

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

**Porovnání účinků tolytoxinu a jeho strukturní  
varianty (7-O-methylscytophycin B) na  
rakovinných a primárních buněčných liniích**

Bakalářská práce

**Veronika Brožová**

Školitelka: Mgr. Kateřina Delawská, Dis.

Školitel specialista: RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D.

České Budějovice 2021

Brožová, V., 2021: Porovnání účinků tolytoxinu a jeho strukturní varianty (7-O-methylscytophycin B) na rakovinných a primárních buněčných liniích. [Comparison of effects of tolytoxin and its structural variant (7-O-methylscytophycin B) on cancer and primary cell lines, Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

**Annotation:**

This bachelor thesis discusses the effects of tolytoxin and its structural variant 7-O-methylscytophycin B from the scytophycin family of macrolides on cancer and primary cell lines. The two main goals of this study was to compare the chemical structure and the effects of both toxins on cancer and primary cell lines and whether the cells treated by these agents go through regulated cell death, specifically the intrinsic pathway of apoptosis. In the last chapter, the potential use of these toxins in future cancer research and clinical use are discussed.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 14. 4. 2021

.....  
Veronika Brožová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé školitelce Mgr. Kateřině Delawské, DiS a konzultantu RNDr. Pavlu Hrouzkovi, Ph.D za jejich čas, trpělivost a ochotu pomoci pokaždé, když bylo potřeba. Dále bych ráda poděkovala MVDr. Jindřišce Paichlové a Mgr. Petře Divoké, za cenné rady a pomoc. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině, bez které bych tuto práci nemohla dokončit.

## OBSAH

1.	Úvod .....	1
2.	Scytophyciny .....	2
2.1.	Tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methylscytophycin B) .....	3
2.2.	7-O-methylscytophycin B .....	4
2.3.	Scytophyciny A-E .....	4
2.4.	Ostatní scytophyciny .....	5
3.	Buněčná smrt .....	7
3.1.	Na kaspázách závislá vnitřní dráha apoptózy .....	8
3.2.	Indukce apoptózy a léčba rakoviny .....	9
4.	Cíle práce .....	10
5.	Materiály a metody .....	11
5.1.	Chemikálie .....	11
5.2.	Metodologie .....	11
5.2.1.	Izolace TLX a 7-OMeSB .....	11
5.2.2.	Kultivace buněk <i>in vitro</i> .....	11
5.2.3.	Ošetření buněk látkami TLX a 7-OMeSB a identifikace IC50 pro HeLa WT buněk 13	
5.2.4.	MTT test .....	13
5.2.5.	Testování viability pomocí ATP .....	14
5.2.6.	Měření hladiny kaspáz 3/7 .....	14
5.2.7.	Hemolytický test .....	16
5.2.8.	Velkokapacitní screening .....	16
5.2.9.	Barvení jádra, aktinu a tubulinu .....	17
5.2.10.	Barvení fosfatidylserinu a vyhodnocení průtokovou cytometrií .....	18
6.	Výsledky .....	20
6.1.	Vyhodnocení IC50 TLX a 7-OMeSB na HeLa WT buněčné linii .....	20
6.2.	Hodnocení viability .....	20
6.2.1.	MTT test .....	20
6.2.2.	ATP .....	21
6.3.	hodnocení buněčné smrti .....	22
6.3.1.	Hladina kaspáz 3/7 .....	22

6.4.	Hemolytický test.....	24
6.5.	Velkokapacitní screening .....	24
6.6.	Morfologie buněčné linie HeLa WT po 24h expozice TLX a 7-OMeSB .....	27
7.	Diskuze .....	30
7.1.	Hodnocení viability .....	30
7.2.	Hodnocení buněčné smrti .....	31
7.3.	Hemolytický test.....	31
7.4.	Morfologie .....	32
7.5.	Působení látek na různé rakovinné buněčné linie.....	32
7.5.1.	Citlivé linie .....	32
7.5.2.	Rezistentní linie .....	33
7.6.	Potenciál TLX a 7-OMeSB .....	34
8.	Závěr.....	35
9.	Seznam literatury .....	36
10.	Seznam internetových zdrojů .....	43

## 1. ÚVOD

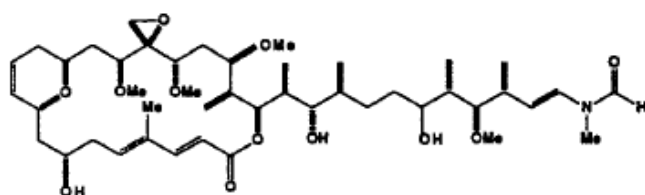
Sinice jsou gram-negativní prokaryotní organismy (Gupta *et al.*, 2013) a jsou to nejstarší organismy s oxygenní fotosyntézou, které se na Zemi objevily přibližně před 2,6-3,5 miliardami let (Lau *et al.*, 2015). Objevují se v různých morfologických formách, včetně vláknitých, spirálních, jednobuněčných a koloniálních. Jedná se o všudypřítomné organismy, jež jsou schopné žít v suchozemských, sladkovodních i mořských prostředích, včetně těch, v nichž panují extrémní podmínky. V průběhu evoluce se jim podařilo vyvinout schopnosti přizpůsobit se extrémním teplotám, pH a UV záření. Taxonomicky jsou rozděleny podle morfologických a fyziologických charakteristik do pěti řádů – Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales a Stigonematales (Vijayakumar, 2018).

Sinice jsou známé především díky neblaze proslulým vodním květům, které vznikají přemnožením sinic v vodních prostředích. Ve vodách s aktivním vodním květem lze najít zvýšenou koncentraci sekundárních metabolitů s toxickým účinkem, jako jsou například mikrocystiny – látky peptidového charakteru s hepatotoxickým účinkem, anatoxiny – skupina neurotoxických alkaloidů, nebo cylindrospermopsiny – skupina látek s cytotoxickým, nefrotoxickým a hepatotoxickým účinkem (Huang & Zimba, 2019). Právě díky produkci rozličných sekundárních metabolitů sinice získávají pozornost nejen z hlediska potenciální toxicity, ale též kvůli jejich využitelnosti pro farmakologické a biotechnologické aplikace (Vijayakumar, 2018).

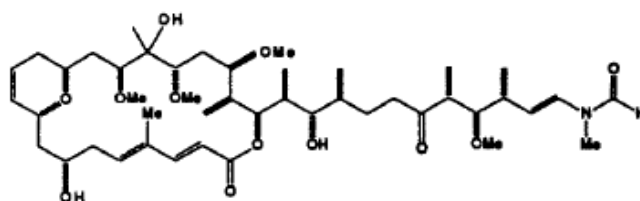
Jako sekundární metabolity se tradičně označují látky, které nejsou přímo potřebné pro primární metabolické procesy v buňce, nicméně se v poslední době objevují poznatky o tom, že se některé sekundární metabolity mohou účastnit primárního metabolismu (Pagare *et al.*, 2015). Existuje několik teorií vysvětlující důležitost sekundárních metabolitů pro produkující organismus: např. zvýšení jeho fitness díky obraně proti predátorům nebo např. ochrana proti poškození způsobeného nadměrnou intenzitou slunečního záření. Obecně jsou tedy tyto metabolity produkovány i v reakci na biotický nebo abiotický stres (Vijayakumar, 2018). Mají však též velký potenciál, díky jejich antivirovým, antibakteriálním, antifungálním, protizánětlivým a protirakovinným účinkům (Gupta *et al.*, 2013).

## 2. SCYTOPHYCINY

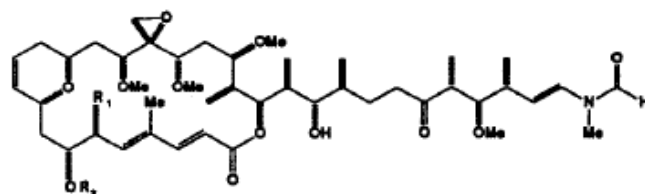
Jsou to makrolidy (polyketony) obsahující ve své struktuře 22-členný uhlíkatý cyklus jež nese různé boční substituenty a lineární řetězec ukončený N-methyl-formamidovou skupinou (Yadav *et al.*, 2008). Jsou produkovány sinicemi z rodů *Tolypothrix*, *Scytonema* (Patterson & Bolis, 1993), *Anabaena*, *Nostoc* (Shishido *et al.*, 2015) a *Planktothrix* (Senol *et al.*, 2019). Jsou známy pro své antifungální, cytostatické a protirakovinné účinky, které spočívají v inhibici polymerizace a depolymerizace aktinu (Patterson & Bolis, 1993). Jejich strukturu je možné vidět na Obr.1. a přehled nejznámějších zástupců v Tab.I.



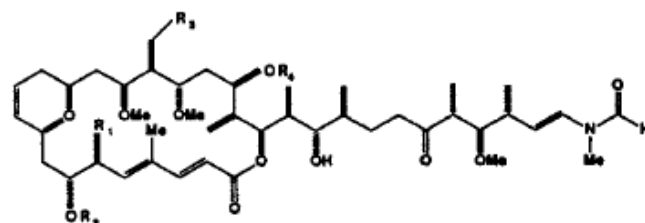
**Name**  
1 scytophycin A



**Name**  
2 scytophycin D



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Name
3	OH	Me	tolytoxina
4	OH	H	6-hydroxyscytophycin B
5	H	H	scytophycin B

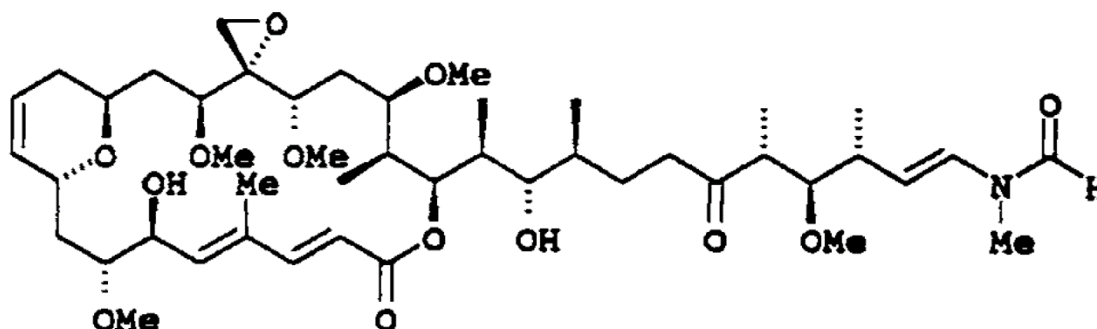


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Name
6	H	H	H	Me	scytophycin C
7	H	H	H	H	19-O-demethylscytophycin C
8	OH	OH	Me	Me	6-hydroxy-7-O-methylscytophycin E
9	H	H	OH	Me	scytophycin E

Obr. 1: Struktura scytophycinů (Patterson & Bolis, 1993)

## 2.1. Tolytoxin (6-hydroxy-7-O-methylscytophycin B)

Tolytoxin (dále TLX) je makrolid patřící do skupiny scytophycinů (Carmeli *et al.*, 1993) s cytotoxickými účinky. Strukturu tohoto makrolidu je možné vidět na Obr.2. TLX byl izolován jako první ze skupiny scytophycinů v roce 1977 na Fanning Island ze suchozemské sinice *Tolythrix conglutinata* var. *Colorata*. TLX je též produkován i sinicemi z rodu *Scytonema*, např. *Scytonema mirabile*, *Scytonema burmanirum* a *Scytonema ocellatum* (Carmeli *et al.*, 1990) nebo také *Planktothrix paucivesiculata* (Senol *et al.*, 2019). Projevily se u něj silné antifungální účinky, avšak na bakterie TLX vliv nemá (Patterson & Carmeli, 1992).



