI interaguje s proteazómom bunky aj bez ovplyvnenia liečivom, preto nemusí byť pozorovaný výsledok špecifický pre dané liečivo.

4 PRAKTICKÁ ČASŤ

4.1 MATERIÁL A METÓDY

4.1.1 Požité bunkové línie

Na experiment boli použité dve adherentné bunkové línie. Nenádorová bunková línia BJ (ATCC), bunky fibroblastov odvodené z predkožky a bunková línia nádorová HCT116 (Horizon) izolovaná z hrubého čreva dospelého jedinca s rakovinou hrubého čreva. Obe bunkové línie boli uchovávané v zamrzenej forme. Pre účely izolácie plazmidu bola použitá bakteriálna kultúra nesúca plazmid pBOB-FastFUCCI-Puro (pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro bol dar od Kevina Brindla a Duncana Jodrella; plazmid Addgene # 86849 ; <http://n2t.net/addgene:86849> ; RRID:Addgene_86849)

4.1.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

Agarosa SERVA pre DNA elektroforézu (Biotech), Denaturovaný etanol (VWR), Dimetyl sulfoxid (DMSO) (AppliChem), Fetálne hovädzie sérum (FBS) (Gibco), KCl (Lach:ner), KH₂PO₄ (Lach:ner), Lyzačný pufer s proteinázou K (Sigma-Aldrich), Na₂HPO₄ · 12 H₂O (Lach:ner), NaCl (MikroChem), Polybrén (Merck), Puromycín (Aldrich), TrypLE (Gibco)

Použité liečivá

bortezomib (Sigma-Aldrich), doxorubicín (Pharmagen), etoposid (TEVA), nocodazol (Sigma-Aldrich), palbociclib (Sigma-Aldrich), RO-3306 (Sigma-Aldrich), vinkristín (TEVA)

Použité súpravy

NucleoBond® PC EF plasmid DNA purification kit (Macherey-Nagel); jetPRIME® Versatile DNA/siRNA transfection reagent (Polyplus)

Použité roztoky

Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Lonza), Gel loading dye orange (6X) (New England Biolabs), GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10 000X in Water (Biotinum), GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), McCoy médium (Lonza), Tris-borát-EDTA pufer (TBE) (Duchefa Biochemie)

4.1.2.1 Príprava roztokov

Kompletné rastové médium: Do tekutého kultivačného média bolo pridané FBS a roztok antibiotík. Konečná koncentrácia FBS v médiu bola 10 %. Médium bolo prefiltrované a uchované v chlade a tme.

Fosfátový pufer 10x: V 800 ml destilovanej vody bolo rozpustených 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 2g KH_2PO_4 . Hodnota pH bola upravená pomocou 1M NaOH alebo HCl na 6,8-7,2. Následne bola pridaná voda na doplnenie do 1 l. Pufer bol sterilizovaný v autokláve a uchovávaný pri 4 °C.

Fosfátový pufer 1x: Fosfátový pufer 10x koncentrovaný bol zriedený destilovanou vodou na PBS 1x koncentrovaný. Prípravný roztok bol uchovávaný v chlade a tme.

Zamrazovacie médium: Do FBS bez antibiotík bolo pridané DMSO v pomerme 13:1. Zamrazovacie médium bolo prefiltrované a uchovávané v mrazničke.

Polybrénové médium: Polybrén bol pridaný k rastovému médiu v pomere 1:1000, s nadbytkom média. Takto pripravený roztok bol ihneď použitý pri lentivírusovej transdukcii.

4.1.3 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy (Scaltech), Analyzátor životaschopnosti buniek Vi-Cell™XR (Beckman Coulter), Aparatúra pre horizontálnu elektroforézu (BioRad), Automatický konfokálny mikroskop Cell Voyager CV8000 (Yokogawa), Centrifuga 5810R (Eppendorf), CO₂ inkubátor Heracell™ 150i (Thermo Fisher Scientific), Fluorescenčný mikroskop s vybavením AXIO Observer.D1(Zeiss), Fluorometer Qubit 2.0 (Invitrogen), Inverzný mikroskop IX51 (Olympus) , Kvapalinový dávkovač Echo 550 (LabCyte), Laminárny box MSC Advantage (Thermo Fisher Scientific), Minicentrifúga PCV-6000 (Grant Instruments) , Mraznička Ultra-Low Temperature Freezer Innova U725

(Eppendorf), Multidrop Combi (Thermo Scientific), Pipetor (Hirschmann) , Vodný kúpeľ WNB (Memmert)

Ostatné laboratórne vybavenie: kultivačné nádoby, jednorazové pipety, automatické pipety so špičkami, odmerné valce, mikrotitračné doštičky, stojan na skúmavky, plastové skúmavky, centrifugačné skúmavky, mikroskúmavky, Petriho misky, jednorazové ihly, injekčne striekačky

4.2 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.2.1 Rozmrazenie buniek

Kompletne rastové médium bolo predhriate vo vodnom kúpeli na 37 °C. Mikroskúmavka so zamrazenou bunkovou líniou bola rýchlo rozmrazená a následne rozsuspendovaná v centrifugačnej skúmavke s predhriatým médiom. Skúmavka s médiom a bunkami boli centrifugované 5 minút pri 1500 otáčkach za minútu. Supernatant bol odstránený do odpadu a k peletu bolo pridané malé množstvo média. Pelet tvorený bunkami bol rozsuspendovaný a kvantitatívne prenesený do kultivačnej fľaše s kultivačným médiom. Kultivačná nádoba bola umiestnená do inkubátora a ponechaná do ďalšieho dňa.

4.2.2 Pasážovanie, počítanie a kultivácia

Rastové médium EMEM a McCoy, TrypLE a PBS boli predhriate vo vodnom kúpeli na 37 °C. Kultivačná nádoba s bunkami bola vybratá z CO₂ inkubátora a bola vizuálne skontrolovaná farba rastového média. Pod svetleným mikroskopom bola kontrolovaná konfluencia buniek a prípadná kontaminácia.

Staré vyčerpané rastové médium bolo odstránené do odpadu. Následne bola monovrstva buniek dvakrát premytá roztokom PBS, ktoré bolo taktiež odobraté do odpadu. Na takto premytú bunkovú kultúru bol nanesený TrypLE a kultivačná fľaša bola umiestnená na 3 – 5 minút do inkubátora. Po uplynutí času bolo oddelenie buniek skontrolované pod mikroskopom. Rastové médium s bunkami bolo prenesené do centrifugačnej skúmavky a sцентрифugované 5 minút pri 1400 otáčkach za minútu. Po centrifugácii bol supernatant odstránený do odpadu a k peletu bolo pridaných 5 ml rastového média. Pomocou pipety bol pelet rozsuspendovaný. Následne bol spočítaný počet buniek pomocou analyzátora Vi-CELL.

Na základe množstva buniek boli bunky prenesené do kultivačnej nádoby. V prípade bunkovej kultúry HCT-116 bol rast buniek rýchly, a teda množstvo buniek bolo ponechané na pomer 1:8, z čoho väčšiu časť tvorilo médium. Bunková kultúra BJ rástla pomalšie a pri nízkej koncentrácii buniek dochádzalo k degradácii buniek. Pomer BJ k rastovému médiu bol daný na 1:2. Takto pasážované bunky boli vložené do inkubátora. Obe bunkové kultúry boli štandardne pasážované trikrát za týždeň.

4.2.3 Zamrazenie buniek

Pripravené zamrazovacie médium bolo predhriate na 37 °C. Bunky boli skontrolované pod mikroskopom a bolo spočítané ich množstvo pomocou analyzátora Vi-CELL. Z analyzovaného počtu buniek bolo vypočítané množstvo buniek na jednu skúmavku určenú na kryoprezerváciu. Konečný počet v jednej skúmavke bol 6×10^6 buniek/ml.

Médium s bunkami bolo scentrifugované na 1500 otáčkach 5 minút. Následne bol supernatant odstránený do odpadu a pelet po rozsuspendovaní v médiu. Vypočítané množstvo buniek bolo prenesené do označenej kryoprezervačnej skúmavky a doplnené zmrazovacím médiom do celkového objemu 1 ml. Takto pripravené bunky na zamrazenie boli okamžite prenesené do mrazničky s teplotou -80 °C.

4.2.4 Testovanie na prítomnosť mykoplazmy

Po vizuálnom skontrolovaní buniek bola z kultivačnej fľaše zoškrabaná vzorka. Bunková suspenzia bola odobratá a odstredená 5 minút pri 1500 otáčkach za minútu. Supernatant bol odstránený do odpadu a k peletu bol pridaný lyzačný pufer s proteínázou K. Suspenzia bola prenesená do mikrocentrifugačnej skúmavky. Vzorka bola inkubovaná pri 37 °C. Následne bola prevedená analýza na dôkaz mykoplazmy pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

4.2.5 Izolácia plazmidu

Bakteriálna kultúra nesúca plazmid pBOB Fast FUCCI bola rozmrazená a scentrifugovaná na 5000 g 5 minút. Supernatant bol odstránený do odpadu. Pelet tvorený bakteriálnymi bunkami bol opatrne rozsuspendovaný v pufri S1-EF + RNáza A. K suspenzii bol pridaný pufer S2-EF. Bolo prevedené jemné premiešanie otáčaním skúmavky a následná inkubácia pri laboratórnej teplote 3 minúty.

K suspenzií bol pridaný predom vychladený tlmivý roztok S3-EF a okamžité premiešanie prevracaním skúmavky až do vytvorenia homogénnej suspenzie a vytvorenie snehobieleho flokulantu. Nasledovala inkubácia 5 minút na ľade. Týmto pracovným postupom bola prevedená lýza buniek.

Kolóna bola premytá pomocou pufru N2-EF. Pretečený pufer bol odstránený do odpadu. Skladaný filter bol navlhčený pufrom N2-EF a vložený do lievika. Na navlhčený filtračný papier bol nanesený lyzát a odtekajúca kvapalina bola zachytávaná. Kolóna bola dvakrát premytá pufrom N3-EF a následne dvakrát pufrom N4-EF. Pretekajúca kvapalina bola odstránená do odpadu.

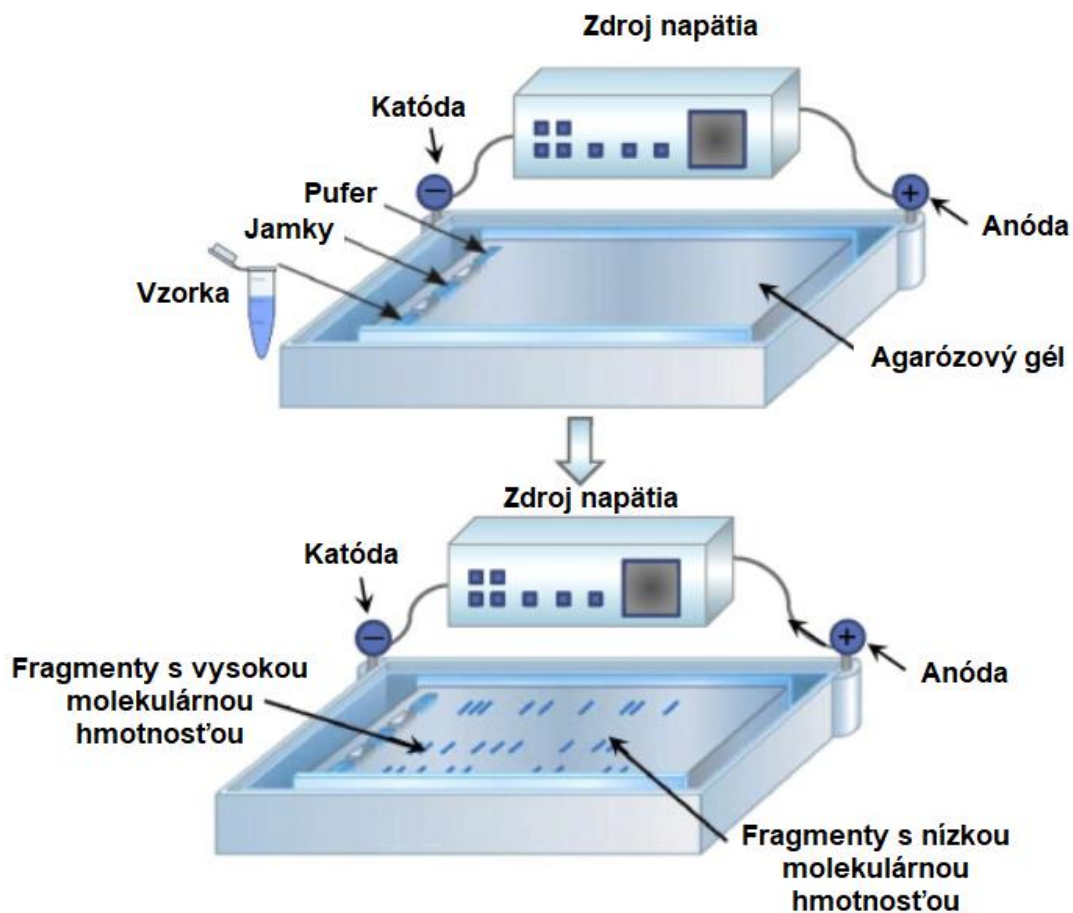
Plazmidová DNA bola eluovaná pomocou pufru N5-EF. Následne bol pridaný izopropanol izbovej teploty na vyzrážanie eluovanej plazmidovej DNA. Bolo prevedené jemné premiešanie a centrifugácia 15 000 g 30 minút a teploty 12 °C. Po centrifugácii bol supernatant opatrne odstránený do odpadu. K peletu bol pridaný 70% etanol laboratórnej teploty. Po krátkom premiešaní nasledovala centrifugácia pri 15000 g 10 minút. Etanol bol odstránený a pelet bol ponechaný na vysušenie pri izbovej teploty. Vysušený pelet bol rozpustený v H₂O-EF za stáleho miešania. Bol stanovený výťažok plazmidu pomocou UV spektrofotometrie a bola prevedená analýza integrity plazmidu pomocou agarózovej elektroforézy.

4.2.6 Agarózová elektroforéza

Vzorka plazmidu bola nariadená na koncentráciu 350 ng/μl. Takto pripravená vzorka bola krátko scentrifugovaná. 1 μl vzorky plazmidu bol zmiešaný s gel loading dye 6X a TBE 1x. Nasledovalo premiešanie a krátka centrifugácia.

Na prípravu agarózového gélu bola navážená agaróza, ktorá bola rozpustená počas zahrievania v TBE pufre. Na elektroforézu bola použitá koncentrácia gélu 1 %. Po vychladnutí agarózy bolo pridané farbivo GelRef s následným premiešaním. Gél bol naliaty do vaničky na gél s hrebienkom na jamky. Takto nanesený gél bol ponechaný až do stuhnutia. Po stuhnutí bol gél prenesený do elektroforetickej vane a zaliaty TBE pufrom. Hrebienok bol vybratý.