Obr. 2: Struktura TLX (Patterson & Bolis, 1997).

U TLX izolovaného ze sinice *Scytonema ocellatum* byly zjištěny antifungální účinky po aplikaci TLX v rozmezí koncentrací MIC (Minimum inhibitory concentration) 0,25-8 nM u dvou druhů kvasinek (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) a u dvanácti druhů vláknitých hub (*Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae*, *Bipolaris incurvata*, *Caloneotria critalarae*, *Colletotrichum eoecodes*, *Penicillium notatum*, *Phyllosticta capitalensis*, *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rofsii*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Trichophyton mentagrophytes*) (Patterson & Carmeli, 1992). Byla také podpořena hypotéza, že by se TLX mohl chovat jako phytoalexin, tedy obranná látka produkována organismem v případě napadení houbou (Patterson & Bolis, 1997).

TLX má cytostatické účinky spočívající v narušení struktury mikrofilament pomocí inhibice polymerizace F-aktinu bez efektu na mikrotubuly nebo intermediální filamenta *in vitro* (Patterson *et al.*, 1993). TLX se naváže na polymerizované vlákno F-aktinu a na odpovídající oblast G-aktinu. Část jádra tak interaguje s povrchem aktinu, zatímco lineární řetězec brání monomerům G-aktinu v navázání se na F-aktin, což způsobuje narušení vlákna (Klenchin *et al.*, 2003). TLX byl testován v různých rozmezích koncentrací – 0,5-16 nM (Patterson &



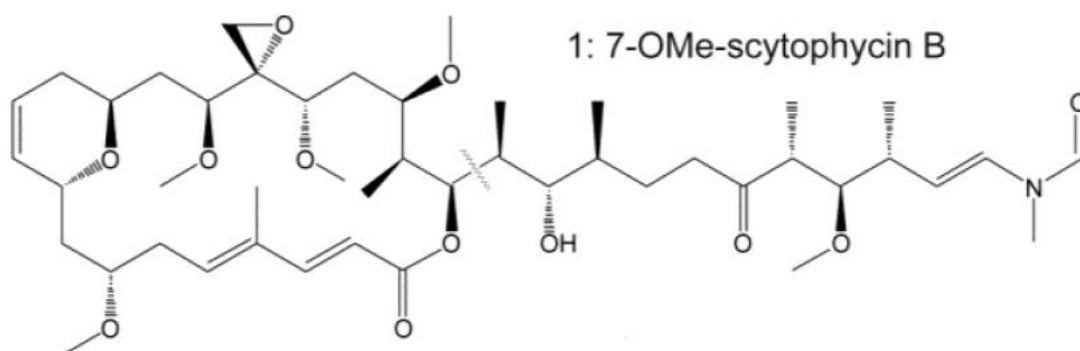
Carmeli, 1992), 2-16 nM (Patterson *et al.*, 1993), 3 nM-2  $\mu$ M (Senol *et al.*, 2019) a na širokém spektru buněčných linií – L1210, LoVo, KB, HEp-2, HL-60, HBL-100, T47-D, COLO-201, KATO-III (Patterson & Carmeli, 1992), KB, A10, L1210 ((Patterson *et al.*, 1993), SW13, SH-SY5Y (Senol *et al.*, 2019). Nicméně je zřejmé, že potence látky závisí na konkrétní buněčné linii (Patterson *et al.*, 1993).

Byly provedeny studie, které se pokoušely o zvrácení účinku TLX, výsledky jsou však nejednoznačné. Cytostatický efekt na KB linii při nízké dávce TLX se podařilo zvrátit okamžitým resuspendováním buněk v médiu bez TLX (Patterson *et al.*, 1993). Avšak při odstranění TLX po 4h působení na A10 linii, se účinek už zvrátit nepodařilo. Mechanismus tohoto jevu dosud není plně znám (Zhang *et al.*, 1997).

TLX by mohl být perspektivní látkou pro léčbu rakoviny, avšak překážkou je poměrně vysoká toxicita *in vivo*. Během studií provedených na myších Swiss Webster byla prokázána  $LD_{50}$ = 1,5 mg/kg spojená s akutní orgánovou otravou (Patterson & Carmeli, 1992).

## 2.2. 7-O-methylscytophycin B

7-O-methylscytophycin B (dále 7-OMeSB) je strukturální varianta TLX, nalezená v sinicích rodu *Anabaena* a *Nostoc* (Shishido *et al.*, 2015; Tomsickova *et al.*, 2014). Strukturu této látky je možné vidět na Obr.3.



Obr. 3: Struktura 7-OMeSB (Shishido *et al.*, 2015).

## 2.3. Scytophyciny A-E

Scytophyciny A, B, C, D, E byly izolovány ze suchozemské sinice *Scytonema pseudohofmanni* a vykazují antifungální a cytotoxickou aktivitu (Ishibashi *et al.*, 1986). Scytophyciny A a B jsou silně cytotoxické vůči KB linii lidského nazofaryngeálního

karcinomu, ale vykazují mírnou aktivitu proti P-388 lymfocytární leukémii a Lewisovu plicnímu karcinomu (Carmeli *et al.*, 1990).

Scytophycin C byl izolován jako druhý zástupce skupiny scytophycinů ze suchozemské sinice *Scytonema pseudohofmanni* a vykazuje antifungální a cytotoxickou aktivitu (Ishibashi *et al.*, 1986) na různých rakovinných buněčných liniích (Nakamura *et al.*, 2003).

#### **2.4. Ostatní scytophyciny**

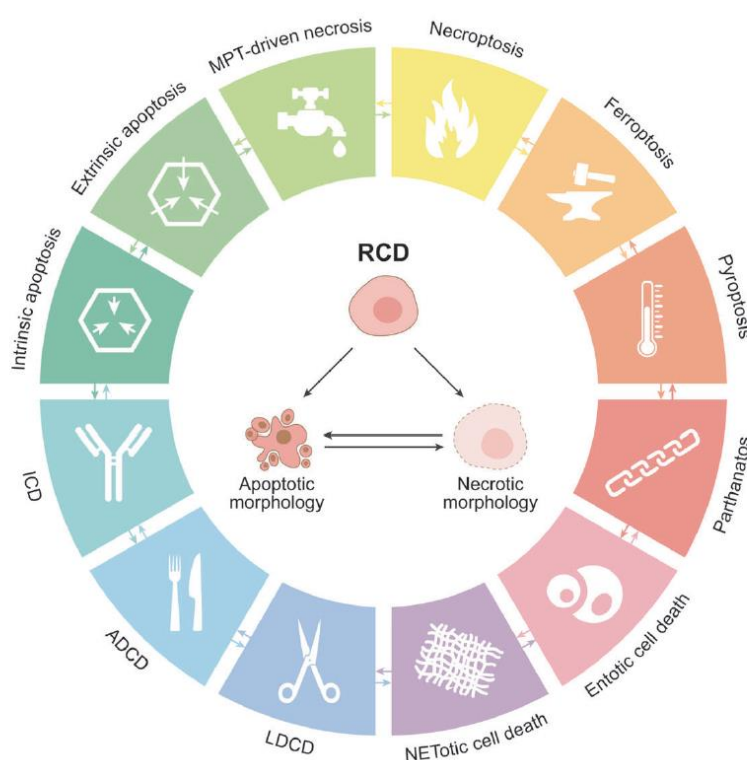
Mezi ostatní scytophyciny patří ještě např. 6-hydroxyscytophycin B, 19-O-demethylscytophycin C a 6-hydroxy-7-O-methylscytophycin E, které byly izolovány ze sinic rodu *Scytonema* – *Scytonema mirabile*, *Scytonema burmanirum* a *Scytonema ocellatum* (Carmeli *et al.*, 1990). Zatímco 6-hydroxyscytophycin B a 6-hydroxy-7-O-methylscytophycin E mají cytotoxické a antifungální účinky (Jung & Patterson, 1991), u 19-O-demethylscytophycinu C účinky nejsou známy.

Tab. I: Přehled nejznámějších scytophycinů, M – molární hmotnost (Zdroj: Pubchem).

Látka	Sinicový producent	M	Účinek	Reference
<b>Scytophycin A</b>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	822,5 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Ishibashi <i>et al.</i> , 1986)
<b>Scytophycin B</b>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	820,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Ishibashi <i>et al.</i> , 1986)
<b>Scytophycin C</b>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	806,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Ishibashi <i>et al.</i> , 1986)
<b>Scytophycin D</b>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	822,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Ishibashi <i>et al.</i> , 1986)
<b>Scytophycin E</b>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	822,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Ishibashi <i>et al.</i> , 1986)
<b>Tolytoxin</b>	<i>Tolypothrix conglutinata</i> var. <i>colorata</i> ; <i>Planktothrix paucivesiculata</i> , <i>Scytonema mirabile</i> , <i>S. burmanirum</i> , <i>S. ocellatum</i>	850,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Carmeli <i>et al.</i> , 1990); (Senol <i>et al.</i> , 2019); (Patterson & Carmeli, 1992); (Patterson <i>et al.</i> , 1993)
<b>7-O-Methylscytophycin B</b>	<i>Anabaena</i> sp.	834,53 g/mol	Cytotoxický	(Tomsickova <i>et al.</i> , 2014); (Shishido <i>et al.</i> , 2015)
<b>6-hydroxyscytophycin B</b>	<i>Scytonema mirabile</i> , <i>S. burmanirum</i> , <i>S. ocellatum</i>	836,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Carmeli <i>et al.</i> , 1990); (Jung <i>et al.</i> , 1991)
<b>19-O-demethylscytophycin C</b>	<i>Scytonema mirabile</i> , <i>S. burmanirum</i> , <i>S. ocellatum</i>	792 g/mol	Není znám	(Carmeli <i>et al.</i> , 1990)
<b>6-hydroxy-7-O-methylscytophycin E</b>	<i>Scytonema mirabile</i> , <i>S. burmanirum</i> , <i>S. ocellatum</i>	852,1 g/mol	Cytotoxický, antifungální	(Carmeli <i>et al.</i> , 1990); (Jung <i>et al.</i> , 1991)
<b>7-OMe-29-OAc-scytophycin B</b>	<i>Anabaena</i> sp.	862,1 g/mol	Není znám	(Shishido <i>et al.</i> , 2015)
<b>6-OH-7-OMe-15-O-deMe-scytophycin B</b>	<i>Nostoc</i> sp.	836,1 g/mol	Není znám	(Shishido <i>et al.</i> , 2015)

### 3. BUNĚČNÁ SMRT

Buněčná smrt je významný mechanismus, pomocí kterého dochází k eliminaci nadbytečných, nevratně poškozených a/nebo potenciálně škodlivých buněk. Jedná se o nevratnou degeneraci životně důležitých buněčných funkcí, zejména produkce ATP a zachování homeostázy, která vyvrcholí v permanentní permeabilizaci plazmatické membrány nebo fragmentaci buněk. Náhodná buněčná smrt (ACD – accidental cell death) je okamžitá a nekontrolovatelná forma buněčné smrti odpovídající katastrofickému zániku buňky, kde dojde k rozložení plazmatické membrány z důvodu extrémních fyzických, chemických nebo mechanických podmínek. ACD nelze zpomalit farmakologickými ani genetickými zásahy. Tato forma buněčné smrti se velmi liší od regulované buněčné smrti (RCD - regulated cell death). RCD je forma buněčné smrti, která je výsledkem aktivace různých signálních drah, a proto ji lze do určité míry inhibovat farmakologickými nebo genetickými intervencemi. K RCD může dojít při poruchách intracelulárního nebo extracelulárního prostředí, ale také při absenci jakéhokoli narušení těchto prostředí, a proto funguje jako efektor fyziologických dějů, jako je např. vývoj a obnova tkáně. Tyto fyziologické děje se obecně označují jako programovaná buněčná smrt (PCD) (Galluzzi *et al.*, 2018).



Obr. 4: Významné dráhy regulované buněčné smrti (Galluzzi *et al.*, 2018).

Jednou z forem RCD je apoptóza (Galluzzi *et al.*, 2018). Takto umírající buňky podstupují charakteristické morfologické změny. Dochází ke sevřknutí, kolapsu cytoskeletu, kondenzaci jaderného materiálu a proteolytickému štěpení proteinů, jež vede až k zániku organel a následně k rozpadu buňky na drobná apoptická tělíska, která jsou následně fagocytována buňkami imunitního systému (Alberts *et al.*, 2014). Mezi další formy regulované buněčné smrti patří např. nekroptóza, feroptóza a entóza (Obr. 4) (Galluzzi *et al.*, 2018).

### **3.1. Na kaspázách závislá vnitřní dráha apoptózy**

Vnitřní dráha apoptózy je spouštěna různými stresovými stimuly, které ale pocházejí z vnitřního prostředí buňky. Mezi takový stimul může patřit například stáří buňky, poškození DNA, oxidativní stres, virová infekce nebo škodlivá mutace detekovaná při kontrolním bodu buněčného cyklu (Elmore, 2007).

Celý proces je iniciován a řízen proteiny patřící do rodiny Bcl-2. Jedná se o skupinu vnitrobuněčných proteinů a regulátorů vnitřní cesty apoptózy. Zahrnuje proteiny proapoptické a antiapoptické. Jakmile buňka dostane signál, který vyvolá apoptózu, proapoptické proteiny jsou aktivovány. Signalizační kaskádou dojde k aktivaci efektorových proteinů Bax a Bak, jež zvýší propustnost vnější membrány mitochondrie vytvořením tzv. mitochondriálního membránového póru, čímž následně dojde k vylití ve vodě rozpustného proteinu cytochromu c do cytosolu buňky. Cytochrom c se v cytosolu buňky naváže na adaptorový protein Apaf1 (Apoptotic protease-activating factor 1) a vytvoří tak heptamer nazývaný apoptozom. Apaf1 protein uvnitř apoptozomu následně přemění neaktivní prokaspázu-9 na aktivní kaspázu-9. Tato iniciátorová kaspáza spustí aktivaci dalších kaspáz, zejména těch efektorových (Alberts *et al.*, 2014).

Kaspázy jsou cystein dependentní proteázy, které jsou v buňce přítomny hlavně jako neaktivní prekurzory a jsou aktivovány během apoptózy. Kaspázy zapojené do apoptické smrti se dělí do dvou skupin – iniciátorové a efektorové kaspázy. Iniciátorové kaspázy (kaspázy 2, 8, 9, 10) se běžně vyskytují v buňce jako neaktivní rozpustné monomery. Hlavní rolí iniciátorových kaspáz je následná aktivace efektorových kaspáz. Tato autoaktivační vlastnost kaspáz dále umožňuje zesílit tuto apoptickou signální dráhu, a tak napomoci rychlejší buněčné smrti (Elmore, 2007). Efektorové kaspázy (kaspázy 3, 6, 7) se běžně vyskytují jako neaktivní dimery. Aktivují se až když jsou rozštěpeny iniciátorovými kaspázami. Aktivace efektorových kaspáz tak spouští velkou proteolytickou kaskádu vedoucí ke štěpení celé řady intracelulárních

proteinů a následně až k zániku buňky, kterou po spuštění již nelze zastavit. Charakteristickým znakem apoptózy je také externalizace fosfolipidu fosfatidylserinu z vnitřní strany cytoplazmatické membrány na vnější. Buňka je tímto způsobem označena pro destrukci fagocytózou. V buňce následně probíhají různé morfologické změny a v závěru se rozpadá na jednotlivá apoptická tělíška, která jsou fagocytována sousedními buňkami nebo buňkami imunitního systému (Alberts *et al.*, 2014).

### **3.2. Indukce apoptózy a léčba rakoviny**

Jak již bylo zmíněno výše, apoptóza je základní obranný mechanismus, který chrání organismus před poškozenými buňkami. Prevence rakoviny je tedy jednou ze základních funkcí apoptózy (Pfeffer & Singh, 2018). Již vzniklé rakovinné buňky se ale umí apoptóze vyhnout různými buněčnými mechanismy (např. snížená funkce kaspáz, nerovnováha proapoptických a antiapoptických proteinů). Ztráta schopnosti těchto buněk zemřít tímto způsobem tedy zapříčiní nekontrolovanou proliferaci a vznik nádorů a/nebo metastáz. Indukce apoptózy různými chemoterapeutickými látkami je tedy vhodnou léčbou rakoviny (Wong, 2011).

Příkladem takových látek jsou Taxany (např. paclitaxel, docetaxel), které působí na mikrotubuly cytoskeletu a způsobí inhibici buněčného cyklu, která vede ke smrti buňky (Lattime & Gerson, 2013).

## 4. CÍLE PRÁCE

1) Porovnat účinek TLX a 7-OMeSB na rakovinných a primárních buněčných liniích zahrnující:

- Stanovení viability pomocí detekce hladiny ATP u široké škály rakovinných a primárních buněčných linií ošetřených TLX a 7-OMeSB.
- Zhodnocení jejich  $IC_{50}$  na široké škále rakovinných a primárních buněčných linií.
- Stanovení viability (cytotoxicity) u vybrané buněčné linie (HeLa WT) ošetřených látkami pomocí MTT testu.
- Porovnání účinku látek na červených krvinkách (hemolytický test).
- Zhodnocení morfologických změn pomocí konfokální mikroskopie u buněčné linie HeLa WT ošetřené látkami.

2) Zjistit, zda-li TLX a 7-OMeSB způsobují apoptózu pomocí:

- Stanovení hladiny kaspáz 3/7 jako jednoho z apoptických markerů u rakovinných buněk (HeLa) ošetřených TLX a 7-OMeSB.
- Vlivu látek na viabilitu buněk hela deficientních v proteinech Bax a Bak buněčné linie stanovené pomocí měření hladiny ATP.
- Detekce apoptických buněk pomocí průtokové cytometrie – barvení fosfatidylserinu jako markeru externalizace buněčné membrány během apoptózy.

## 5. MATERIÁLY A METODY

### 5.1. Chemikálie

- DMEM High glucose - Biosera
- FBS (fetální bovinní sérum) - Biosera
- Antibiotika/antimykotika - Biosera
- L-Glutamin - Biosera
- PBS (pufovaný fyziologický roztok) - Sigma
- Trypsin - Lonza
- DMSO (dimethylsulfoxid) - Honeywell-Riedel de Haën
- MTT (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) - Sigma
- Caspase-Glo 3/7 Assay Kit - Promega
- CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay - Promega
- Triton X-100 - Sigma
- RNase A solution - Sigma
- Formaldehyd 36-38% - Lachema a.s.
- FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry – Invitrogen by Thermofisher scientific
- Kaspázový inhibitor Z-VAD-FMK - Promega

### 5.2. Metodologie

#### 5.2.1. Izolace TLX a 7-OMeSB

TLX byl izolován z lyofilizované biomasy půdní sinice *Nostoc* sp. a 7-OMeSB byl získán z lyofilizované biomasy bentické sinice *Anabaena*. Izolace obou látek byla provedena školitelkou. Tyto látky byly obdrženy v čistém stavu a následně rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) jako zásobní roztok o koncentraci 0,5 mM.