Do prvej jamky bol nanesený marker molekulárnej hmotnosti, do ďalšej jamky bol nanesená analyzovaná vzorka plazmidu. Elektroforetická vaňa bola pripojená na zdroj napätia a bola spustená elektroforéza pri napätí 90 V a čase 1,5 hodiny.



Obrázok 13: Elektroforetická aparátúra. Separačný gél sa nachádzal vo vani s pufrom. Vzorky boli nanesené do jamiek na gél pri kladne nabitom konci - anóde, cez gél prechádzal elektrický prúd a dochádzalo k separácii jednotlivých bandov vzorky.

4.2.7 Určenie minimálnej inhibičnej koncentrácie

Bunkové línie HCT-116 a BJ boli spasáňované, spočítané a bol vypočítaný pomer ich riedenia. Potrebný počet buniek HCT-116 bol 200 000 na 2 ml. V prípade BJ bolo potrebných 140 000 buniek na 2 ml. Množstvo buniek bolo prepočítaných na 12 jamiek doštičky s objemom 1,5 ml v každej jamke. Po vypočítaní a nariadení bolo do každej jamky napipetované 1,5 ml vzniknutej suspenzie. Takto pripravená suspenzia buniek na doštičkách bola vložená do inkubátora na 24 hodín.

Na druhý deň bola pripravená sada skúmaviek. Do každej bolo napipetované médium a antibiotikum puromycín v rôznom pomere. Po napipetovaní puromycínu a rastového média bol roztok krátko scentrifugovaný.

Doštička s bunkami bol vybratá z inkubátora, skontrolovaná pod mikroskopom. Médium z každej jamky bolo odobraté a následne bol prevedený oplach pomocou 1x PBS. Do príslušných

jamiiek boli napipetované roztoky o rôznych koncentráciách puromycínu. Nasledovala inkubácia 72 hodín a po uplynutí času bola zhodnotená minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) pre každú bunkovú líniu.

4.2.8 Transfekcia

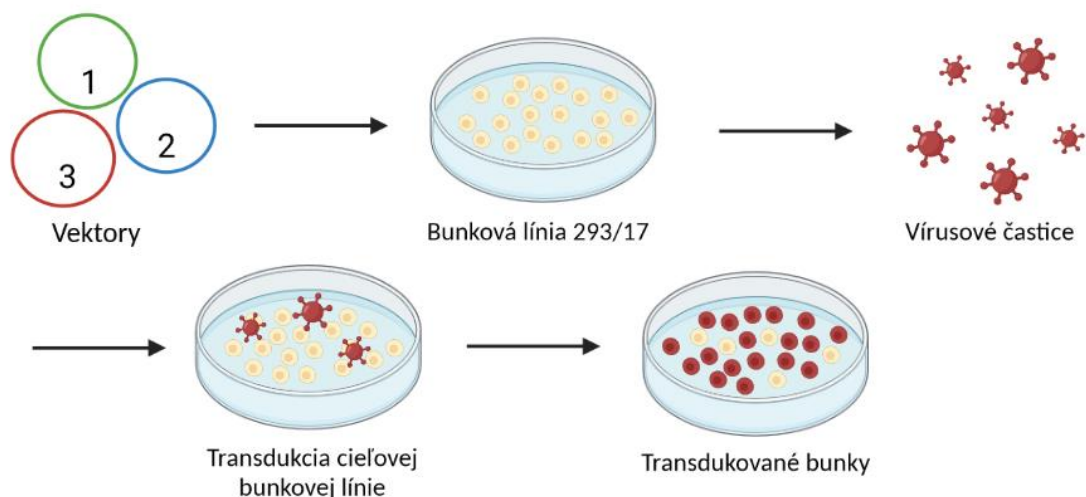
Bola pripravená transfekčná zmes, ktorá obsahovala plazmidy pMD2G, psPAX2 a pBOB. Takto pripravená zmes spoločne s rastovým médiom bola nanosená na bunkovú kultúru HEK-293T. Následne prebehla inkubácia a na ďalší deň bolo vymenené médium. Po dosiahnutí takmer 100% konfluencie buniek bolo médium odobraté a scentrifugované 5 minút pri 1 500 otáčkach za minútu. Supernatant bol prefiltrovaný cez filter. Získaný roztok obsahujúcu lentivírusy bol nanosený na bunkovú líniu HCT-116 alebo BJ.

4.2.8 Transdukcia

Doska na lentivírusovú transdukciu bola pripravená rovnakým spôsobom ako pri určovaní MIC. Na jednu jamku bolo potrebné 1,5 ml bunkové suspenzie obsahujúcej 200 000 buniek na 2 ml v prípade bunkovej línie HCT-116 alebo 140 000 buniek na 2 ml v prípade bunkovej línie BJ. Táto suspenzia bola napipetovaná do jamiiek dosky a bola vložená na 24 hodín do inkubátora.

Po 24 hodinách bola doska s bunkami skontrolovaná pod mikroskopom. Z jamiiek doštičky bolo odobraté médium a bunky boli premyté pomocou 1x PBS. Do každej jamky bolo pridané polybrénové médium a lentivírusy. S rozmrazenými vírusmi bolo potrebné pracovať rýchlo, aby nedošlo k ich deštrukcii, taktiež bolo nutné pracovať za prísnych bezpečnostných podmienok v laboratóriu s laminárnym boxom biosafety level 3. Doska s danými pomermi buniek a média obsahujúceho lentivírusy bola vložená do inkubátora.

Nasledovala výmena média po inkubácii pomocou rastového média s puromycínom a ďalšia inkubácia. Na ďalší deň boli bunky skontrolované pod fluorescenčným mikroskopom. Bunky, ktoré sa vznášali, boli usmrtené. Bunkovej kultúre HCT-116 riedenej v pomere 1:10 a bunkovej kultúre BJ riedenej v pomere 1:5 a 1:10 bolo odstránené médium a nasledovalo premytie 1x PBS. Na takto prichystané bunky bol nanosený TrypLE s následnou inkubáciou na uvoľnenie buniek. Bunky boli prenesené do kultivačnej nádoby s rastovým médiom obsahujúcim puromycín. Takto prenesené bunky boli umiestnené do CO₂ inkubátora.



Obrázok 14: Lentivírusová transdukcia. Transfekčná zmes obsahujúca vektory, ktoré sú potrebné na výrobu infekčnej vírusovej častice rozdelené do troch komponentov: 1. pMD2G (obaľovací plazmid) 2. psPAX2 (baliaci plazmid) a 3. pBOB (plazmid vlastného záujmu) bola nanosená na bunkovú líniu. Následnou centrifugáciou a filtráciou boli získané lentivírusové častice, ktorými bola prevedená transdukcia bunkovej línie HCT-116 a BJ.

4.2.9 Monoklonálna línia

K bunkám polyklonálnej populácie bolo pridávané antibiotikum puromycín. Tieto bunky boli pozorované na pravidelnej báze pod fluorescenčným mikroskopom. Po čase, keď v kultivačnej nádobe bol dostatočný počet rezistentných buniek voči antibiotiku bol prevedený sortovanie pomocou prietokovej cytometrie. Na mikrotitračnú doštičku bola do každej jamky prenesená iba jedna bunka nesúca reportérové gény. Takto vysortované bunky s požadovanými vlastnosťami boli uchovávané v inkubátore. Po týždni bolo vybratých dvadsať najviac proliferujúcich línií pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Tieto línie boli z mikrotitračnej doštičky prenesené na malú kultivačnú nádobu a po dosiahnutí 90% konfluencie prenesené na väčšiu kultivačnú nádobu. S vytvorenými monoklonálnymi líniami sa ďalej pracovalo v experimentoch.

4.2.10 Príprava buniek na testovanie látok pomocou multidropu

Bunky boli vybraté z inkubátora a boli skontrolované pod mikroskopom. Následné bolo odobraté médium. Bunky boli premyté dvakrát pomocou 1x PBS. Na premyté bunky bol nanosený TrypLE a kultivačná nádoba s bunkami bola prenesená do inkubátora po dobu oddelenia buniek. K oddeleným bunkám bolo pridané médium a boli prepipetované. Následne bola suspenzia kvantitatívne prenesená do centrifugačnej skúmavky a scentrifugovaná pri 1500 otáčkach za minútu

po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol odobratý supernatant a k peletu bolo pridané médium. Bunky boli spočítané pomocou analyzátoru Vi-CELL. Do skúmaviek o objeme 50 ml boli pripravené suspenzie buniek o požadovanej koncentrácii.

Pred prácou s multidropom si bolo nutné pripraviť suspenzie buniek, etanol, rastové média a destilovanú vodu v skúmavkách. Multidrop bol prichystaný do aktívneho režimu. V nastaveniach bol zvolený formát mikrotitračnej doštičky, požadovaný dávkovací objem a výber jamiek do ktorých boli nanesené bunky. Najskôr bol prístroj prečistený pomocou etanolu, následne bol premytý príslušným rastovým médium a následne boli dávkované samotné bunky o pripravenej koncentrácii. Medzi každým následným dávkovaním bolo prevedené premytie etanolom a rastovým médium a taktiež zmena oblastí pre dávkovanie buniek v nastaveniach prístroja. Po dokončení práce bol prístroj prečistený a nanesené bunky na mikrotitračnej doštičke boli ponechané hodinu pri laboratórnej teplote na usadenie, následne boli vložené do inkubátora.

4.2.11 Testovanie koncentrácie buniek

Pre zistenie vhodnej koncentrácie buniek pre ideálny rast a ďalšie testovanie boli nasadené bunky na mikrotitračnú doštičku pomocou multidrop-u. Bunkové suspenzie boli pripravené o množstvách 1500, 2000, 2500 a 3000 buniek na jamku mikrotitračnej doštičky.

Takto pripravené suspenzie boli nanesené na mikrotitračnú doštičku a pozorované po inkubácii 24 hodín. Následne bola vyhodnotená ideálna koncentrácia buniek pre rast a následné testovanie protinádorových liečiv.

4.2.12 Nanosenie testovaných liečiv

Nanesenie protinádorových liečiv na bunky na mikrotitračnej doštičke bolo prevedené pomocou manipulátora s kvapalinami Echo. Na prácu s týmto prístrojom bolo nutné vypracovať protokol, v ktorom bolo uvedené do ktorej jamky bola dávkovaná látka o danej koncentrácii a množstvo tejto látky.

Vypracovaný protokol bol otvorený v programe prístroja (CherryPick), v nastaveniach bol nastavený formát mikrotitračnej doštičky, bol skontrolovaný rozsah jamiek určených na dávkovanie a do jamiek, ktorým neprislúchala žiadna testovaná látka bolo nastavené dávkovanie DMSO, ktoré zároveň slúžilo ako kontrola. Pred samotným procesom dávkovania boli skontrolované dostatočné objemy testovaných látok na mikrotitračných doštičkách.

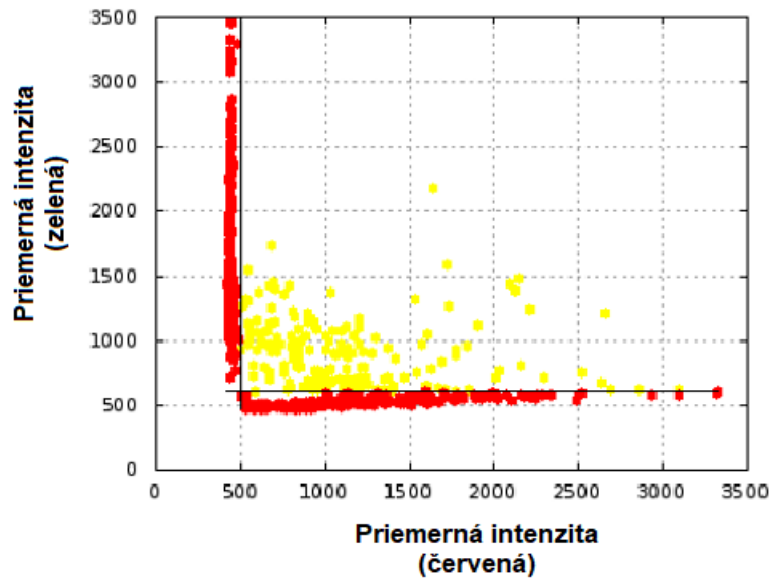
Mikrotitračná doštička s aplikovanou bunkovou suspenziou bola po 24 hodinách inkubácie skontrolovaná pod mikroskopom. Následne bola vložená do prístroja Echo, kde bola taktiež vložená doštička s testovanými látkami. Prístroj naniesol požadované množstvo látky do jamiek s bunkami. Doštička bola následne krátko scentrifugovaná a uchovaná v inkubátore. Po 24 hodinách bolo vyhodnotený účinok testovaných protinádorových látok na bunkových líniiach HCT-116 a BJ.

4.2.13 Analýza fluorescenčnou mikroskopiou

Po inkubácii bunkových línii s naneseným liečivom bola doštička analyzovaná pomocou konfokálneho fluorescenčného mikroskopu, ktorý zhotovil fotky jednotlivých jamiek 384-jamkovej doštičky. Fluorescenčná sonda mAG1 (zelená farba) bola excitovaná pri 488 nm, fotografie boli snímané v rozmedzí 525 až 550 nm. Sonda mKO2 (červená farba) bola excitovaná pri 561 nm, fotografie boli snímané pri 600 až 637 nm. Dĺžka expozície bola nastavená 120 ns. Zväčšenie objektívu bolo 10x v prípade HCT-116 bunkovej línie a 20x pri bunkovej línii BJ. Každá jamka bola snímaná štyrikrát, z ktorých bola vybratá najreprezentatívnejšia snímka. S fotografiou bolo ďalej pracované v analytickom systéme Columbus.

4.2.14 Obrazová analýza

Obrazová analýza zahŕňovala segmentáciu bunkových jadier a meranie intenzity fluorescencie mKO2 (červené sfarbenie) a mAG1 (zelené sfarbenie) vo vybraných jadrách. Pre tento účel boli získané snímky pomocou filtrov pre červený fluorescenčný proteín (RFP) a zelený fluorescenčný proteín (GFP) zlúčené na vytvorenie vzorovej snímky, ktorá bola použitá pri segmentácii jadier. Následne boli pre každý segmentovaný objekt vypočítané morfológické vlastnosti, ako sú plocha, šírka, dĺžka a zaoblenie. Segmentovaná maska bola použitá k meraniu intenzity fluorescencie, a to pre každý proteín sondy FUCCI samostatne na pôvodných snímkach. Vypočítaná intenzita a morfológické vlastnosti boli použité na odfiltrovanie nešpecifických objektov v pozadí a bunkových agregátov. Zostávajúcimi objektmi bola výsledná populácia jadier s vypočítanými vlastnosťami, ako je počet jadier, dĺžka, šírka, zaoblenie a intenzita červenej a zelenej fluorescencie.