#### 5.2.2. Kultivace buněk *in vitro*

Pro experimenty byly použity rakovinné buněčné linie HeLa WT a HeLa linie deficientní v proteinech Bax a Bak (Bax/Bak DKO). Buněčná linie HeLa je lidská linie izolovaná z karcinomu děložního hrdla Henrietty Lacksové. Již od roku 1951 je udržována v tkáňové kultuře v laboratořích po celém světě. V minulosti byla využita pro výzkum buněčného cyklu, vývoj vakcíny proti dětské obrně nebo pro studium chování lidských buněk ve vesmíru (King



*et al.*, 2006). HeLa DKO Bax/Bak je linie, která postrádá proteiny Bax a Bak. Tyto proteiny jsou důležité pro spuštění mitochondriální apoptické dráhy (Kirkin *et al.*, 2004) a jejich absence v buňce vede k neschopnosti vyloučení cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií a k resistenci buněk ke stimulům spouštějícím apoptózu (Danial, 2007).

Obě linie byly pěstovány v inkubátoru (Sanyo MCO-15AC) při teplotě 37° C a v atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Jelikož jsou dané linie adherentní, byly pro kultivaci použity kultivační lahve se speciálně upraveným povrchem. Pro kultivaci buněk bylo použito médium DMEM High Glucose obsahující fenolovou červen, což je acidobazický indikátor reflektující změny pH v médiu. Do 500 ml média bylo vždy přidáno 5,7 ml antibiotik/antimykotik, 5,7 ml L-Glutaminu a 57 ml fetálního bovinního séra (FBS). Antibiotika slouží k prevenci kontaminace v kultuře. L-Glutamin je aminokyselina sloužící jako rychle dostupný zdroj energie, když je karbohydrátový zdroj energie nedostačující nebo nedostupný. Jelikož L-Glutamin v tekuté formě poměrně rychle ztrácí stabilitu po vystavení teplotám vyšším 20° C, je potřeba ho přidávat dodatečně. Deriváty L-Glutaminu jsou důležité pro syntézu proteinů (HiMedia L-glutamin product information). FBS je díky obsahu růstových faktorů důležité pro proliferaci buněk.

S kultivací buněk úzce souvisí také tzv. pasážování buněk. Se vzrůstajícím počtem buněk dochází k zredukování množství živin v médiu a je tedy potřeba počet buněk snížit a médium vyměnit. Pasážování bylo prováděno 2-3x týdně a veškerá práce s buněčnými liniemi probíhala sterilně v laminárním boxu.

Před započítím práce byly následující chemikálie vytemperovány na 37° C po dobu 30 minut – živné médium DMEM, PBS a trypsin. Roztoky musí mít stejnou teplotu jako prostředí inkubátoru, aby buňky nezažily teplotní šok.

Z kultivační lahve bylo odstraněno médium se zredukovaným množstvím živin a adherované buňky byly 3x opláchnuty PBS od zbytku média a případných mrtvých buněk. Následně bylo přidáno na dno kultivační lahve 500-1000 µl trypsinu, který slouží k narušení kontaktu buněk s povrchem a umožňuje jejich uvolnění ode dna i od sebe navzájem. Trypsin bylo potřeba nechat působit 5 až 10 minut. Po uplynutí doby působení byl účinek trypsinu zastaven přidáním 10 ml média. Suspenze buněk byla následně promíchána serologickou pipetou a případné shluky buněk byly rozbity pipetou o stěnu kultivační lahve. Poté byla v lahvi

ponechána zhruba 1/3 suspenze buněk a zbylé 2/3 byly vylity do odpadu nebo přelity do zkumavky pro potřeby experimentu. Suspenze buněk v kultivační lahvi byla následně doplněna médiem a uložena zpět do inkubátoru.

Pokud byly buňky používány na experiment, byl jejich počet určován pomocí Cyrus počítačící komůrky.

### **5.2.3. Ošetření buněk látkami TLX a 7-OMeSB a identifikace IC<sub>50</sub> pro HeLa WT buňky**

HeLa WT buňky byly ošetřeny dvěma látkami – TLX a 7-OMeSB v rozmezí koncentrací od 1,5 nM po 5000 nM a viabilita byla stanovena pomocí ATP - CellTiter-Glo® Luminescent assay (Promega, USA) po 72h inkubace. Toto velké rozmezí koncentrací bylo zvoleno za účelem zjištění účinnosti obou látek, tedy v jakých koncentracích vykazují hodnotu IC<sub>50</sub>. Hodnota IC<sub>50</sub> obou látek byla stanovena pomocí nelineární regrese v programu GraphPad Prism version 5.03.

### **5.2.4. MTT test**

Pro testování viability buněčných linií HeLa WT byl použit MTT test. Je to kolorimetrický test, který využívá redukce žluté tetrazoliové soli 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na fialový krystalický formazan (Mosmann, 1983). MTT je v buňce redukováno na formazan pomocí NAD(P)H dependentních oxidoreduktáz a dehydrogenáz metabolicky aktivních buněk. Vzniklý formazan byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu. Výsledkem testu je tedy metabolická aktivita či míra NADH produkce živých buněk (Berridge *et al.*, 2005).

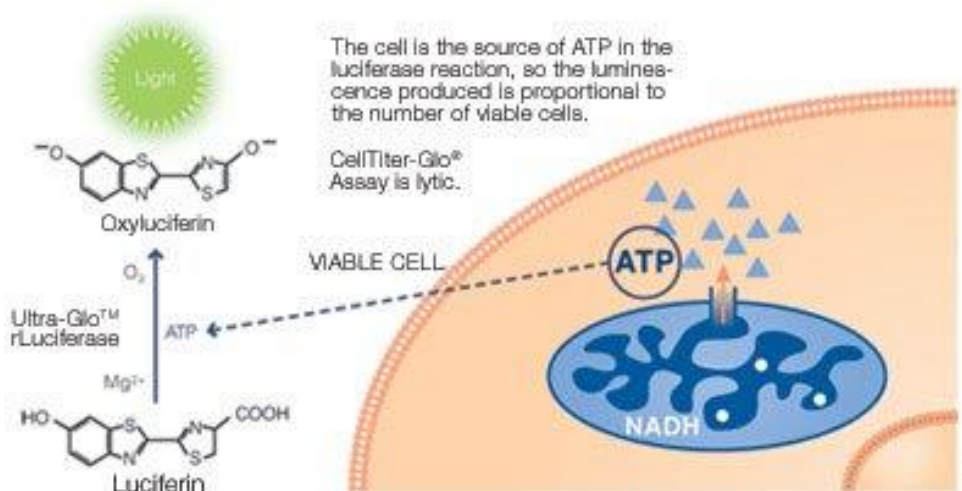
Látky byly testovány ve třech biologických i technických triplikátech v 96 jamkových mikrotitračních destičkách ve třech expozičních časech 24 h, 48 h, 72 h. Koncentrace látek byla 50 a 500 nM.

Po uplynutí daného expozičního času bylo do 200  $\mu$ l jamky v mikrotitrační destičce přidáno 10  $\mu$ l MTT roztoku (koncentrace 4 mg/ml PBS). Buňky byly s MTT inkubovány 4 hodiny při 37° C. Poté byla destička stočena (15 min, 2000 RPM) a médium bylo mechanicky odstraněno. Vzniklé krystalky formazanu byly rozpuštěny v 200  $\mu$ l DMSO po dobu 30 min. Absorbance

byla měřena při měřicí vlnové délce 590 nm a referenční vlnové délce 640 nm na spektrofotometru Tecan SUNRISE.

### 5.2.5. Testování viability pomocí ATP

Jako další způsob testování viability na HeLa WT byl použit kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Jedná se o homogenní metodu determinace viability buněk na základě množství ATP přítomného uvnitř metabolicky aktivních buněk. ATP přítomné v buňkách katalyzuje přeměnu oxyluciferinu z přidaného činidla na luciferin (Obr.5), který vydává luminiscenční signál. Luminiscenční signál je tedy přímo úměrný množství ATP v buňkách (Promega, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin).



Obr. 5: Reakce přeměny luciferinu na oxyluciferin (Zdroj: Promega, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin).

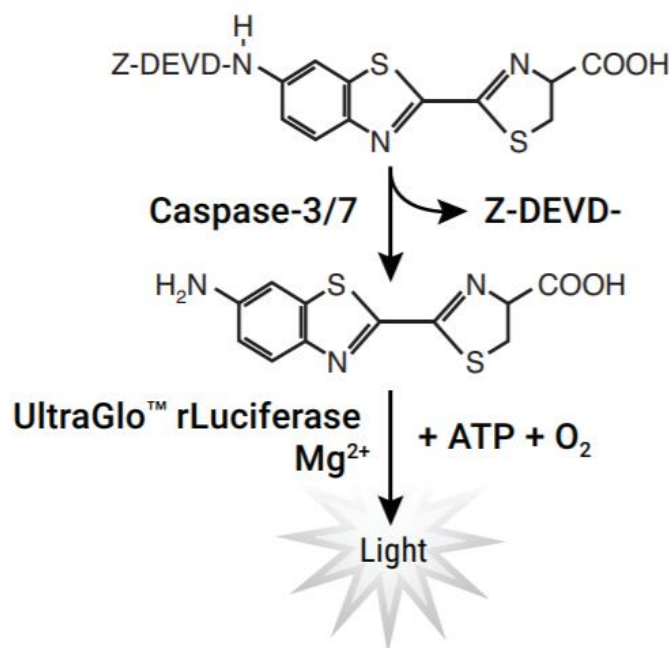
Test byl proveden dle pokynů výrobce a luminiscenční signál byl poté změřen na spektrofotometru Tecan. Látky byly testovány ve třech biologických i technických triplicátech v 96 jamkových mikrotitračních destičkách ve třech expozičních časech 24 h, 48 h, 72 h. Koncentrace látek byla 50 a 500 nM.

### 5.2.6. Měření hladiny kaspáz 3/7

Kaspázy jsou vnitrobuněčné proteázy, které jsou v buňce přítomny hlavně jako neaktivní prekurzory a jsou aktivovány během apoptózy (Alberts *et al.*, 2014).