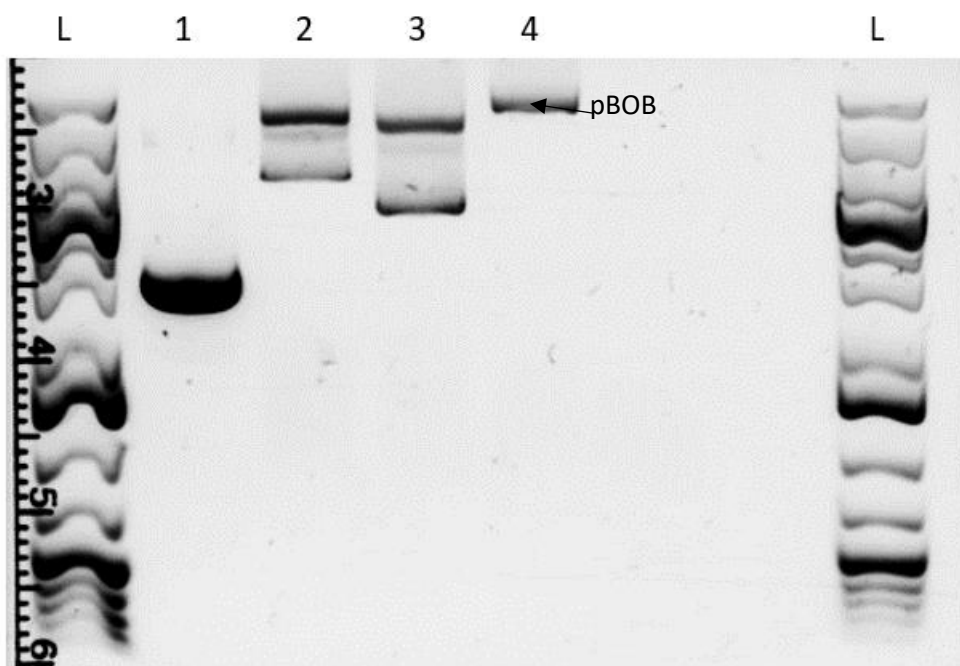


Obrázok 15: Triedenie buniek na základe parametrov fluorescence. Priemerná intenzita zelenej fluorescence pre stanovenie populácie buniek viditeľných červeným sfarbením bola 500, a teda maximálna intenzita zelenej fluorescence pre bunky v G_1 fáze bola nastavená na 520 (zvislá čiara). Pre populáciu buniek viditeľných zeleným sfarbením bola priemerná intenzita červenej fluorescence 480. Bunkám v S/ G_2 /M fáze bola maximálna intenzita červenej fluorescence nastavená na 500 (vodorovná čiara). Tieto hodnoty slúžili ako premenne pre vzorec algoritmu využívaný obrazovou analýzou pre výpočet buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Následne bol pomocou obrazovej analýzy vypočítaný percentuálny podiel buniek v každej fáze bunkového cyklu z výstupných jadier. Výsledky obrazovej analýzy ako priemerné hodnoty na jednu jamku boli exportované do programu Spotfire k interpretácii.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovenie koncentrácie pBOB Fast Fucci

Koncentrácia plazmidu pBOB Fast Fucci bola stanovená pomocou UV spektrofotometrie meraním absorbancie pri 260 nm. Nameraná hodnota bola 394 ng/ml. Následne bola čistota izolovaného plazmidu overená pomocou agarózovej elektroforézy. Elektroforeogram je zobrazený na obrázku 15.



Obrázok 16: Overenie čistoty izolovaného plazmidu pBOB Fast Fucci. Bol použitý marker molekulovej hmotnosti DNA ladder 1 kb plus (L), následne bol pozorovaný band zodpovedajúci pBOB EF1-FastFUCCI-Puro (4) o veľkosti 12350 bp.

5.2 Vyhodnotenie MIC a ideálnych pomerov lentivírusovej transdukcie

Minimálna inhibičná koncentrácia bola stanovená po 72 hodinách kultivácie. Pre obe bunkové kultúry bola určená o hodnote 1 μ l/ml. S touto hodnotu bolo pracované počas celého experimentu.

Rastové médium obsahujúce 1 μ l/ml puromycínu bolo pridané k bunkám lentivírusovej transdukcie. Po 24 hodinách inkubácie boli pozorované bunky v rôznych pomeroch lentivírusov pod fluorescenčným mikroskopom. V prípade bunkovej línie HCT-116 bol vybraný pomer lentivírusov

a média 1:10 ako najideálnejší, čo sa týka rastu, priebehu transdukcie a množstva odumretých buniek. Pri bunkovej línii BJ boli vybraté dva pomery, a to 1:10 a 1:5. Transdukované bunky o vybratých pomeroch lentivírusov boli prenesené na kultivačnú nádobu s rastovým médiom obsahujúcim puromycín o koncentrácii 1 µl/ml.

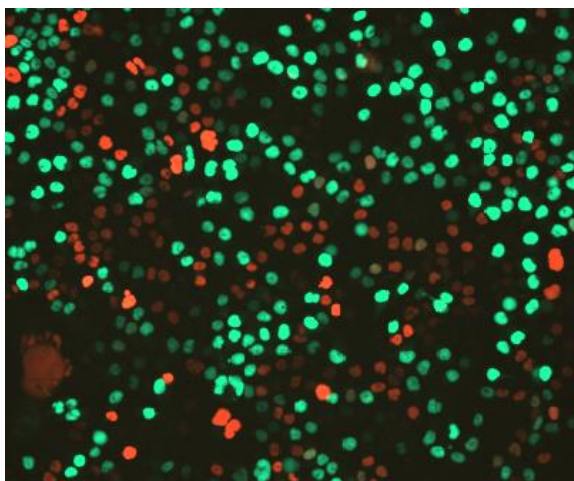
5.3 Vyhodnotenie koncentrácie buniek

Bunkové línie HCT-116 a BJ boli nanosené na mikrotitračnú doštičku o množstvách 1500, 2000, 2500 a 3000 buniek na jednu jamku doštičky. Obrázok 15 zobrazuje bunkovú líniu HCT-116 po 24 hodinách inkubácie pri koncentrácii 3 000 buniek na jamku. Na ďalšie testovanie buniek HCT-116 bola používaná koncentrácia 3 000 buniek na jednu jamku mikrotitračnej doštičky.

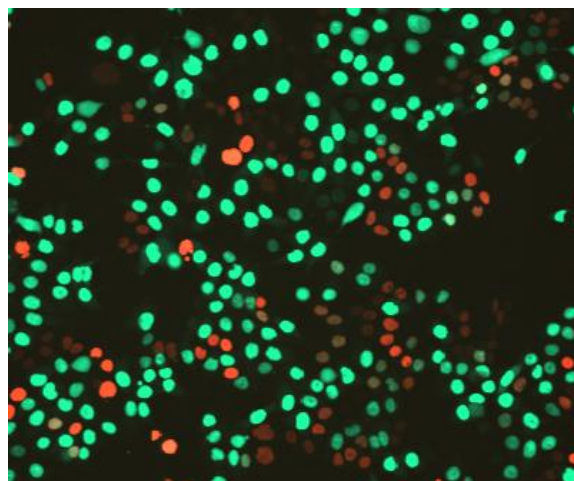
Pri bunkovej línii BJ bolo spomedzi štyroch testovaných koncentrácií vybratá koncentrácia 2 500 buniek na jednu jamku mikrotitračnej doštičky. Obrázok 16 zobrazuje bunkovú líniu BJ po 24 hodinách o koncentrácii 2 500 buniek na jamku.

Tabuľka 1: Počet buniek po 24 hodinách inkubácie pri testovaní štyroch koncentrácií

Použitá koncentrácia buniek	Počet buniek po 24 hodinách inkubácie (bunková línia HCT-116)	Počet buniek po 24 hodinách inkubácie (bunková línia BJ)
1 500	1886	1662
2 000	2610	1986
2 500	3161	2084
3 000	3435	2963



Obrázok 17: Bunková línia HCT-116, **3 000 buniek** na jamku, po 24 hodinách inkubácie, zobrazenie fluorescenčným mikroskopom, zväčšenie 10x



Obrázok 18: Bunková línia BJ, **2 500 buniek** na jamku, po 24 hodinách inkubácie, zobrazenie fluorescenčným mikroskopom, zväčšenie 20x

5.4 Testovanie polyklonálnej bunkovej línie BJ a monoklonálnej línie HCT-116

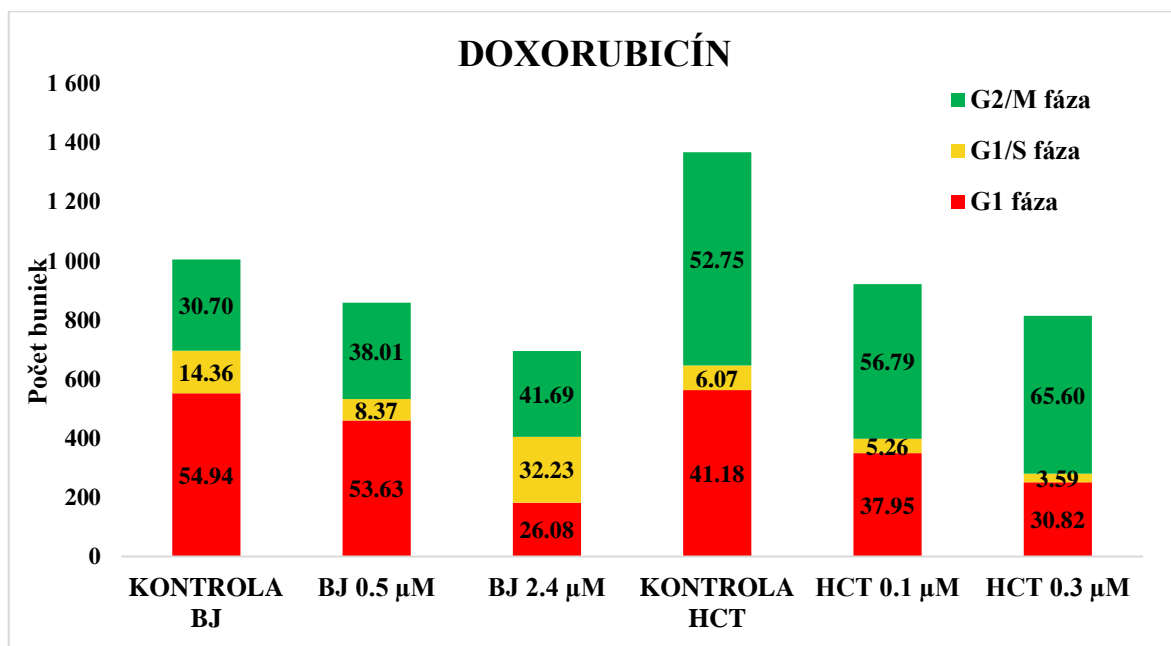
Z monoklonálnej populácie nádorovej bunkovej línie HCT-116 bol vybraný klon 18, ktorý bol ďalej testovaný. Nenádorová bunková línia BJ bola testovaná ako polyklonálna populácia. Po 24 hodinách inkubácie bola k bunkám pridaná testovaná látka a po nasledujúcich 24 hodinách prebehlo vyhodnotenie pomocou fluorescenčnej mikroskopie. Obe línie boli testované siedmimi protinádorovými liečivami. Každá látka bola použitá o dvoch koncentráciách, a to jedenkrát polovica inhibičnej koncentrácie (IC50) a päťkrát IC50. Bolo detegované percentuálne zastúpenie buniek v jednotlivých fázach cyklu. Vyhodnocovala sa G₁ fáza, ktorá sa zobrazovala červenou farbou, G₁/S fáza, ktorá bola vizualizovaná oranžovou farbou a G₂/M fáza, táto fáza bola charakteristická zelenou farbou.

Pôsobenia jednotlivých látok na bunkové línie sú zobrazené na Grafoch 1 až 7. Grafy zobrazujú pozorované 3 fázy bunkového cyklu a percentuálne zastúpenie buniek v nich, jednotlivé farby zodpovedajú vizualizácii pomocou fluorescenčného mikroskopu.

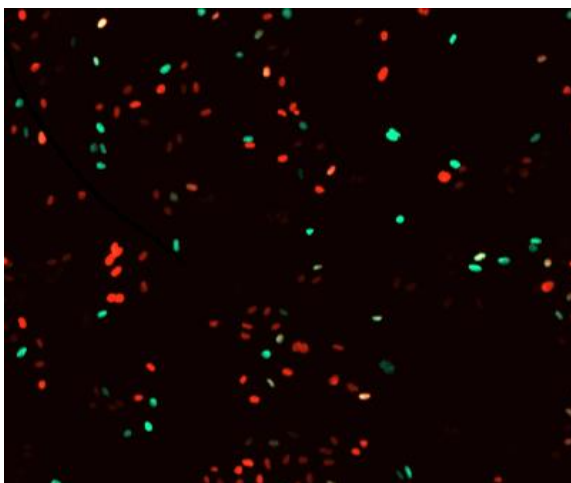
Obrázky boli zhotovené automatickým konfokálnym mikroskopom so zväčšením 10x alebo 20x. Zelená farba (mAG1) bola excitovaná pri 488 nm. Červená farba (mKO2) bola excitovaná pri 561 nm. Čas expozície fotografii bol 120 ms.

Obrázok 17 zobrazuje bunkovú líniu BJ bez ovplyvnenia liečivom, na Obrázku 18 je zobrazená bunková línia HCT-116 taktiež bez ovplyvnenia liečivom. Obrázky 19 až 22 zobrazujú bunkové línie ovplyvnené doxorubicínom. Na obrázkoch 23 až 26 sú zobrazené bunkové línie ovplyvnené liečivom etoposid. Obrázky 27 až 30 zobrazujú bunkové línie ovplyvnené liečivom bortezomib. Bunkové línie ovplyvnené liečivom palbociclib sú zobrazené na Obrázkoch 31 až 34.

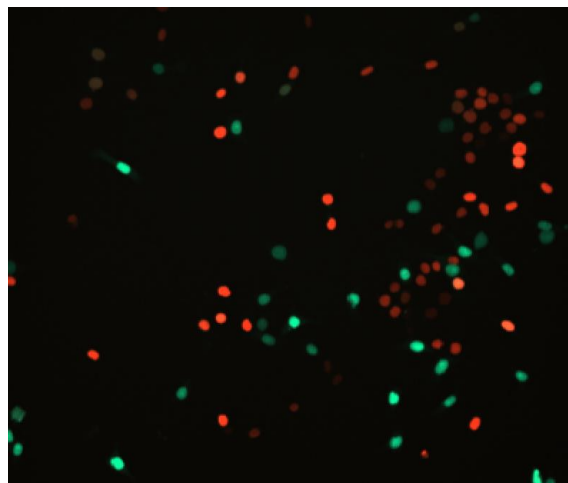
Obrázky 35 až 38 zobrazujú bunkové línie ovplyvnené nocodazolom. Na obrázkoch 39 až 42 sú zobrazené bunkové línie ovplyvnené liečivom RO-3306. Bunkové línie ovplyvnené vincristínom sú zobrazené na Obrázkoch 43 až 46.