Pro měření hladiny těchto enzymů byl použit kit Caspase-Glo® 3/7 Assay, který obsahuje kaspázový substrát s DEVD sekvencí. Tento substrát při rozštěpení kaspázami (Obr.6) uvolní aminoluciferin, substrát luciferázy používaný při produkci světla. Hladina kaspáz 3/7 je tedy

přímo úměrná vyloučenému luminiscenčnímu signálu (Promega, Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin).



Obr. 6: Štěpení luminogenního substrátu kaspázami 3/7 (Promega, Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin).

Test byl proveden dle pokynů výrobce a luminiscenční signál byl poté změřen na spektrofotometru Tecan. Látky byly testovány ve třech biologických i technických triplikátech v 96 jamkových mikrotitračních destičkách ve třech expozičních časech 24 h, 48 h, 72 h. Koncentrace látek byla 50 a 500 nM.

#### 5.2.6.1. Z-VAD-FMK

Z-VAD-FMK (karbobenzody-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon) je širokospektrální inhibitor kaspáz, který je propustný přes buněčnou stěnu. Účinně inhibuje kaspázy -1 až -10, s výjimkou kaspázy -2. Inhibice kaspáz tímto inhibitorem probíhá nevratnou vazbou inhibitoru na jejich katalytické místo. Potlačení aktivity kaspáz inhibitorem Z-VAD-FMK může dojít k blokaci různých biologických procesů, včetně apoptózy (Chauvier *et al.*, 2007; Slee *et al.*, 1996).

Při testování buněčných linií HeLa WT byla část těchto buněk ošetřena Z-VAD-FMK inhibitorem o koncentraci 20 μM za expozičního času 48 h.

### **5.2.6.2. Barvení buněčných jader (Hoechst 33342) a jejich focení na mikroskopu**

Barvení buněčných jader bylo provedeno pro zjištění počtu buněk po daném ošetření koncentracemi 50 nM a 500 nM obou toxinů. Počet buněk byl důležitý pro výpočet LCQ (Luminiscence Cel Quota) kaspáz. Hladina kaspáz na buňku v ošetřených buňkách byla tedy vztažena k hladině kaspáz na buňku v kontrolních buňkách a vynásobena 100 %, čímž byla získána finální hodnota zvýšení kaspáz.

Pro barvení byla použita fluorescenční barva Hoechst 33342, která se používá pro barvení živých buněk. Hoechst 33342 nabarví buněčné jádro tím, že se naváže na DNA.

Barvení jader probíhalo následujícím způsobem. 96 jamková mikrotitrační destička byla po uplynutí daného expozičního času vložena do centrifugy (800 RPM, 3 min), aby se všechny buňky usadily ke dnu. Poté bylo odebráno 100 ul média z jamek a bylo přidáno 100 ul roztoku média DMEM s barvou Hoechst 33342 (2 kapky barvy na 1 ml média). Destička s barvou byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 20 minut přikryta alobalem, aby se fluorescenční barva nevyšvitila.

Po uplynutí inkubační doby byly jednotlivé jamky vyfoceny fluorescenčním mikroskopem AXIO Observer Z.1. V každé mikrotitrační destičce byla snímána vždy celá plocha jamky. Pro spočítání buněk v celé jamce byl použit program ImageJ.

### **5.2.7. Hemolytický test**

Hemolýza je destrukce červených krvinek (BMA, 2007), při které dochází nejdříve k narušení membrány různými fyzikálními nebo chemickými činiteli a následně k vylití hemoglobinu do okolí buňky (Trojan *et al.*, 2003).

Hemolytický test byl proveden za účelem zjištění hemolytické aktivity TLX a 7-OMeSB na červených krvinkách. Tento test byl laskavě vykonán Kumarem Sauravem Ph.D. a Bc. Markétou Macho s použitím protokolu podle (Saurav & Kannabiran, 2012).

### **5.2.8. Velkokapacitní screening**

Velkokapacitní screening slouží k testování biologické aktivity různých sloučenin. Pro naši potřebu bylo provedeno testování potence TLX a 7-OMeSB na třech primárních (Tab. II) a na osmnácti rakovinných liniích (Tab. III). Toto testování proběhlo v laboratořích CZ-

OPENSREEN Národní infrastruktury chemické biologie v Praze. Buňky byly nasazeny do 1536 jamkových destiček v koncentraci 1000 buněk na jamku a následně ošetřeny látkami o koncentraci 0 –13 931 nM, přičemž po 72 hodinách expozice byla vyhodnocena viabilita pomocí CellTiter Glo (viz kapitola 5.2.5).

Tab. II: Primární buněčné linie.

Název a popis buněčné linie	
BJ	Primární fibroblasty z předkožky penisu
RPE1	Primární buňky ze sítnice oka
HEK 293T	Primární buňky ledvin

Tab. III: Rakovinné buněčné linie.

Název a popis buněčné linie	
D283 Med	CNS meduloblastom
K562	Chronická myeloidní leukémie
U2OS	Osteosarkom
Capan-2	Karcinom slinivky břišní
HCT 116	Kolorektální karcinom
SW 480	Kolorektální adenokarcinom
Hep 2G	Hepatocelulární karcinom
MDA-MB 231	Adenokarcinom prsu
MCF7	Adenokarcinom prsu
RKO	Adenokarcinom tlustého střeva
HT-29	Adenokarcinom tlustého střeva
HL-60	Akutní myeloidní leukémie
DU 145	Adenokarcinom prostaty
Caov-3	Adenokarcinom vaječníku
U-937	Histiocytární lymfom
AsPC-1	Adenokarcinom slinivky břišní
BxPc-3	Adenokarcinom slinivky břišní
SJCRH30	Rhabdomyosarkom

### 5.2.9. Barvení jádra, aktinu a tubulinu

Barvení jádra, aktinu a tubulinu bylo provedeno za účelem zjištění vlivu TLX a 7-OMeSB na morfologii rakovinné buněčné linie HeLa.

Byly použity tři fluorescenční barvy – DAPI, Alpha Tubulin Mouse monoclonal Antibody-Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 555 Phalloidin. DAPI je fluorescenční barva, která se váže na AT bohaté úseky v dsDNA a barví tedy jádro. Alexa Fluor 488 je fluorescenční barva, která barví tubulin. Poslední barva Alexa Fluor 555 Phalloidin umožňuje nabarvení aktinu pomocí navázání phalloidinu na F-aktin.

Pro experiment byla použita 12 jamková mikrotitrační destička, ve které byly buňky (60 000 buněk/jamku) narostlé na sklíčkách se speciálním adherentním povrchem. Koncentrace látek byla 50 a 500 nM za expozičního času 24h.

Barvení probíhalo dle následujícího postupu:

- 1) Mechanické odstranění média z jamek.
- 2) Oplach PBS, 2-3x 1ml.
- 3) 500 ul/jamka 3,7% roztoku formaldehydu v PBS, 15 min inkubace PT (Pokožová teplota). Roztok formaldehydu zde slouží jako fixátor buněk.
- 4) Oplach PBS, 2-3x 1ml.
- 5) 500 ul/jamka 0,25% roztoku Tritonu X-100 v PBS, 5 min inkubace PT. Roztok Tritonu X-100 je důležitý pro permeabilizaci membrány, aby se barva mohla dostat dovnitř buňky.
- 6) Oplach PBS, 2-3x 1ml.
- 7) 500 ul/jamka 1% roztoku BSA v PBS (0,1 g BSA na 10 ml PBS), 1h inkubace PT. BSA (Hovězí sérový albumin) se používá jako blokující činidlo k prevenci nespecifického vázání antigenů a protilátek k povrchu jamky v mikrotitrační destičce.
- 8) Alpha Tubulin Mouse monoclonal Antibody (A11126) – 250 ul/jamka (6 ul na 3 ml 1% BSA) inkubace 3 h PT. Tato protilátka se používá k vizualizaci mikrotubulů v zafixovaných buňkách.
- 9) Oplach PBS, 2-3x 1 ml.
- 10) 15 ul Alexa Fluor 488 Rabbit Anti-Mouse IgG Secondary Antibody (A11001) + 3 ml PBS + 6 kapek DAPI (1 kapka = 40 ul) → 250 ul/ jamku, 10 min inkubace ve tmě PT.
- 11) → přidání roztoku 75 ul Alexa Fluor 555 Phalloidin + 3 ml PBS, 250 ul/jamka, inkubace RT 20 min.
- 12) Oplach PBS, 3x 1 ml.
- 13) Napipetování 10 ul lepidla (Kapka DAPI + 1 ml Mowiolu), na podložní sklíčko a následné přilepení sklíčka s buňkami.

Hotové permanentní preparáty byly vyfoceny druhý den na konfokálním mikroskopu Zeiss Axio Imager Z2 Mgr. Petrou Divokou.

#### **5.2.10. Barvení fosfatidylserinu a vyhodnocení průtokovou cytometrií**

Za účelem zjištění, jestli působení TLX a 7-OMeSB způsobuje externalizaci buněčné membrány, jako jeden z důležitých markerů apoptózy, bylo provedeno barvení

fosfatidylserinu s vyhodnocením na průtokovém cytometru. Pro tyto účely byla použita sada FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry. Fosfatidylserin je fosfolipid, který je součástí cytoplazmatické membrány živočišných buněk (Alberts *et al.*, 2014). U zdravých živých buněk se nachází na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, avšak po spuštění apoptózy v buňce je přesunut na vnější stranu membrány. Jedna z použitých barev byla annexin V, což je lidský antikoagulant s vysokou vazebnou afinitou na fosfatidylserin. Součástí sady byl rekombinantní annexin V, který je po navázání na fluorescein FITC annexin V schopen navázat se na apoptické buňky a odlišit je tak od ostatních. Sada obsahovala také roztok červené fluorescenční barvy propidium jodid, který je nepropustný pro apoptické a živé buňky, ale barví buňky mrtvé vazbou na jejich DNA (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry Product Information). Propidium jodid je také schopen rozeznat v jaké fázi buněčného cyklu se buňka zrovna nachází (Galluzzi & Rudquist, 2019).