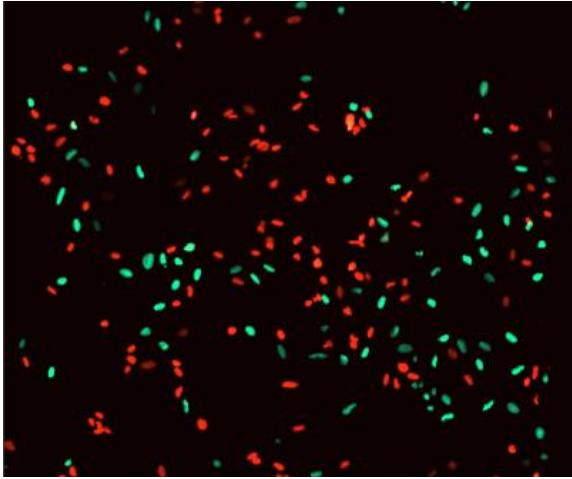
Graf 1: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom doxorubicín o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



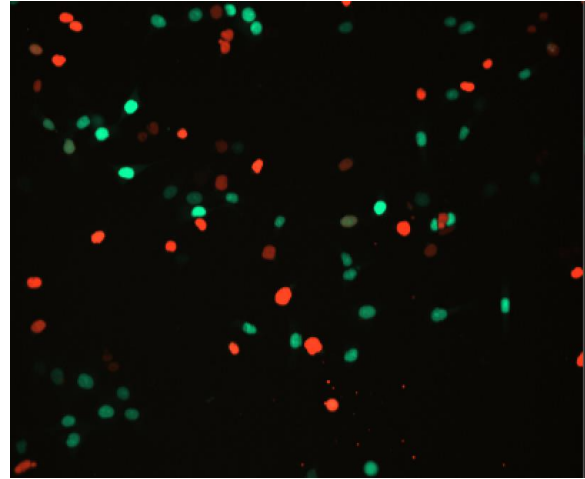
Obrázok 19: Polyklonálna línia BJ, bez ovplyvnenia liečivom, zväčšenie 10x.



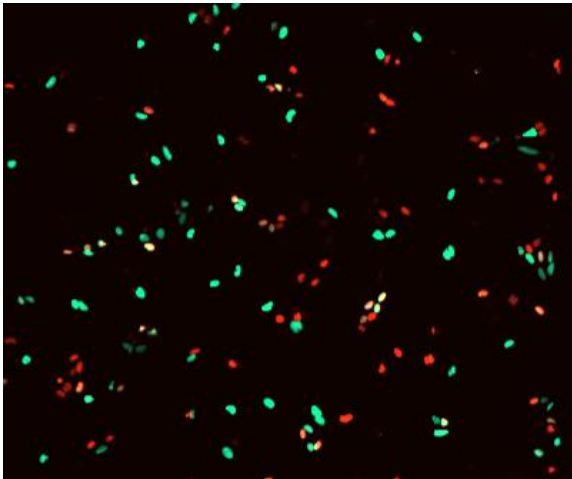
Obrázok 20: Monoklonálna línia HCT-116, bez ovplyvnenia liečivom, zväčšenie 20x.



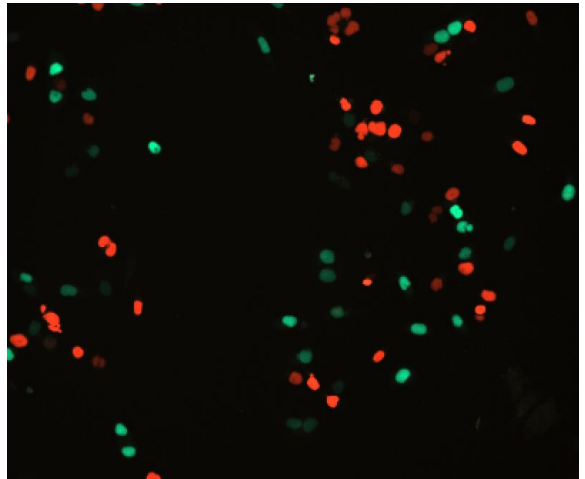
Obrázok 21: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **doxorubicín** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.5 μM**, zväčšenie 10x.



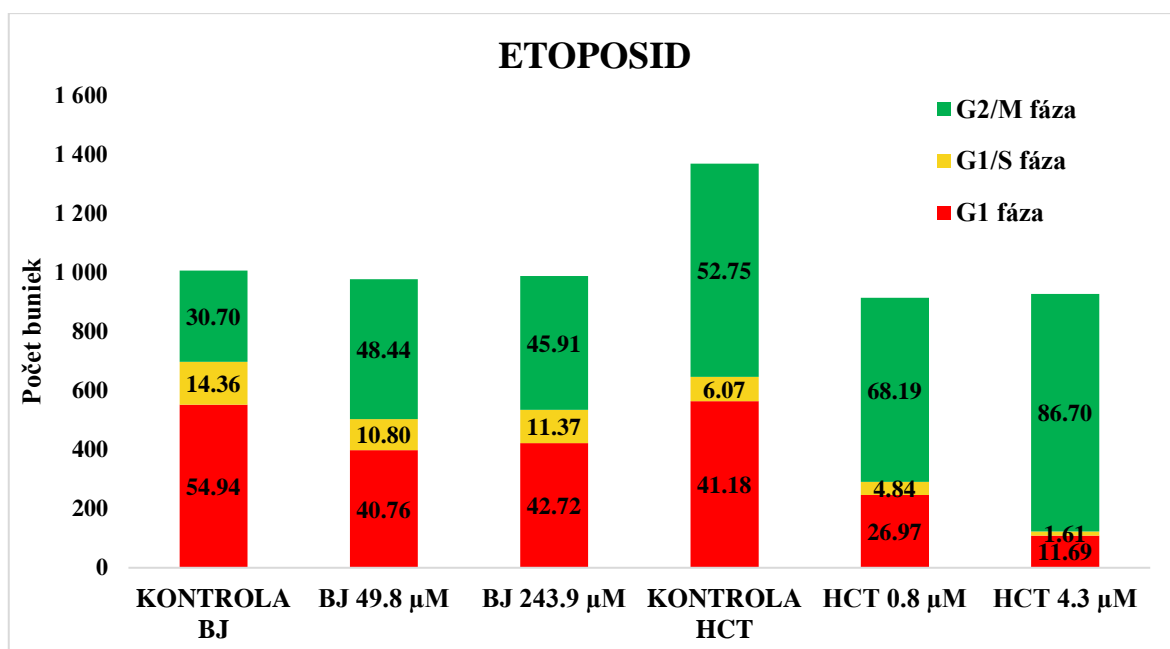
Obrázok 22: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **doxorubicín** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.1 μM**, zväčšenie 20x.



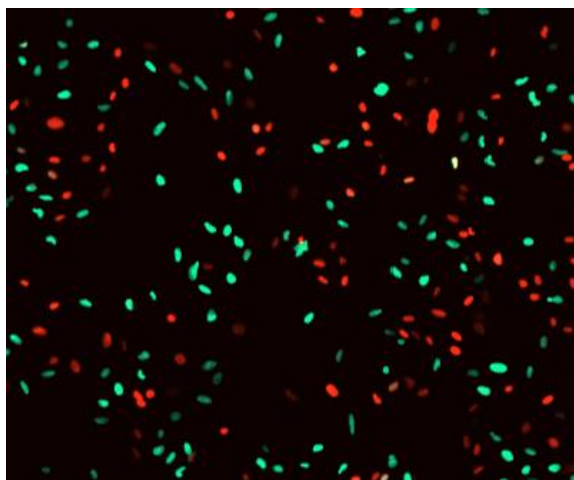
Obrázok 23: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **doxorubicín** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **2.4 μM**, zväčšenie 10x.



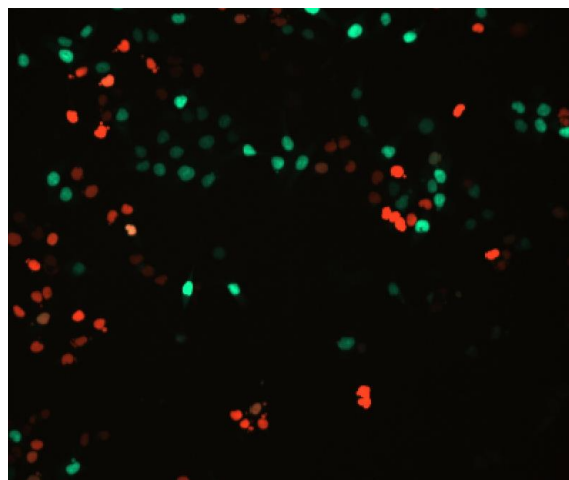
Obrázok 24: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **doxorubicín** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **0.3 μM**, zväčšenie 20x.



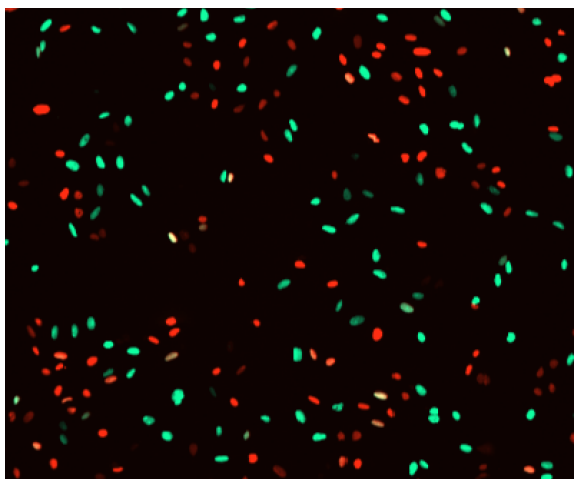
Graf 2: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom etoposid o dvoch koncentráciách (1x IC₅₀ a 5x IC₅₀). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



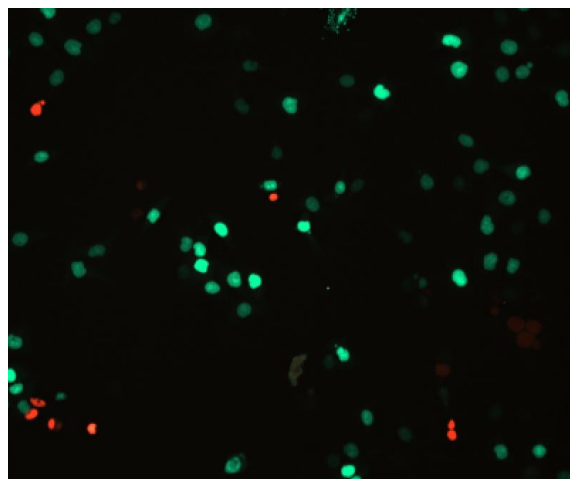
Obrázok 25: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom etoposid o koncentracii 1x IC₅₀, čo zodpovedá 49.8 µM, zväčšenie 10x.



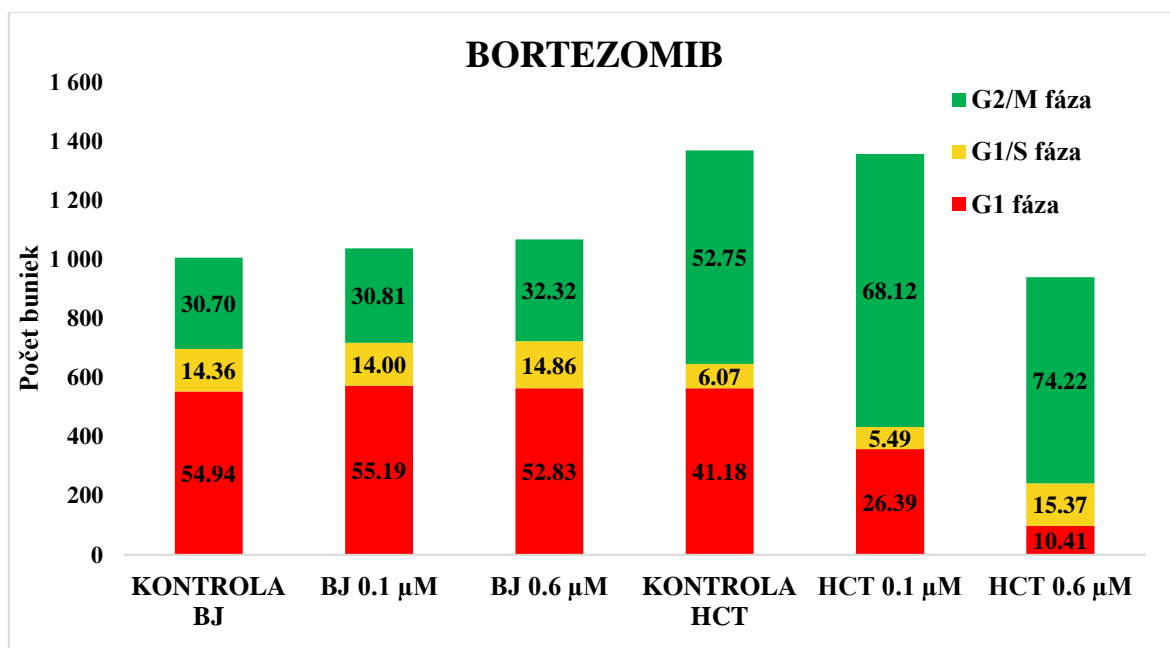
Obrázok 26: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom etoposid o koncentracii 1x IC₅₀, čo zodpovedá 0.8 µM, zväčšenie 20x.



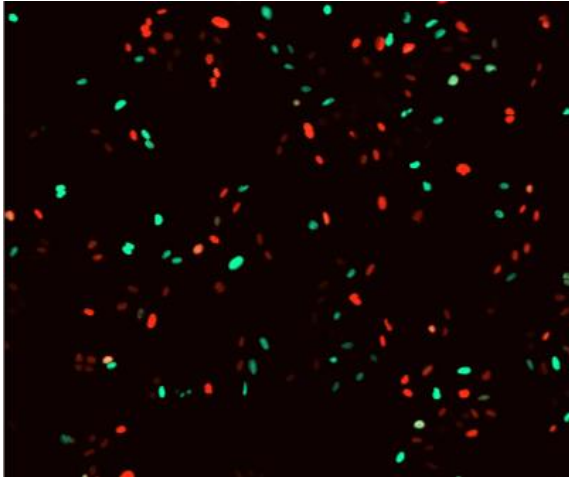
Obrázok 27: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom etoposid o koncentracii 5x IC 50, čo zodpovedá 243.9 μM, zväčšenie 10x.