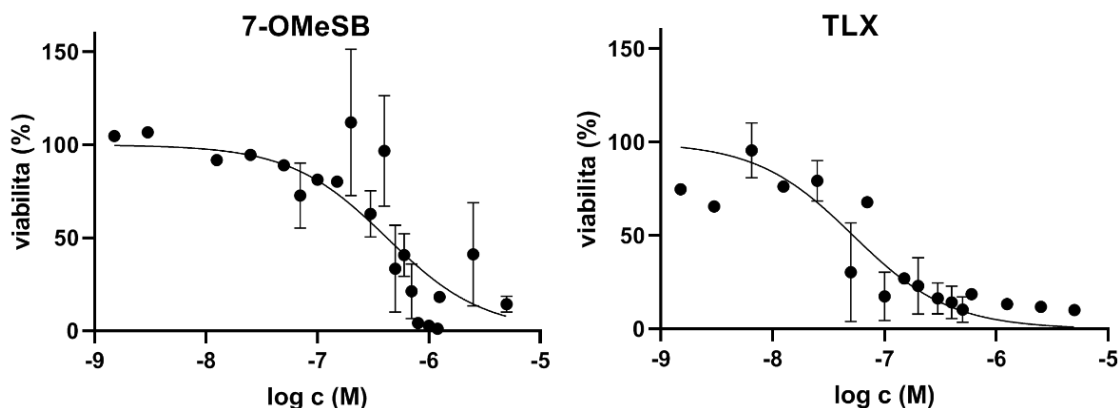
Buňky byly ošetřeny oběma látkami o koncentracích 50 nM a 500 nM v expozičních časech 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 24 h a 48 h. Použit byl také induktor apoptózy staurosporin o koncentracích 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M a 3  $\mu$ M. Barvení bylo provedeno dle pokynů výrobce a nabarvené buněčné populace byly otestovány v průtokovém cytometru Apogee A50 Micro.



## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Vyhodnocení IC<sub>50</sub> TLX a 7-OMeSB na HeLa WT buněčné linii

Pomocí CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kitu byla zjištěna hodnota IC<sub>50</sub> pro TLX a 7-OMeSB u HeLa WT buněčné linie. Hodnota IC<sub>50</sub> byla stanovena 50 nM pro TLX a 500 nM pro 7-OMeSB. Ve většině následujících experimentů bylo proto pracováno jen s těmito koncentracemi. Porovnání potence obou toxinů je možné vidět na Obr. 7.

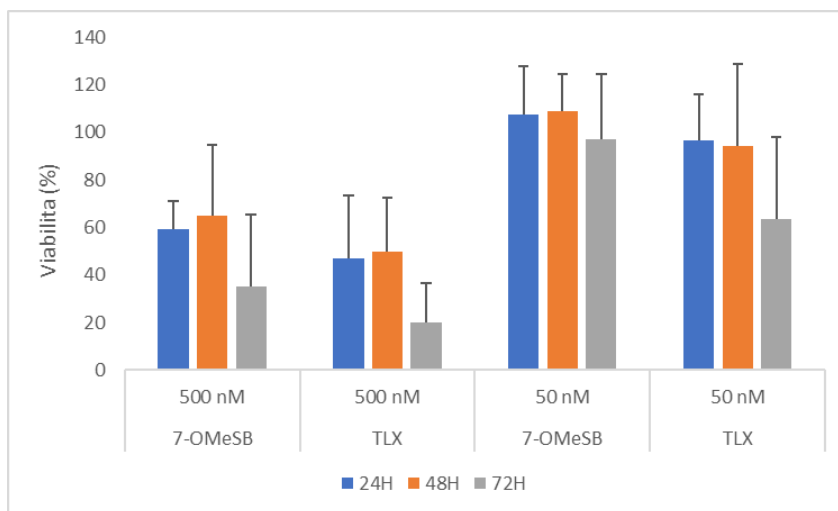


Obr. 7: Porovnání potence 7-OMeSB a TLX.

### 6.2. Hodnocení viability

#### 6.2.1. MTT test

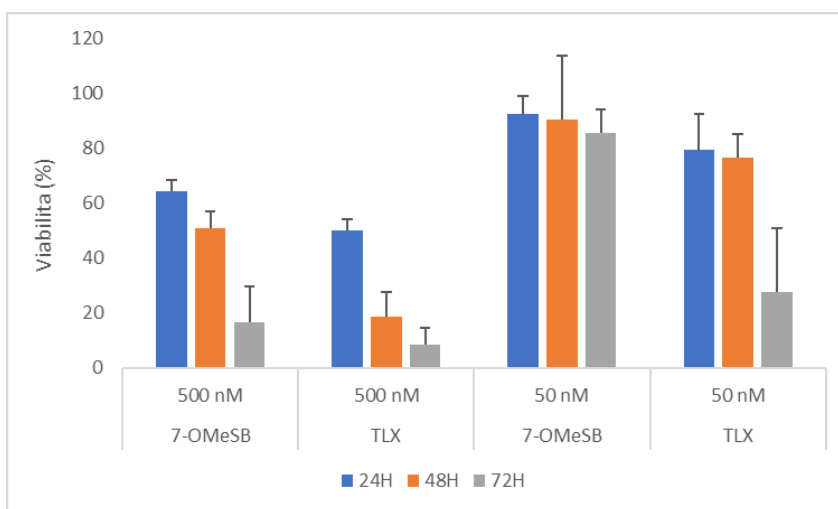
MTT testem byla zjištěna viabilita buněčné linie HeLa WT v časech 24 h (modrý sloupec), 48 h (oranžový sloupec) a 72 h (šedý sloupec) po expozici TLX a 7-OMeSB. Na grafu (Obr.8) je vidět, že TLX vykazuje vyšší toxicitu než 7-OMeSB ve všech expozičních časech. Při ošetření buněk koncentrací 50 nM nebyl pozorován pokles viability u 7-OMeSB oproti TLX, kde byl již větší pokles. Po ošetření buněk koncentrací 500 nM byl zpozorován výrazný pokles u obou toxinů, avšak u TLX byl opět daleko větší.



Obr. 8: Vyhodnocení viability HeLa WT buněk pomocí MTT testu v 24 h, 48 h a 72 h.

### 6.2.2. ATP

Vyhodnocení viability na buněčné linii HeLa WT pomocí ATP bylo provedeno pomocí CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kitu ve třech expozičních časech – 24 h, 48 h, 72 h po expozici TLX a 7-OMeSB. V grafu (Obr.9) je pozorován stejný trend jako v grafu u MTT testu. Tolytoxin vykazuje vyšší cytotoxicitu ve všech expozičních časech a viabilita má klesající tendenci s expozičním časem. Pokles viability nebyl pozorován u buněk ošetřených 7-OMeSB (50 nM) ani po 72 hodinách expozice ve srovnání s výrazným poklesem viability po léčbě TLX (50 nM). Významné snížení viability bylo pozorováno u buněk ošetřených TLX (500 nM) ve srovnání s mírnějším účinkem 7-OMeSB. Tato data podporují výsledky získané pro jiné buněčné linie (Tab. IV) a ukazují jasný rozdíl mezi potencemi toxinů.

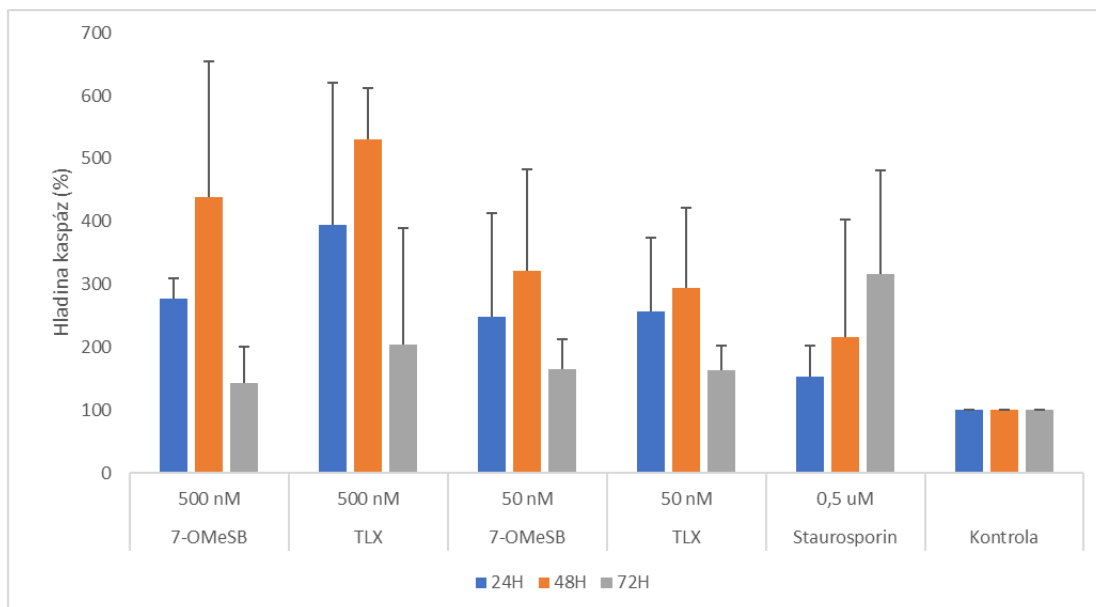


Obr. 9: Vyhodnocení viability HeLa WT buněk pomocí kitu CellTiter Glo v 24 h, 48 h a 72 h.

### 6.3. Hodnocení buněčné smrti

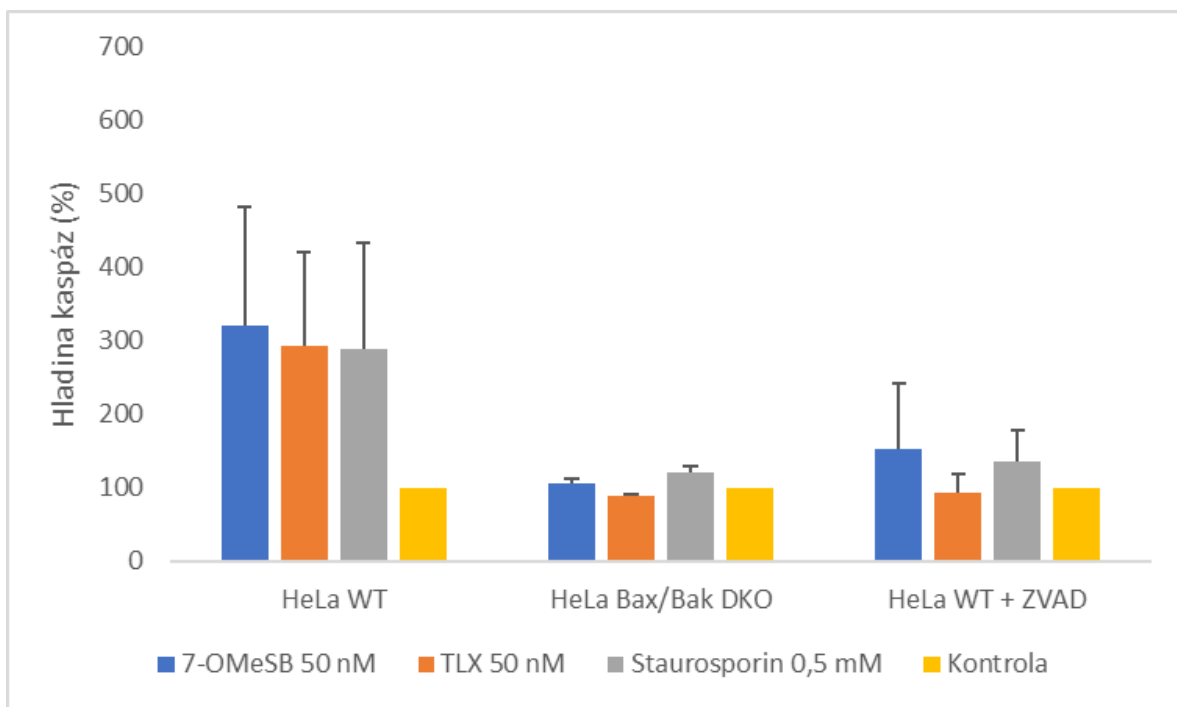
#### 6.3.1. Hladina kaspáz 3/7

Experimenty byly provedeny pomocí Caspase-Glo® 3/7 Assay kitu v expozičních časech 24 h, 48 h a 72 h pro použité koncentrace látek 500 nM a 50 nM (Obr.10). Jako pozitivní kontrola byl použit induktor apoptózy staurosporin (0,5  $\mu$ M). Hlavní nástup aktivity kaspáz 3/7 byl zaznamenán 48 h po ošetření buněk oběma látkami. Pokles aktivity kaspáz 3/7 naopak nastal po 72 h, což naznačuje, že buňky podstoupily apoptózu hlavně po 48 h.

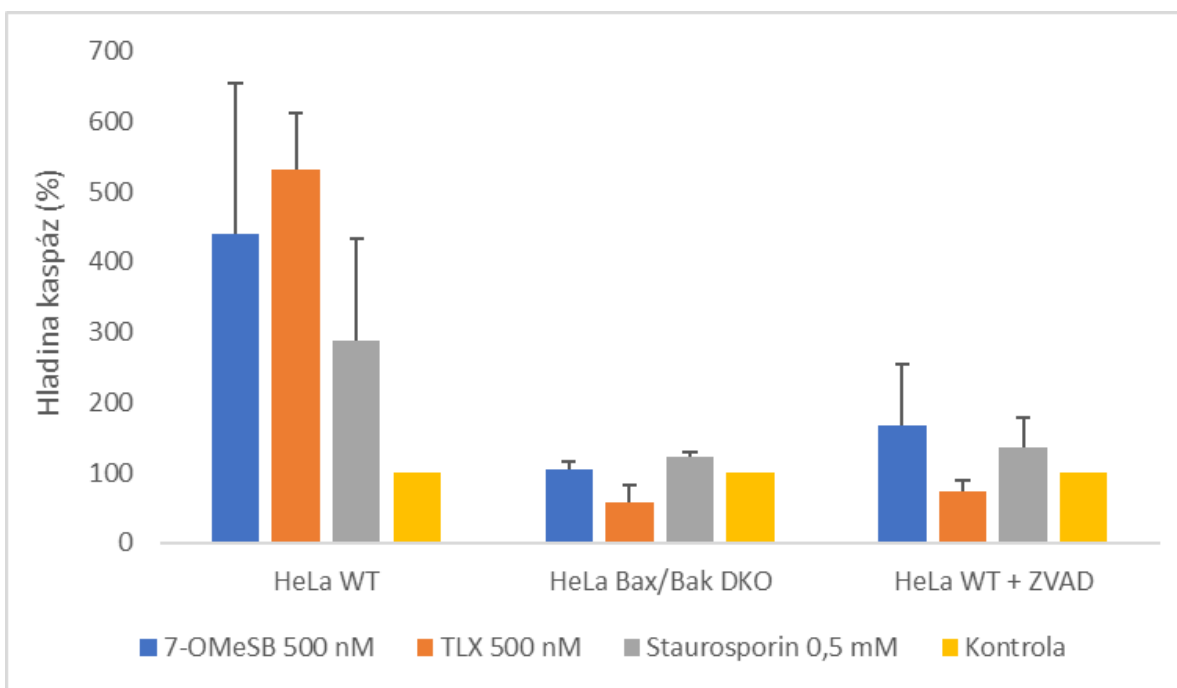


Obr. 10: Vyhodnocení hladiny kaspáz 3/7 v expozičních časech 24 h, 48 h a 72 h.

Následující grafy (Obr. 11 a 12) ukazují vyhodnocení hladiny kaspáz 3/7 ve 48 h. Pro experimenty byly použity 2 rakovinné linie linie HeLa WT (modrý sloupec) a HeLa DKO Bax/Bak (oranžový sloupec). Šedý sloupec označuje buňky HeLa WT ošetřené kaspázovým inhibítorem ZVAD. Data ukazují snížení aktivity kaspáz v HeLa Bax/Bak DKO, což naznačuje, že zde probíhá zapojení na mitochondrii závislé vnitřní dráhy apoptózy. Luminiscenční signál kaspáz byl snížen také pomocí inhibitoru kaspáz Z-VAD-FMK.



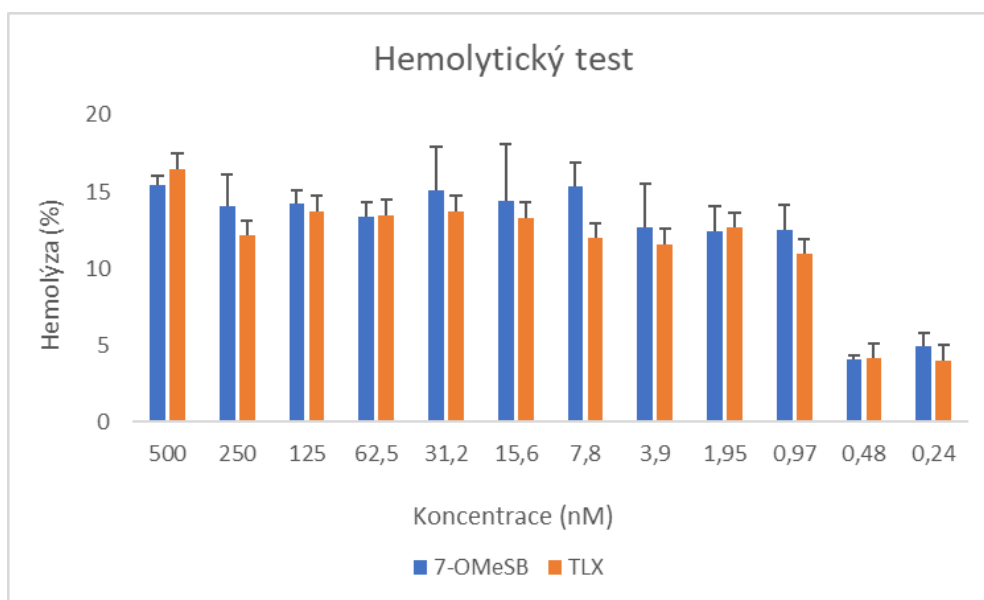
Obr. 11: Vyhodnocení hladiny kaspáz 3/7 v expozičním čase 48 h při koncentraci látky 50 nM.



Obr. 12: Vyhodnocení hladiny kaspáz 3/7 v expozičním čase 48 h při koncentraci látky 500 nM.

#### 6.4. Hemolytický test

Hemolytický test byl proveden v rozmezí koncentrací 500 – 0,24 na buněčné linii HeLa WT. Z grafu (Obr.13) je vidět, že se zvyšující se koncentrací TLX i 7-OMeSB, se nepatrně zvyšuje i procento hemolýzy, tedy destrukce červených krvinek, ačkoli procento hemolýzy (15 %) není nikterak významné ani při nejvyšších testovaných koncentracích.



Obr. 13: Vyhodnocení hemolytického testu.

#### 6.5. Velkokapacitní screening

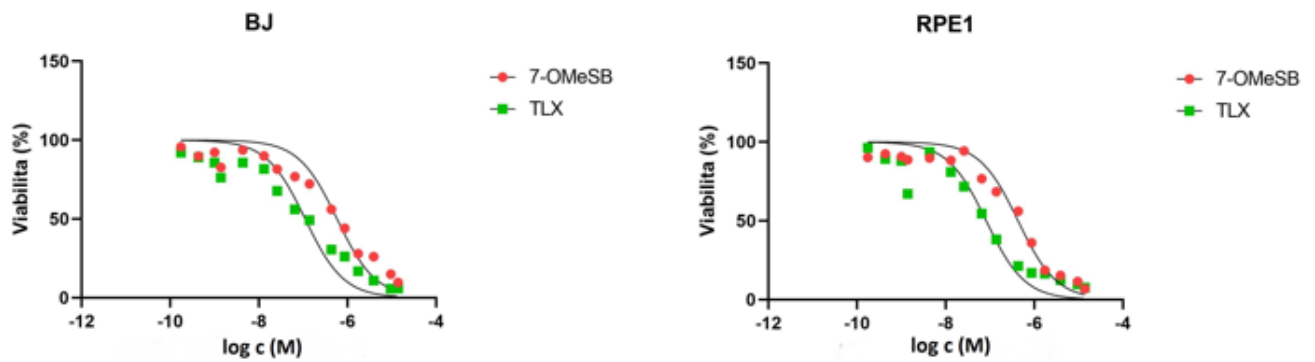
Ve výsledcích velkokapacitního screeningu se potence TLX a 7-OMeSB u různých buněčných linií značně lišily a  $IC_{50}$  bylo možné najít v rozmezí začínajícím na 16,29 nM a končícím na 8090,9 nM. TLX vykazoval ve srovnání s 7-OMeSB výrazně silnější cytotoxický účinek (Tab. IV). Obě sloučeniny vykazovaly nejvyšší účinnost proti buněčným liniím HL-60 (krev, leukémie), D-283 Med (mozek, blastom), U-937 (krev, lymfom) a MDA-MD 231 (prsa, karcinom). Primární buňky RPE1 (sítnice, epitelální buňky) a BJ (předkožka, fibroblasty) byly méně citlivé na účinek sloučenin. Za zmínku také stojí, že linie Hep 2G, MCF-7 a HEK-293T byly rezistentní vůči účinku obou látek takovým způsobem, že nebyly zaznamenány žádné toxické účinky až do nejvyšší koncentrace.  $IC_{50}$  všech 21 testovaných linií jsou vyobrazeny v tabulce IV.