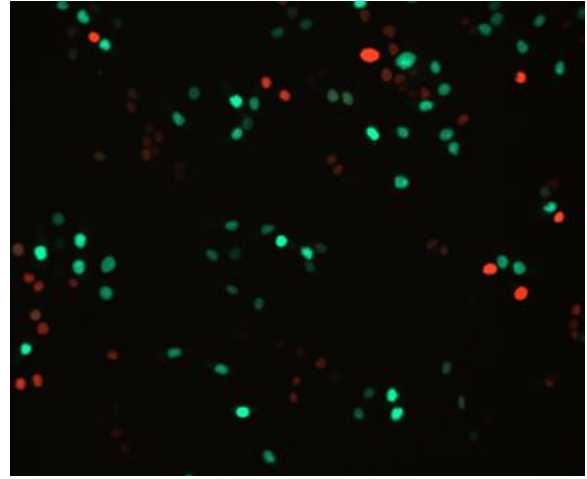
Obrázok 28: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom etoposid o koncentracii 5x IC 50, čo zodpovedá 4.3 μM, zväčšenie 20x.



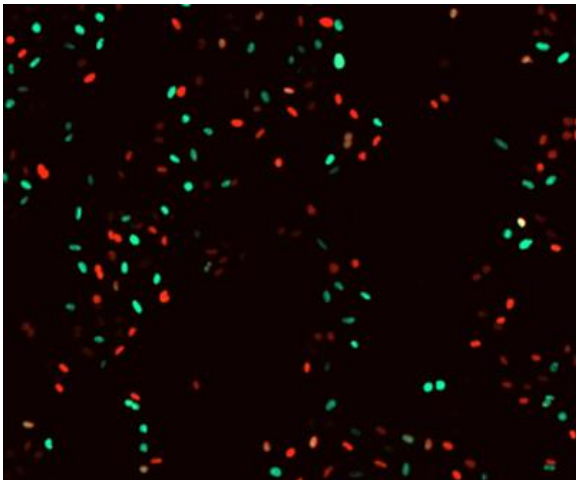
Graf 3: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom bortezomib o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



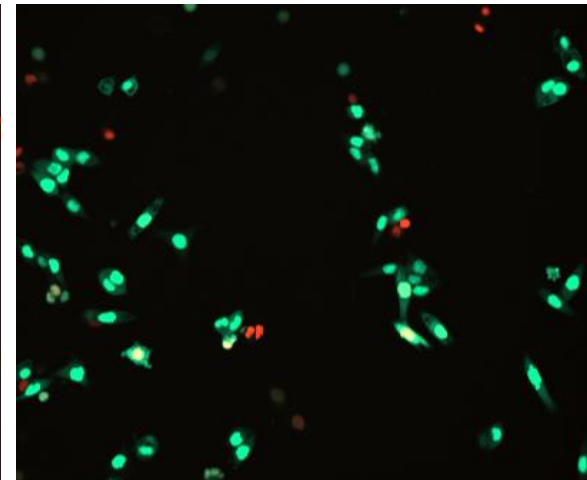
Obrázok 29: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **bortezomib** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.1 μM**, zväčšenie 10x.



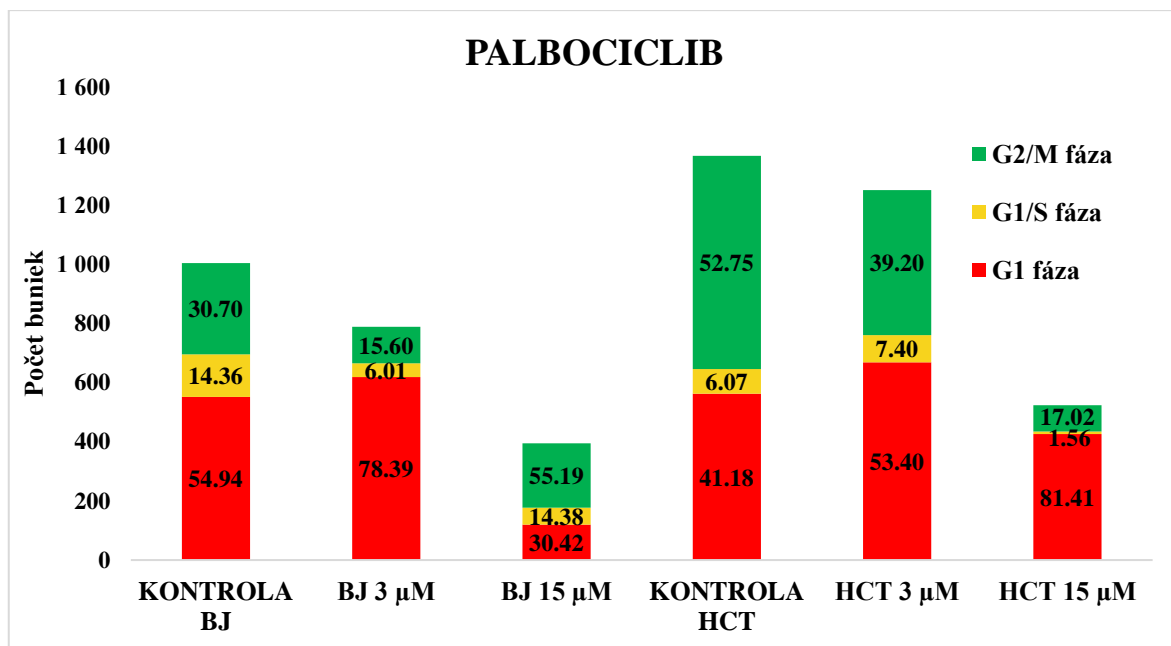
Obrázok 30: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **bortezomib** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.1 μM**, zväčšenie 20x.



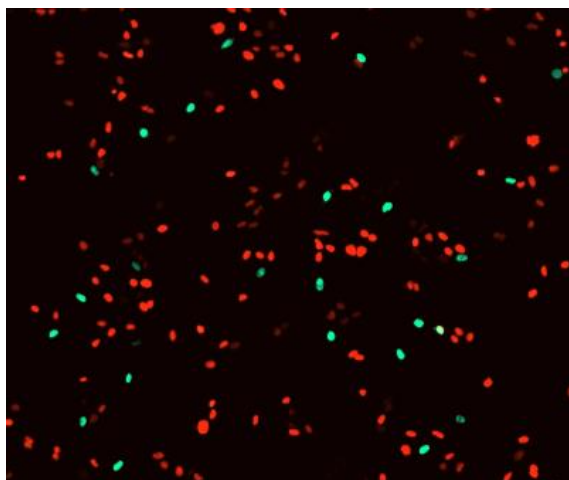
Obrázok 31: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **bortezomib** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **0.6 μM**, zväčšenie 10x.



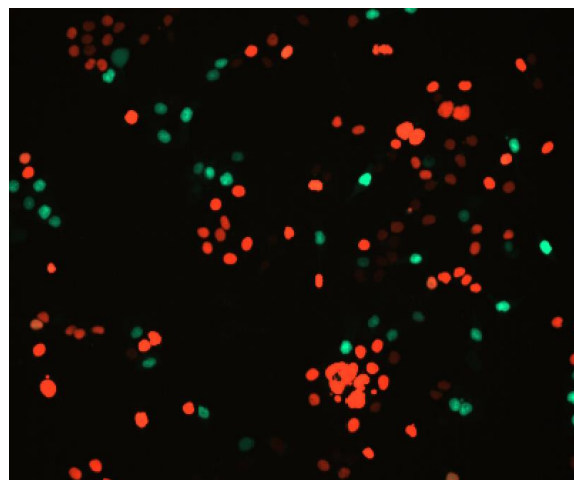
Obrázok 32: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **bortezomib** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **0.6 μM**, zväčšenie 20x.



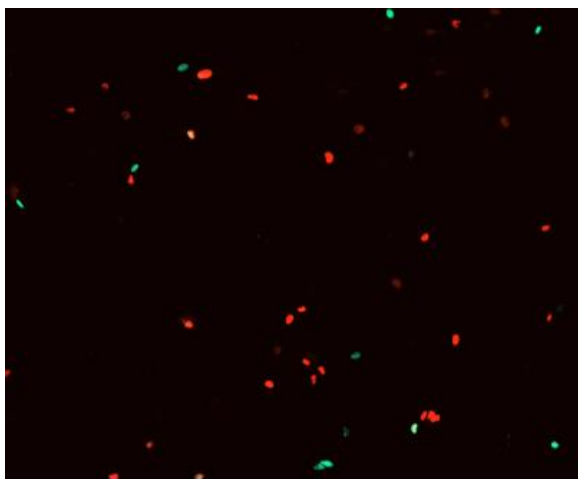
Graf 4: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom palbociclib o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



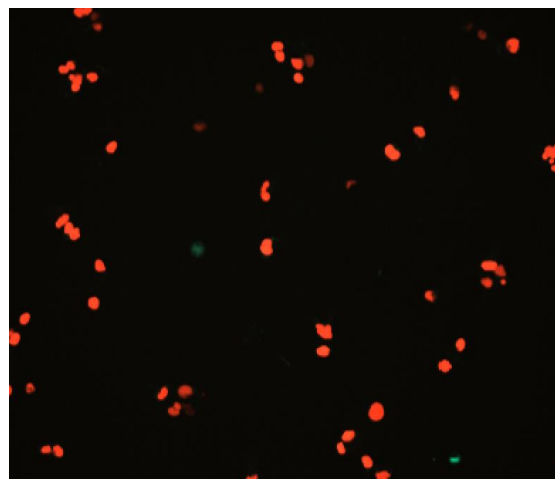
Obrázok 33: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **palbociclib** o koncentracii 1x IC 50, čo zodpovedá 3 μ M, zväčšenie 10x.



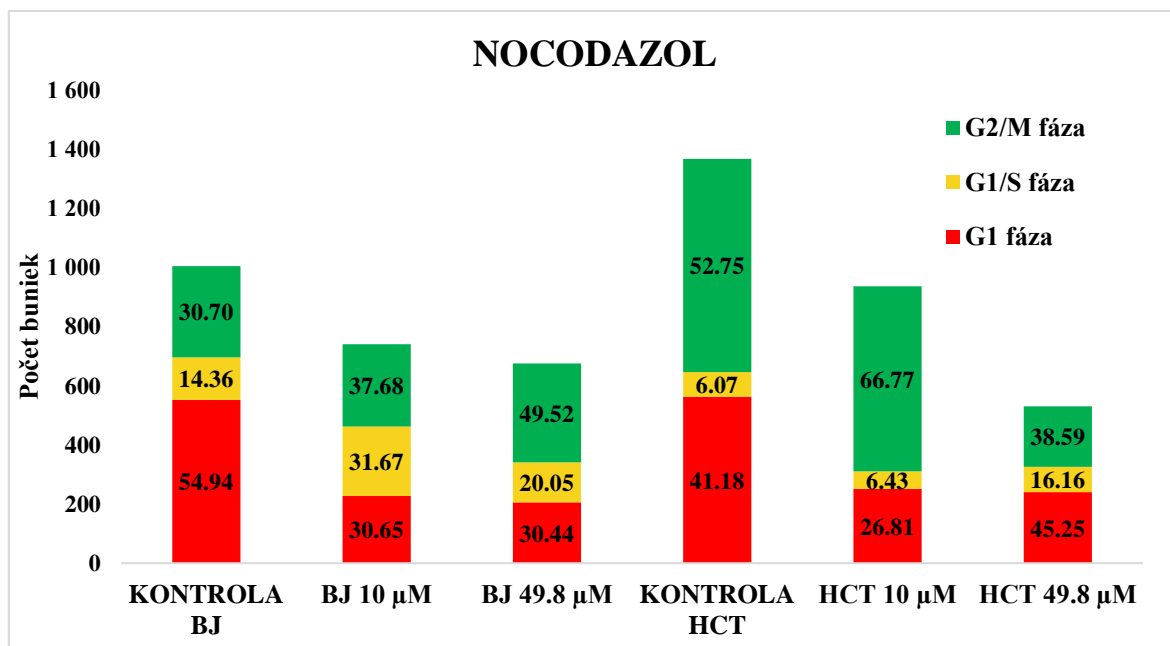
Obrázok 34: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **palbociclib** o koncentracii 1x IC 50, čo zodpovedá 3 μ M, zväčšenie 20x.



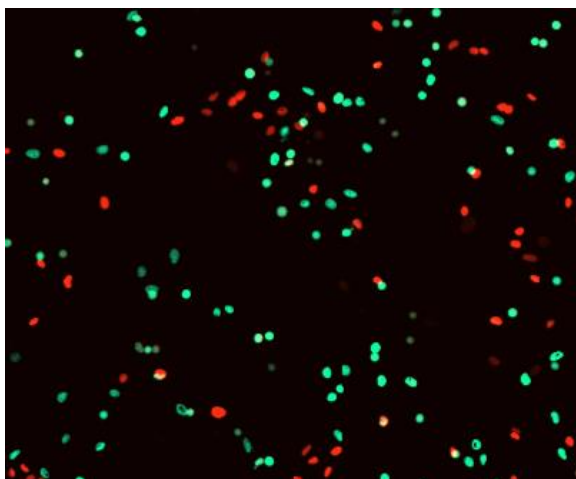
Obrázok 35: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **palbociclib** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **15 μM**, zväčšenie 10x.



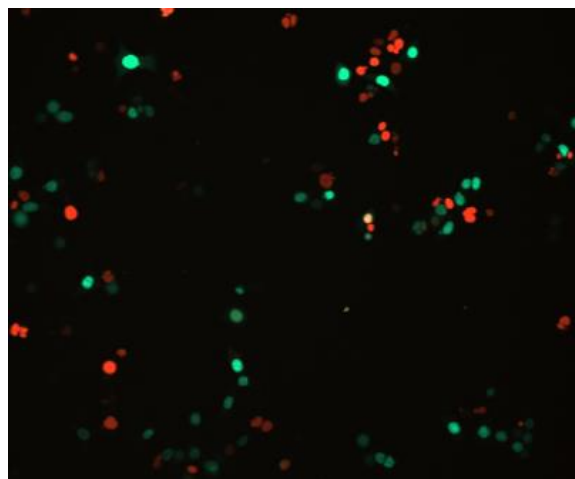
Obrázok 36: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **palbociclib** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **15 μM**, zväčšenie 20x.



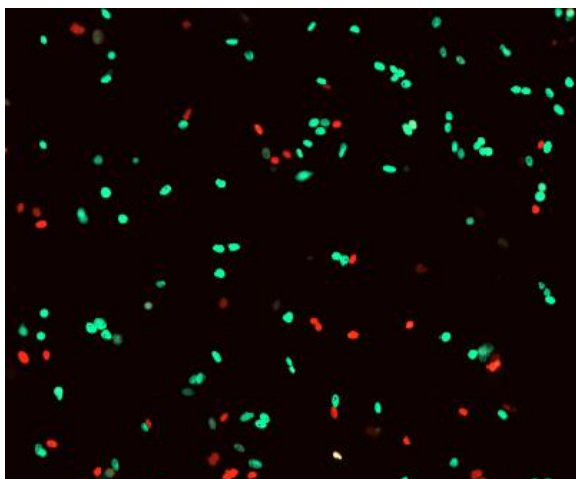
Graf 5: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom nocodazol o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



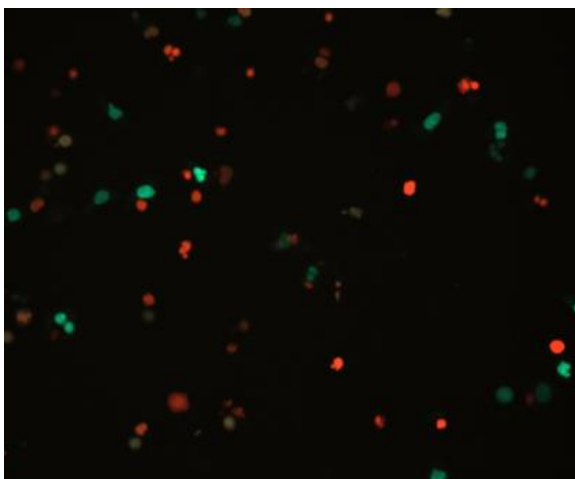
Obrázok 37: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **nocodazol** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **10 μM**, zväčšenie 10x.



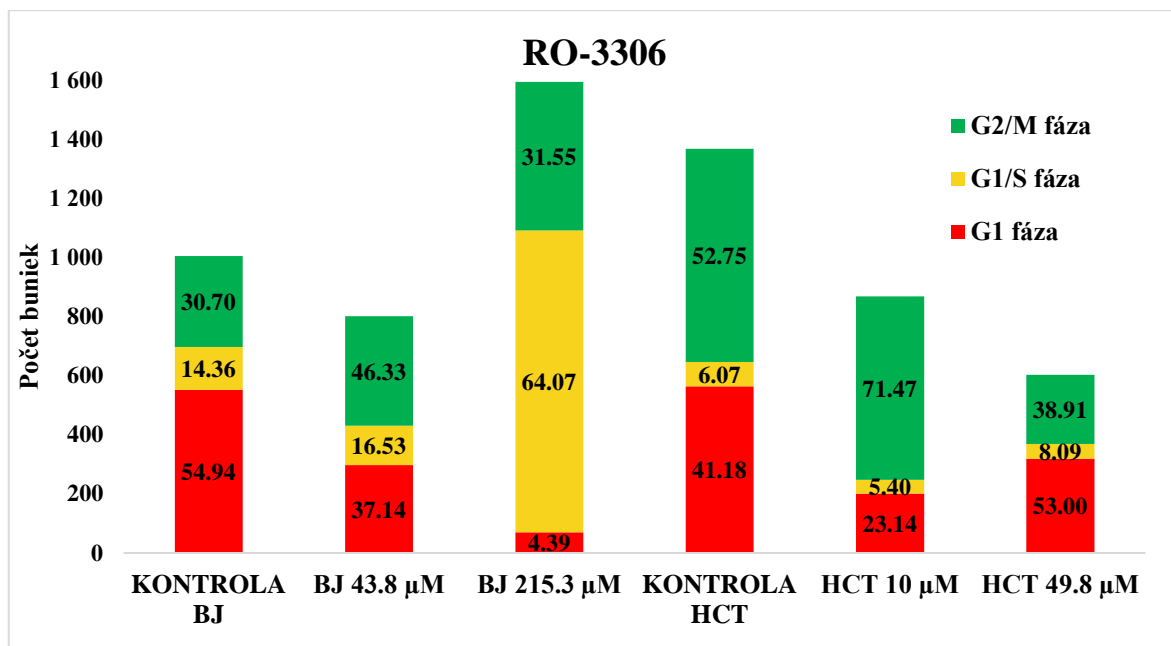
Obrázok 38: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **nocodazol** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **10 μM**, zväčšenie 20x.



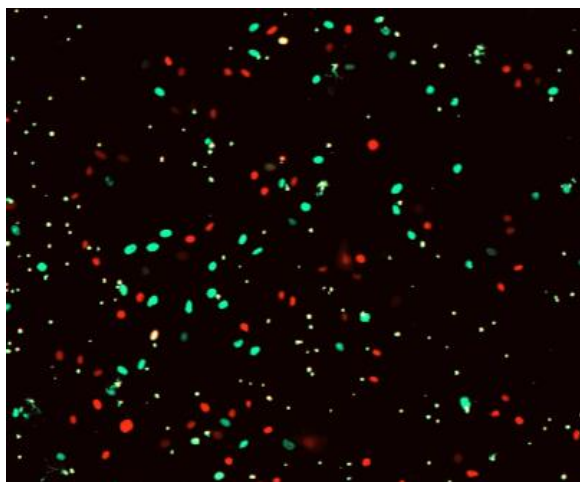
Obrázok 39: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **nocodazol** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **49.8 μM**, zväčšenie 10x.



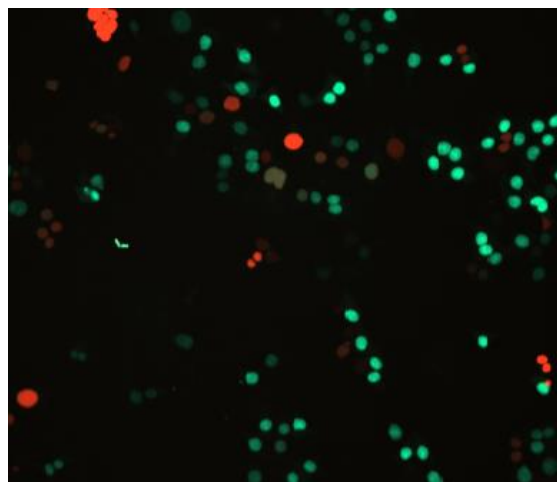
Obrázok 40: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **nocodazol** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **49.8 μM**, zväčšenie 20x.



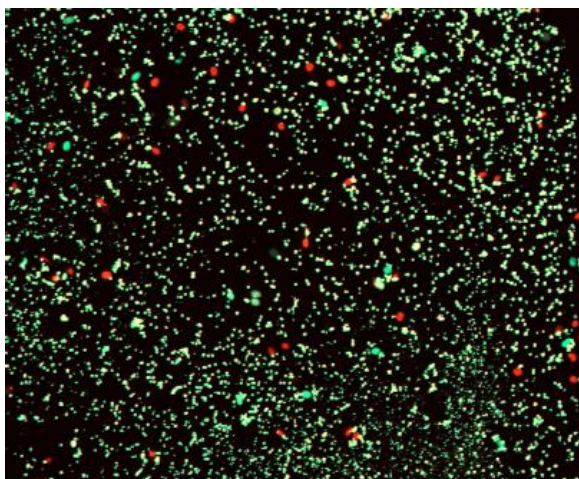
Graf 6: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom RO-3306 o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



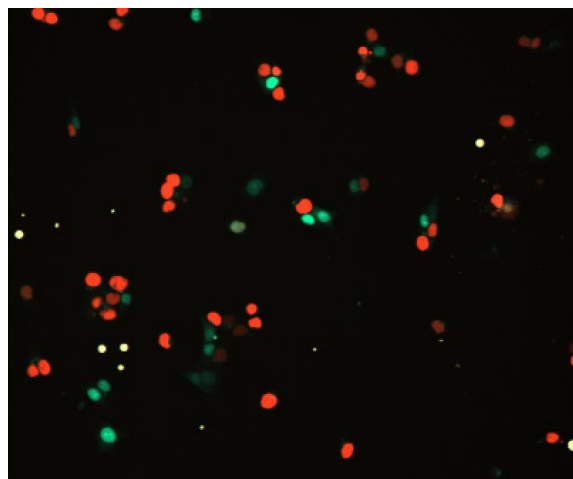
Obrázok 41: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom RO-3306 o koncentracii 1x IC 50, čo zodpovedá 43.8 μM, zväčšenie 10x.



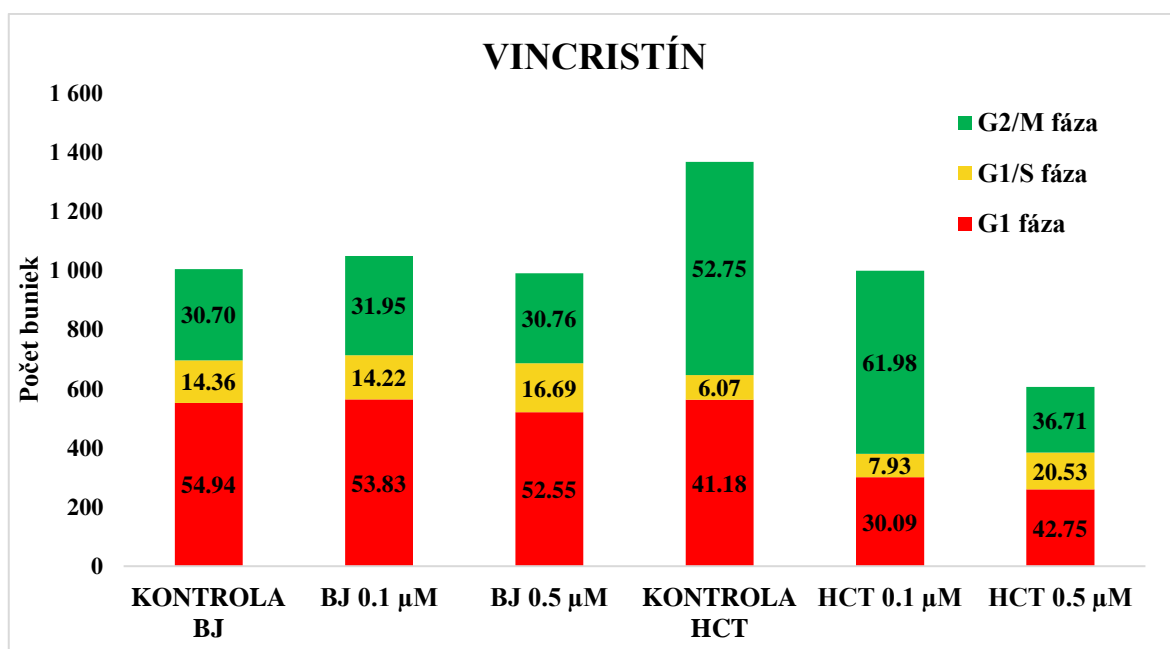
Obrázok 42: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom RO-3306 o koncentracii 1x IC 50, čo zodpovedá 10 μM, zväčšenie 20x.



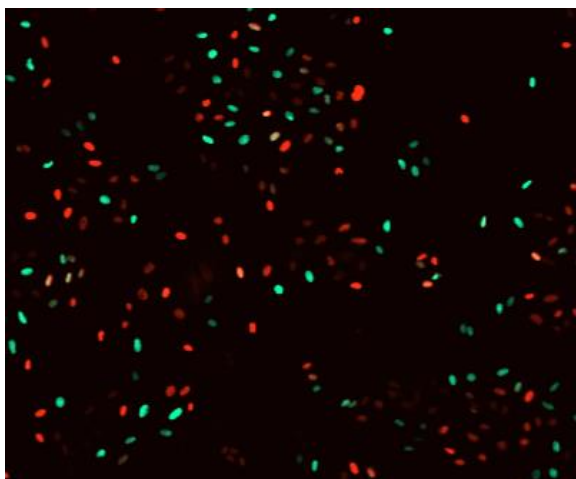
Obrázok 43: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom RO-3306 o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá 215.3 μM , zväčšenie 10x.



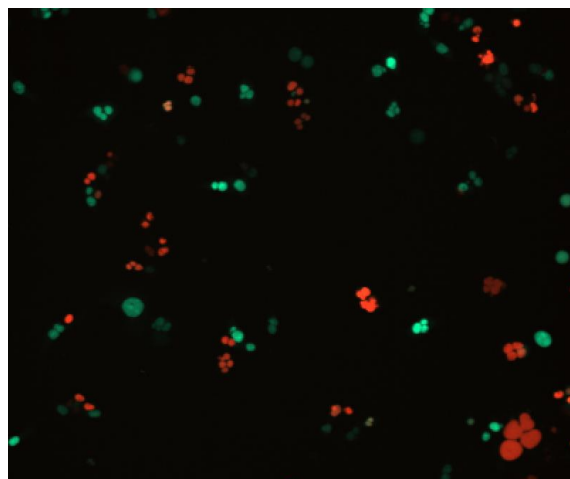
Obrázok 44: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom RO-3306 o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá 49.8 μM , zväčšenie 20x.



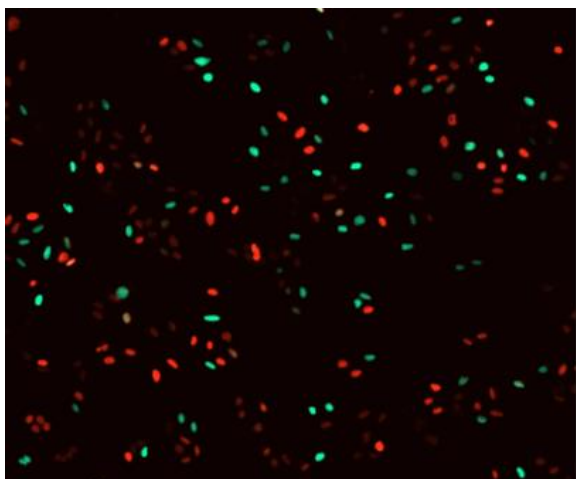
Graf 7: Polyklonálna bunková línia BJ a monoklonálna bunková línia HCT-116 ovplyvnená liečivom vincristín o dvoch koncentráciách (1x IC50 a 5x IC50). Zobrazenie percentuálneho zastúpenia buniek v pozorovaných fázach bunkového cyklu. Prvý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie BJ a štvrtý stĺpec zobrazuje negatívnu kontrolu bunkovej línie HCT-116.



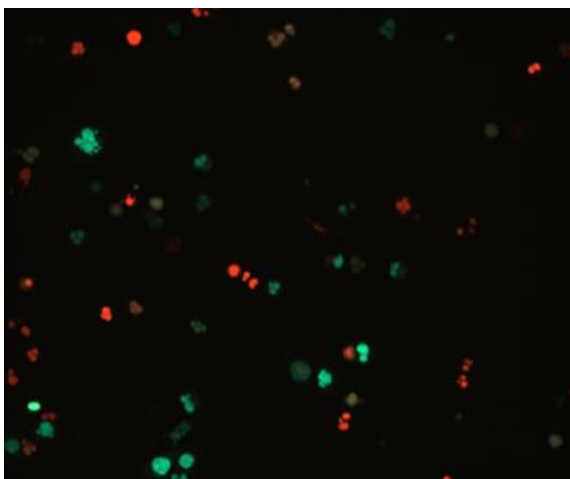
Obrázok 45: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **vincristín** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.1 μM**, zväčšenie 10x.



Obrázok 46: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **vincristín** o koncentrácii 1x IC 50, čo zodpovedá **0.1 μM**, zväčšenie 20x.



Obrázok 47: Polyklonálna línia BJ, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **vincristín** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **0.5 μM**, zväčšenie 10x.



Obrázok 48: Monoklonálna línia HCT-116, 24 hodín po ovplyvnení liečivom **vincristín** o koncentrácii 5x IC 50, čo zodpovedá **0.5 μM**, zväčšenie 20x.

6 DISKUSIA

Testovanie protinádorových liečiv poskytuje potenciálne terapeutické využitie pri liečbe nádorových ochorení. Znalosť spôsobu účinku liečiva na nádorové bunky je však nevyhnutná. Preto je potrebné zistiť akým spôsobom liečivo pôsobí na bunky a taktiež koncentráciu pri ktorej zistené mechanizmy nastávajú. Nádorové bunky môžu pôsobením liečiva zastaviť v určitej fáze cyklu, špecifickejšie podľa účinku liečiva, alebo prejsť do apoptózy. Na detekciu fáz buniek je využívaný systém FUCCI, ktorý deteguje fázy buniek v reálnom čase (Koh et al., 2017).

Experiment testovania účinku protinádorových liečiv (doxorubicín, etoposid, palbociclib, RO-3306, nocodazol, vincristín, bortezomib) bol použitý na nenádorovú bunkovú líniu BJ a nádorovú bunkovú líniu HCT-116. V oboch prípadoch bola testovaná polyklonálna populácia a následne monoklonálna línia. Pri bunkovej populácii BJ však nebolo možné použiť na vyhodnotenie monoklonálnu líniu, pretože sa nepodarilo vytvoriť reprezentatívnu populáciu. Negatívna kontrola monoklonálnej línie dosahovala vysoké hodnoty v G_2/M fáze, čím boli všetky testované látky posunuté k vyššiemu percentuálnemu zastúpeniu buniek v G_2/M fáze. Z toho dôvodu bola na testovanie použitá polyklonálna populácia. Pri bunkovej línii HCT-116 bolo možné testovať monoklonálnu líniu.

Ako negatívna kontrola slúžila bunková línia s DMSO. Každá bunková línia bola ovplyvnená dvoma koncentraciami, ktoré zodpovedajú $1x$ IC_{50} a $5x$ IC_{50} . Hodnota IC_{50} je parameter, ktorý udáva aké množstvo liečiva je potrebné na inhibíciu 50 % bunkovej populácie (Aykul a Martinez-Hackert, 2016). V prípade buniek bez ovplyvnenia liečivom je životaschopnosť 100% a bunky nezávisle prebiehajú bunkovým cyklom. Po ovplyvnení liečivom sa znižuje životaschopnosť buniek a bunky sa vo väčšom počte nachádzajú v určitej fáze cyklu.

Polyklonálna nenádorová bunková línia BJ vykazovala v prípade látok etoposid a nocodazol očakávané výsledky a percentuálne zastúpenie buniek v G_2/M fáze bolo najvyššie (Nam et al., 2010; Quinet et al., 2017). V prípade bunkovej línie HCT-116 boli výsledky totožné s výnimkou použitia liečiva nocodazol o koncentrácii $5x$ IC_{50} , kde bolo najvyššie percentuálne zastúpenie v G_1 fáze. To mohlo byť spôsobené zlyhaním mitotického kontrolného bodu, čím mohli bunky, ktoré neboli degradované cytotoxicitou nocodazolu, pokračovať do interfázy (Apraiz et al., 2017). Taktiež došlo k apoptóze pri použití vyššej koncentrácie v prípade oboch testovaných línii.

Výsledné hodnoty pri použití látky palbociclib potvrdili očakávané zastavenie v G_1 fáze a to u oboch použitých koncentráciách pri testovaní línie HCT-116. Inhibícia komplexu cycD/CDK4/6 palbociclibom viedla k inhibícii fosforylácie Rb a tým k znemožneniu prechodu bunkového cyklu z G_1 do S fázy (Pennycook a Barr, 2021). Pri bunkovej línii BJ došlo ku zastaveniu v G_1 fáze iba pri koncentrácii $1x$ IC_{50} , pri koncentrácii $5x$ IC_{50} došlo k zastaveniu bunkového cyklu s najvyšším

percentuálnym zastúpením v G₂/M fáze. Bunky bez funkčného p53 môžu prejsť do G₂/M fázy, avšak dochádza ku výrazným poškodeniam DNA, ktoré limitujú ich dlhší proliferatívny potenciál (Crozier et al., 2022). Aj pri liečive palbociclib došlo u oboch líniiach k významnej miere degradácii buniek. V prípade línie HCT-116 došlo k zníženiu počtu buniek o takmer 2/3 v porovnaní s kontrolou (Jost et al., 2021).

Testovaná látka doxorubicín o dvoch koncentráciách spôsobila zastavenie bunkového cyklu v G₂/M fáze pri bunkovej línii HCT-116, čo zodpovedá mechanizmu pôsobenia tohto liečiva. Pri použití liečiva doxorubicín dochádza k štrukturálnym zmenám DNA a tým k narušeniu jej opráv (Quinet et al., 2017; Thorn et al., 2011). K zastaveniu v tejto fáze došlo aj v prípade použitia koncentrácie 5x IC₅₀ pri testovaní na bunkovej línii BJ. Pri koncentrácii 1x IC₅₀ došlo k zastaveniu bunkového cyklu s najvyšším percentuálnym zastúpením v G₁ fáze.

Bunková línia BJ odpovedala na liečivo bortezomib pri oboch testovaných koncentráciách najvyšším percentuálnym zastúpením v G₁ fáze bunkového cyklu. Táto fáza nie je pre dané liečivo špecifická. Avšak, použitie bortezomibu mohlo spôsobiť degradáciu reportérových proteínov naviazaním liečiva na chymotrypsínu podobnú podjednotku proteazomu, čo vedie k narušeniu signálnych dráh a dochádza k porušeniu bunkového cyklu a následnej apoptóze (Chen et al., 2011; Kubiczka et al., 2014). Zatiaľ čo bunková línia HCT-116 mala najvyššie percentuálne zastúpenie buniek v G₂/M fáze bunkového cyklu. Zastavenie v G₂/M fáze bunkového cyklu je typické pre liečivo bortezomib (Seung-Woo et al., 2012). V prípade použitia koncentrácie 5x IC₅₀ došlo pri oboch líniiach k apoptóze, kde pri bunkovej línii HCT-116 došlo k zníženiu počtu viac ako o polovicu v porovnaní s kontrolou.

Liečivo RO-3306 vykazovalo zastavenie bunkového cyklu oboch línii pri použití koncentrácie 1x IC₅₀ v G₂/M fáze, čo potvrdilo mechanizmus pôsobenia tohto liečiva. RO-3306 pôsobí ako ATP kompetitívny inhibítor čím inhibuje CDK 1 a zastavuje bunkový cyklus vo fáze G₂/M (Kojima et al., 2009; Vassilev et al., 2006). Pri použití koncentrácie 5x IC₅₀ však došlo pri bunkovej línii HCT-116 k zastaveniu v G₁ fáze a redukcii počtu buniek následkom bunkovej smrti. Bunková línia BJ pri vyššej testovanej koncentrácii mala najvyššie percentuálne zastúpenie buniek v G₁/S fáze a došlo k celkovému navýšeniu počtu buniek. Zvýšenie počtu buniek však nebolo spôsobené proliferáciou, ale degradáciou buniek, čím boli fragmenty detegované ako bunky.

Polyklonálna bunková línia BJ aj monoklonálna bunková línia HCT-116 vykazovala najvyššie percentuálne zastúpenie buniek v G₁ fáze bunkového cyklu po ovplyvnení liečivom vincristín. Toto liečivo dokáže navodiť bunkovú smrť priamo v G₁ fáze a v prípade buniek, ktoré sa nachádzajú mimo túto fázu, dochádza k smrti v M fáze bunkového cyklu (Kothari et al., 2016). Výnimku tvorila použitá koncentrácia 1x IC₅₀ pri bunkovej línii HCT-116, kedy došlo k zastaveniu bunkového cyklu v G₂/M fáze, táto fáza bola očakávaná pri použití liečiva vincristín. Liečivo

zabraňuje deleniu buniek, dochádza k abnormálnej reorganizácii mikrotubulov, čo ma za následok tvorbu polynukleárných jadier (Liu et al., 2017). V prípade koncentrácie 5x IC50 bola pozorovaná vysoká cytotoxicita liečiva, čo viedlo k bunkovej smrti bunkovej línie HCT-116 (Shahhosseini et al., 2019).

Pri väčšine testovaných látok došlo pri použití liečiv o koncentrácii 5x IC50 k rôznej miere bunkovej smrti. Očakávaný účinok liečiv o koncentrácii 1x IC50 pri polyklonálnej bunkovej línii BJ bol pozorovaný v prípade liečiv etoposid, palbociclib, nocodazol a RO-3306. V prípade testovania bunkovej línie HCT-116 liečivami o koncentrácii 1x IC50 bol potvrdený mechanizmus pôsobenia liečiv pri všetkých látkach. V prípade použitia koncentrácie 5x IC50 bolo očakávané najvyššie percentuálne zastúpenie vo fázach zodpovedajúcich mechanizmu účinku potvrdené pri liečivách doxorubicín, etoposid, bortezomib, palbociclib. Ostatné testované látky pri vyššej koncentrácii vykazovali značnú cytotoxicitu s následkom bunkovej smrti a degradácii buniek.

7 ZÁVER

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo vytvoriť reportérovú nenádorovú bunkovú líniu BJ a nádorovú bunkovú líniu HCT-116 so stabilne vykazujúcou fluorescenčnou aktivitou na detekciu jednotlivých fáz bunkového cyklu. Reportérové línie boli vytvorené pomocou lentivírusovej transdukcie s použitím plazmidu pBOB-Fast FUCCI. Po testovaní polyklonálnej populácie nasledovalo testovanie na monoklonálnych populáciách. Tieto populácie boli vyselektované prietokovou cytometriou.

Bunkové línie boli testované siedmimi protinádorovými liečivami so známym účinkom pôsobenia na bunkový cyklus. Mechanizmus pôsobenia jednotlivých liečiv spôsoboval zastavenie bunkového cyklu v jednej zo sledovaných fáz cyklu. Každé liečivo bolo testované pri dvoch koncentráciách, a to 1x IC₅₀ a 5x IC₅₀. Hodnotenie a vizualizácia percentuálneho zastúpenia buniek v danej fáze cyklu prebehlo pomocou systému FUCCI.

Z získaných hodnôt možno usúdiť, že väčšina testovaných látok spĺňa očakávané výsledky a ich princíp účinku na nádorovú bunkovú líniu HCT-116 odpovedá mechanizmu pôsobenia na zastavenie bunkového cyklu v určitej fáze. Pri nenádorovej bunkovej línii BJ však došlo k rozdielnemu výsledku pri testovaní daných látok. Nie každé liečivo testované na nenádorovú bunkovú líniu spôsobilo zastavenie bunkového cyklu v špecifickej fáze cyklu podľa mechanizmu pôsobenia daného liečiva. V prípade pozorovania zastavania bunkového cyklu podľa účinku liečiva, nebolo najvyššie percentuálne zastúpenie tak vysoké, ako tomu bolo pri nádorovej bunkovej línii. Je to spôsobené tým, že nenádorové bunky sa delia pomalšie v porovnaní s nádorovými. Z toho dôvodu je ovplyvnenie nenádorových buniek liečivom o niečo nižšie. Taktiež boli pozorované významné rozdiely degradácie buniek pri použití vyššej koncentrácie medzi jednotlivými bunkovými líniami.

Pomocou systému FUCCI bolo možné preukázať pôsobenie liečiv na nenádorovú a nádorovú bunkovú líniu. V priebehu testovania boli pozorované významné rozdiely v percentuálnom zastúpení a miere bunkovej smrti pri použití jednotlivých testovaných látok o dvoch použitých koncentráciách.

Ciele vytýčené v tejto bakalárskej práci boli splnené.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

TELSER, Alvin. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. *Shock*. 2002, 18(3), 289-289. Dostupné z: doi:10.1097/00024382-200209000-00015

BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia. *Cell cycle*. 2022.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review: A Review. *Veterinary Pathology*. 1998, 35(6), 461-478. Dostupné z: doi:10.1177/030098589803500601

HEALTH, National Institutes of. *Cell Cycle*. 2022.

DE ZIO, Daniela, Valentina CIANFANELLI a Francesco CECCONI. New Insights into the Link Between DNA Damage and Apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013, 19(6), 559-571. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2012.4938

PIETRO, Garofalo. *G1/S Checkpoint*. 2010.

PAULOVICH, Amanda G a David P TOCZYSKI. *When Checkpoints Fail Review*. 88. 1997, s. -321, 315 s.

POLAGER, Shirley, Yael KALMA, Eli BERKOVICH a Doron GINSBERG. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*. 2002, 21(3), 437-446. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1205102

POUGET, Jean-Pierre. Basics of radiobiology. In: *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-822960-6.00137-x

MAYA-MENDOZA, Apolinar. Mechanisms regulating S phase progression in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009, Volume(14), 4199-4199. Dostupné z: doi:10.2741/3523

FISCHER, Martin, Chi V. DANG a James A. DECAPRIO. Control of Cell Division. In: *Hematology*. Elsevier, 2018, s. 176-185. ISBN 978-0-323-35762-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-35762-3.00017-2

AYAD, Nagi G. *CDKs give Cdc6 a license to drive into S phase*. 122. 2005. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.09.001

MATSON, Jacob P. a Jeanette G. COOK. *Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses: the impact of single cell analyses*. 284. 2017. Dostupné z: doi:10.1111/febs.13898

BERT, Markgraf. *G2 Phase: What Happens in this Subphase of the Cell Cycle?: What Happens in this Subphase of the Cell Cycle?*. 2019. Dostupné z: <https://sciencing.com/g2-phase-what-happens-in-this-subphase-of-the-cell-cycle-13717821.html>

STARK, George R. a William R. TAYLOR. Analyzing the G2/M Checkpoint. 280. In: *Checkpoint Controls and Cancer*. New Jersey: Humana Press, 2004, s. 051-082. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-788-2:051

CUDDIHY, Andrew R. a Matthew J. O'CONNELL. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *International Review of Cytology*. 2003, 222. Dostupné z: doi:10.1016/S0074-7696(02)22013-6

MORGAN, David O. Cell Cycle: Principles of Control: Principles of Control. *The Yale journal of biology and medicine*. 2007, 80(3).

GOULD, Kathleen L. a Paul NURSE. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*. 1989, 342(6245). Dostupné z: doi:10.1038/342039a0

- SEKI, Akiko, Judith A. COPPINGER, Chang Young JANG, John R. YATES a Guowei FANG. Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 2008, 320(5883). Dostupné z: doi:10.1126/science.1157425
- CASTRO, Anna, Suzanne VIGNERON, Thierry LORCA a Jean Claude LABBÉ. *Mitosis under control*. 19. 2003. Dostupné z: doi:10.1051/medsci/2003193309
- BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia. *Mitosis*. 2020.
- CLEMM VON HOHENBERG, Katharina, Sandra MÜLLER, Sibylle SCHLEICH, Matthias MEISTER, Jonathan BOHLEN, Thomas G. HOFMANN a Aurelio A. TELEMANN. Cyclin B/CDK1 and Cyclin A/CDK2 phosphorylate DENR to promote mitotic protein translation and faithful cell division. *Nature Communications*. 2022, 13(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-28265-0
- BOUNDLESS. Regulation of the Cell Cycle at Internal Checkpoints. *Boundless*. 2016.
- AMEISEN, J. C. *On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: A timeline of four billion years: A timeline of four billion years*. 9. 2002. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4400950
- AMAN, Yahyah, Tomas SCHMAUCK-MEDINA, Malene HANSEN, et al. *Autophagy in healthy aging and disease*. 1. 2021. Dostupné z: doi:10.1038/s43587-021-00098-4
- ELMORE, Susan. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death: A Review of Programmed Cell Death*. 35. 2007. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- THORNBERRY, Nancy A. a Yuri LAZEBNIK. Caspases: Enemies Within: Enemies Within. *Science*. 1998, 281(5381), 1312-1316. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5381.1312
- MADERNA, Paola a Catherine GODSON. *Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation*. 1639. 2003. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2003.09.004
- LIM, Shuhui a Philipp KALDIS. *Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation: Roles beyond cell cycle regulation*. 140. 2013. Dostupné z: doi:10.1242/dev.091744
- GALDERISI, Umberto, Francesco Paolo JORI a Antonio GIORDANO. *Cell cycle regulation and neural differentiation*. 22. 2003. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1206558
- CHANDRASEKARAN, Srikripa, Karen T. a Jeanette GOWEN. Regulation of DNA Replication Origin Licensing. In: *Fundamental Aspects of DNA Replication*. 2011. Dostupné z: doi:10.5772/20793
- GRANA, X. a E. P. REDDY. *Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs): Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. 11. 1995.
- OBAYA, A. J. a J. M. SEDIVY. *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells*. 59. 2002. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-002-8410-1
- SHERR, Charles J. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 2004, 116(2), 235-246. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)01075-4
- HERWIG, Susanne a Michael STRAUSS. *The retinoblastoma protein: A master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis: A master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis*. 246. 1997. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00581.x
- JAVANMARD, Davod, Masood MOEIN, Maryam ESGHAEI, Masood NASERIPOUR, Seyed Hamidreza MONAVARI, Farah BOKHARAEI-SALIM a Alireza SADEGHIPOUR. Molecular evidence of human papillomaviruses in the retinoblastoma tumor. *VirusDisease*. 2019, 30(3). Dostupné z: doi:10.1007/s13337-019-00540-7

JOYCE, Catherine, Appaji RAYI a Anup KAS. *Tumor-Suppressor Genes*. 2022. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30335276/>

CHIAL, By Heidi, Ph D WRITE, Science RIGHT a Nature EDUCATION. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education*. 2008, 1(2008).

CAFASSO. *Proto-Oncogenes Explained*. 2018.

SHIRMANOVA, Marina V., Dmitry A. GORBACHEV, Karen S. SARKISYAN, et al. FUCCI-Red: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021, 78(7). Dostupné z: doi:10.1007/s00018-020-03712-7

BALLABENI, Andrea, Raffaella ZAMPONI, Jodene K. MOORE, Kristian HELIN a Marc W. KIRSCHNER. Geminin deploys multiple mechanisms to regulate Cdt1 before cell division thus ensuring the proper execution of DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(30). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1310677110

PATMANIDI, Alexandra L., Spyridon CHAMPERIS TSANIRAS, Dimitris KARAMITROS, Christina KYROUSI, Zoi LYGEROU a Stavros TARAVIRAS. *Concise Review: Geminin—A Tale of Two Tails: DNA Replication and Transcriptional/Epigenetic Regulation in Stem Cells: Geminin—A Tale of Two Tails*. 35. 2017. Dostupné z: doi:10.1002/stem.2529

ARIAS, Emily E. a Johannes C. WALTER. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes & Development*. 2007, 21(5), 497-518. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1508907

NISHITANI, Hideo, Zoi LYGEROU a Takeharu NISHIMOTO. Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of Geminin through its N-terminal region. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(29). Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M312644200

LIU, Enbo, Xianghong LI, Feng YAN, Qiping ZHAO a Xiaohua WU. Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate Human Cdt1 and Induce Its Degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(17). Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C300549200

FIGULOVÁ, Jana. *Kontrolní body buněčného cyklu a oprava DNA ve vztahu k protinádorové terapii*. 2012. Dostupné z: <https://theses.cz/id/k715uh/>

HEIN, Ashley L., Michel M. OUELLETE a Ying YAN. *Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (Review)*. 45. 2014. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.2014.2614

DONG, Peng. *Explore Rb/E2F Activation Dynamics to Define the Control Logic of Cell Cycle Entry in Single Cells*. 2015. Dostupné z: doi:10.13140/RG.2.1.5168.8720

©, Cell Signaling Technology. *G2M/DNA Damage Checkpoint*. 2022.

UNIVERSITY, The Open. Pathological processes - cell death. In: *Introduction to histopatology*. 2019, s. 37-40.

LENTS, N H a J J BALDASSARE. Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. In: *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press, 2016, s. 423-431. ISBN 978-0-12-394796-3. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30057-8>

P., Held a Larson B. *Fluorescence-Based Imaging to Assess Cell Cycle Progression*. 2017.

MÉCHALI, Marcel a Malik LUTZMANN. *The Cell Cycle: Now Live and in Color: Now Live and in Color*. 132. 2008. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2008.01.031

OZAKI, Toshinori a Akira NAKAGAWARA. *Role of p53 in cell death and human cancers*. 3. 2011. Dostupné z: doi:10.3390/cancers3010994

- CHEN, Jiandong. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, 6(3). Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a026104
- KEY, Plastic Surgery. *Principles of Tumor Biology and Pathogenesis of BCCs and SCCs*. 2019. Dostupné z: <https://plasticsurgerykey.com/principles-of-tumor-biology-and-pathogenesis-of-bccs-and-sccs/>
- GOEL, Shom, Molly J. DECRISTO, Sandra S. MCALLISTER a Jean J. ZHAO. *CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest: Beyond Cell Cycle Arrest*. 28. 2018. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2018.07.002
- HALL, M. a G. PETERS. *Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer*. 68. 1996. Dostupné z: doi:10.1016/s0065-230x(08)60352-8
- ALISON M. MICHIE, Verica Paunovic and Margaret M. Harnett. *Cellular Homeostasis: Cell Growth and Cancer: Cell Growth and Cancer*. In: . 2018. ISBN 9780702072994.
- TAKEDA, David Y. a Anindya DUTTA. *DNA replication and progression through S phase*. 24. 2005. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1208616
- HUANG, Shijiao a Chuanmao ZHANG. The Coordination between DNA Replication Initiation and Other Cell Cycle Events. In: *DNA Replication-Current Advances*. 2011. Dostupné z: doi:10.5772/21646
- O'CONNELL, M a N WALWORTH. G2/M Checkpoints. *Reactome - a curated knowledgebase of biological pathways*. 2003, 4. Dostupné z: doi:10.3180/react_828.2
- SONG, Xixi, Hui CAI, Chengyu YANG, et al. *Possible Novel Therapeutic Targets in Lymphangioliomyomatosis Treatment*. 7. 2020. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2020.554134
- WANG, Yingmei, Ping JI, Jinsong LIU, Russell R. BROADDUS, Fengxia XUE a Wei ZHANG. *Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy*. 8. 2009. Dostupné z: doi:10.1186/1476-4598-8-8
- JOHN D. GRIFFIN, NATHAN S. CLAXTON, and Michael W. Davidson. *Observing Mitosis with Fluorescence Microscopy*. 2015.
- KOPS, Geert J.P.L. a Jagesh V. SHAH. *Connecting up and clearing out: How kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint: How kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint*. 121. 2012. Dostupné z: doi:10.1007/s00412-012-0378-5
- HANAHAN, Douglas. *Hallmarks of Cancer: New Dimensions: New Dimensions*. 12. 2022. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- VO, Thanh Trang a Anthony LETAI. BH3-only proteins and their effects on cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010, 687. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-6706-0_3
- TAMAKI, T., Y. NAOMOTO, S. KIMURA, et al. Apoptosis in normal tissues induced by anti-cancer drugs. *Journal of International Medical Research*. 2003, 31(1). Dostupné z: doi:10.1177/147323000303100102
- OTTO, Tobias a Piotr SICINSKI. *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. 17. 2017. Dostupné z: doi:10.1038/nrc.2016.138
- WANG, Zhixiang. *Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling*. 10. 2021. Dostupné z: doi:10.3390/cells10123327
- TORNESELLO, Maria Lina, Clorinda ANNUNZIATA, Anna Lucia TORNESELLO, Luigi BUONAGURO a Franco Maria BUONAGURO. *Human oncoviruses and p53 tumor suppressor*

pathway deregulation at the origin of human cancers. 10. 2018. Dostupné z: doi:10.3390/cancers10070213

AMELIO, Ivano a Gerry MELINO. *Context is everything: extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants: extrinsic signalling and gain-of-function p53 mutants.* 6. 2020. Dostupné z: doi:10.1038/s41420-020-0251-x

HALL, Brian E., Dafna BAR-SAGI a Nicolas NASSAR. The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002, 99(19). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.192453199

JIANG, Huiyong, Xiaoyan BAI, Cheng ZHANG a Xuefeng ZHANG. Evaluation of HER2 gene amplification in breast cancer using nuclei microarray in Situ hybridization. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012, 13(5). Dostupné z: doi:10.3390/ijms13055519

WANG, Chen, Jiawei ZHANG, Jie YIN, Yichao GAN, Senlin XU, Ying GU a Wendong HUANG. *Alternative approaches to target Myc for cancer treatment.* 6. 2021. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00500-y

QIE, Shuo a J. Alan DIEHL. *Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment.* 67. 2020. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcan.2020.01.012

MONTANARI, M., M. MACALUSO, A. CITTADINI a A. GIORDANO. *Role of geminin: From normal control of DNA replication to cancer formation and progression?: From normal control of DNA replication to cancer formation and progression?.* 13. 2006. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cdd.4401932

TSUNEMATSU, Takaaki, Yoshihiro TAKIHARA, Naozumi ISHIMARU, Michele PAGANO, Takashi TAKATA a Yasusei KUDO. Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis. *Nature Communications.* 2013, 4. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2859

DRABIK, Anna, Anna BODZON-KULAKOWSKA a Jerzy SILBERRING. Gel Electrophoresis. In: *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry.* 2013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-59378-8.00006-2

RESNIK, Randolph R. a Robert J. RESNIK. Medical/Medication Complications in Oral Implantology. In: *Misch's Avoiding Complications in Oral Implantology.* 2018. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-323-37580-1.00002-0

WEBER-SCHÖNDORFER, Corinna a Christof SCHAEFER. 2.13 - Antineoplastic drugs. In: *Drugs During Pregnancy and Lactation (Second Edition).* Oxford: Academic Press, 2007, s. 335-367. ISBN 978-0-444-52072-2. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52072-2.50017-3

RI, Masaki. Mechanism of action of bortezomib in multiple myeloma therapy. *International Journal of Myeloma.* 2016, 6(1).

WANG, Yun, Joshua P. GRAY, Vladimir MISHIN, Diane E. HECK, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN. Role of cytochrome P450 reductase in nitrofurantoin-induced redox cycling and cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008, 44(6). Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.013

LIU, Haiping, Jianye WANG, Lianbing SHENG, Yan ZHANG, Ning TANG, Yunfei LI a Tianyu HAO. Paclitaxel Promotes Cell Apoptosis in Uterine Leiomyomas. *Pharmacology.* 2017, 100(5-6). Dostupné z: doi:10.1159/000479161

THORN, Caroline F., Connie OSHIRO, Sharon MARSH, Tina HERNANDEZ-BOUSSARD, Howard MCLEOD, Teri E. KLEIN a Russ B. ALTMAN. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2011, 21(7). Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56

- MUSLIMOVIĆ, Aida, Susanne NYSTRÖM, Yue GAO a Ola HAMMARSTEN. Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PLoS ONE*. 2009, 4(6). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0005859
- VASSILEV, Lyubomir T., Christian TOVAR, Shaoqing CHEN, Dejan KNEZEVIC, Xiaolan ZHAO, Hongmao SUN, David C. HEIMBROOK a Li CHEN. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, 103(28). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0600447103
- KOJIMA, Kensuke, Masaya SHIMANUKI, Masato SHIKAMI, Michael ANDREEFF a Hideki NAKAKUMA. Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and mitochondrial apoptosis in AML. *Cancer Science*. 2009, 100(6). Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01150.x
- KIM, Hye Sun, Yong Soo LEE a Dong Ku KIM. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and fas-mediated cell death. *Pharmacology*. 2009, 84(5). Dostupné z: doi:10.1159/000245937
- TAMURA, Daisuke, Tokuzo ARAO, Kaoru TANAKA, et al. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Science*. 2010, 101(6). Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01544.x
- KOH, Siang Boon, Patrice MASCALCHI, Esther RODRIGUEZ, Yao LIN, Duncan I. JODRELL, Frances M. RICHARDS a Scott K. LYONS. A quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. *Journal of Cell Science*. 2017, 130(2). Dostupné z: doi:10.1242/jcs.195164
- AYKUL, Senem a Erik MARTINEZ-HACKERT. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*. 2016, 508. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2016.06.025
- JOST, Tina, Lucie HEINZERLING, Rainer FIETKAU, Markus HECHT a Luitpold V. DISTEL. Palbociclib Induces Senescence in Melanoma and Breast Cancer Cells and Leads to Additive Growth Arrest in Combination With Irradiation. *Frontiers in Oncology*. 2021, 11. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.740002
- NAM, C., K. DOI a H. NAKAYAMA. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. *Histology and Histopathology*. 2010, 25(4).
- QUINET, Annabel, Denisse CARVAJAL-MALDONADO, Delphine LEMACON a Alessandro VINDIGNI. Chapter Three - DNA Fiber Analysis: Mind the Gap!: Mind the Gap!. 591. In: *DNA Repair Enzymes: Cell, Molecular, and Chemical Biology*. 2017.
- PENNYCOOK, Betheny R. a Alexis R. BARR. Palbociclib-mediated cell cycle arrest can occur in the absence of the CDK inhibitors p21 and p27. *Open Biology*. 2021, 11(11). Dostupné z: doi:10.1098/rsob.210125
- SEUNG-WOO, Hong, Kim Tae WON, Moon JAI-HEE, et al. Abstract B34: Bortezomib induces G2-M arrest through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1 in human colon cancer cells: Bortezomib induces G2-M arrest through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1 in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 2012, 18(10_Supplement). Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.mechres-b34
- SHAHHOSSEINI, Mohaddese, Susan KABOUDANIAN ARDESTANI a Roya YARAEI. The Apoptotic Pathway Induced by Vincristine in Mouse Proliferating and Resting Normal Lymphocytes and Lymphoma Cell Line. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2019, 21(4). Dostupné z: doi:10.5812/zjrms.9936

KUBICZKOVA, Lenka, Ludek POUR, Lenka SEDLARIKOVA, Roman HAJEK a Sabina SEVCIKOVA. Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014, 18(6). Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.12279