Tab. IV: Hodnoty IC<sub>50</sub> TLX a 7-OMeSB u jednotlivých buněčných linií.

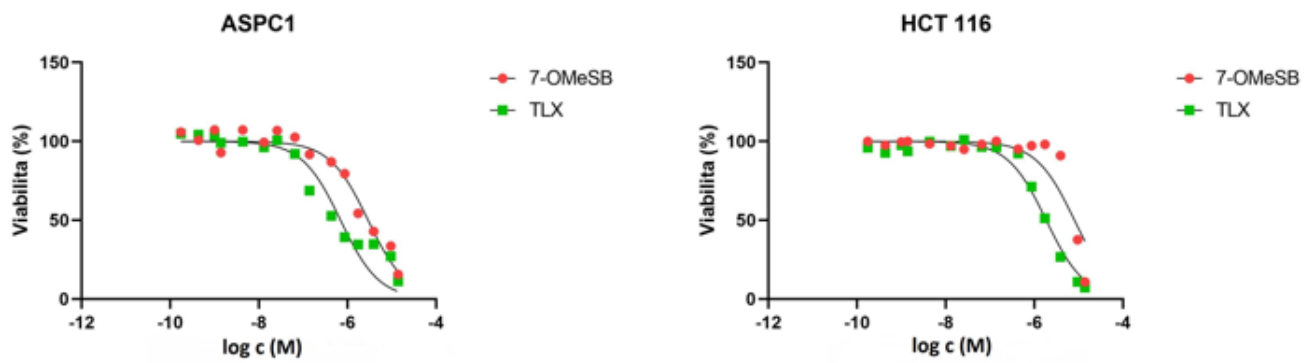
Název a původ buněčné linie	IC <sub>50</sub> (nM)	
	TLX	7-OMeSB
HL-60 (krev, leukémie)	16,29296	102,8016
D283 (CNS, meduloblastom)	28,9068	172,1869
U-937 (krev, lymfom)	29,71666	211,8361
MDA-MB 231 (prsna, adenokarcinom)	48,86524	347,9
RKO (tlusté střevo, karcinom)	59,29253	347,4
RPE1 (sítnice, primární b. linie)	82,41381	430,5266
BJ (předkožka, primární b. linie)	111,4295	583,4451
Capan-2 (slinivka břišní, karcinom)	115,08	1069,055
Caov-3 (vaječník, adenokarcinom)	139,3157	1610,646
K562 (krev, leukémie)	142,8894	783,4296
HT-29 (tlusté střevo adenokarcinom)	176,6038	1161,449
BxPc-3 (slinivka břišní, adenokarcinom)	216,7704	1828,1
U2OS (kostra, sarkom)	257,6321	1849,269
DU 145 (prostata, adenokarcinom)	475,3352	3191,538
SW 480 (tlusté střevo, adenokarcinom)	659,1739	2564,484
SJCRH30 (svalstvo, sarkom)	682,3387	3326,596
AsPC-1 (slinivka břišní, adenokarcinom)	699,842	2930,893
HCT 116 (tlusté střevo, karcinom)	1862,087	8090,959
Hep 2G (játra, karcinom)	Neobjeveno	Neobjeveno
MCF-7 (prsna, adenokarcinom)	Neobjeveno	Neobjeveno
HEK 293T (ledviny, primární b. linie)	Neobjeveno	Neobjeveno

Jelikož obě látky působí rozdílně na různé buněčné linie, na následujících stránkách jsou vyobrazeny grafy (Obr.14) působení látek se dvěma primárními buněčnými liniemi BJ (primární fibroblasty z předkožky penisu) a RPE1 (primární buňky ze sítnice oka). Následně byly vybrány dvě rakovinné buněčné linie, které byly vůči oběma toxinům rezistentní – HCT 116 (kolorektální karcinom) a Hep2G (hepatocelulární karcinom) a dvě rakovinné buněčné linie, které byly citlivé – D283 Med (CNS meduloblastom) a MDA-MB231 (adenokarcinom prsu).

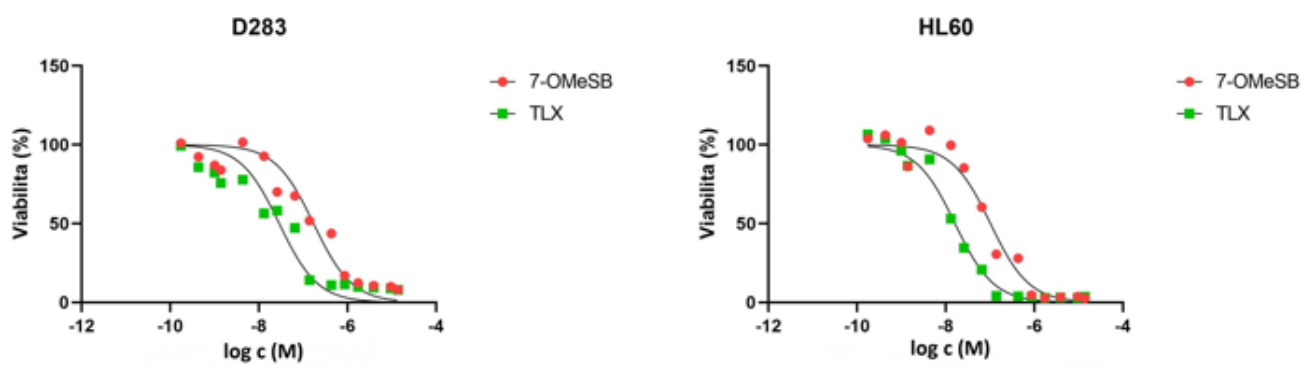
### Primární buněčné linie:



### Rezistentní rakovinné buněčné linie:



### Citlivé rakovinné buněčné linie:

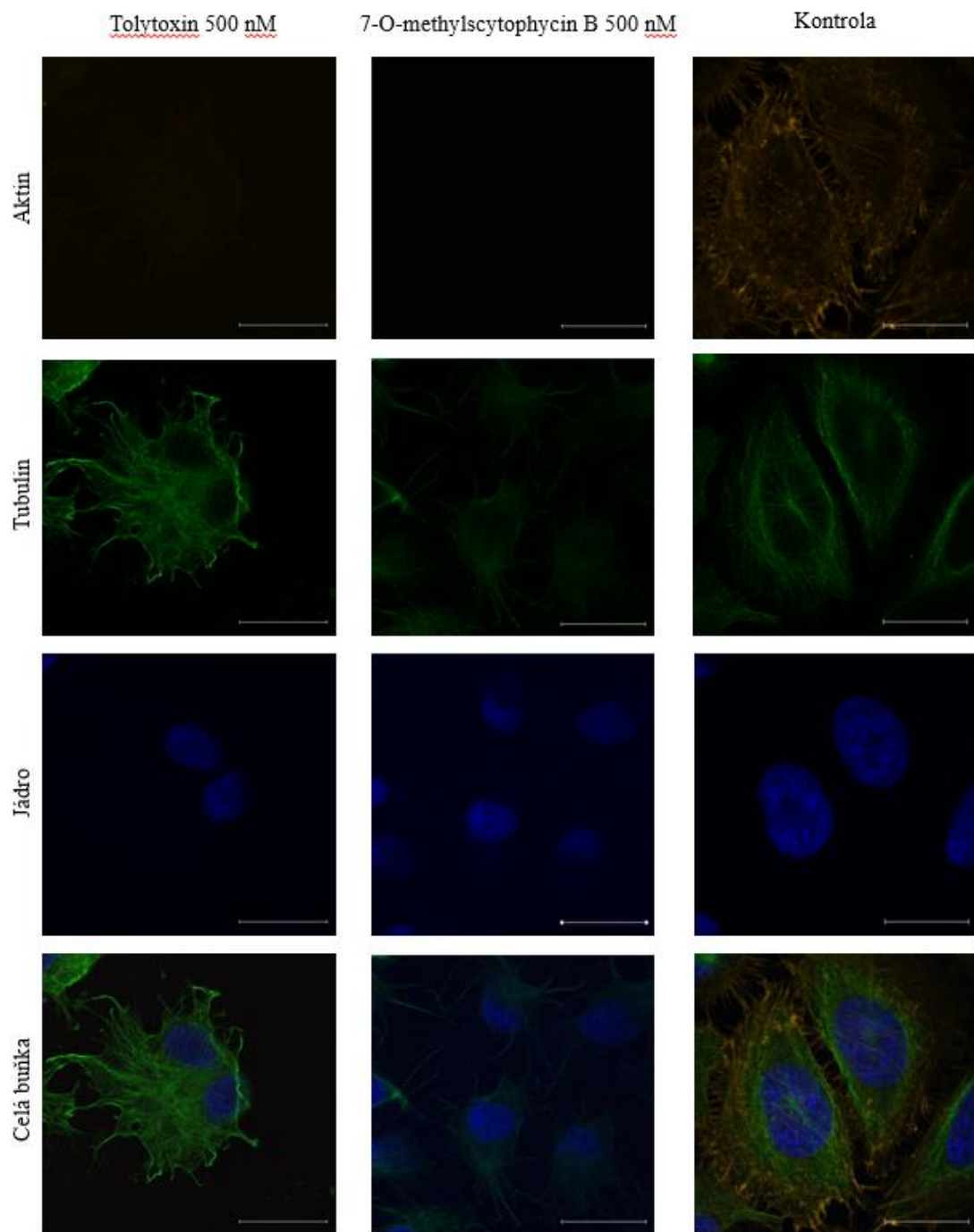


Obr. 14: Velkokapacitní screening – 7-OMeSB a TLX.

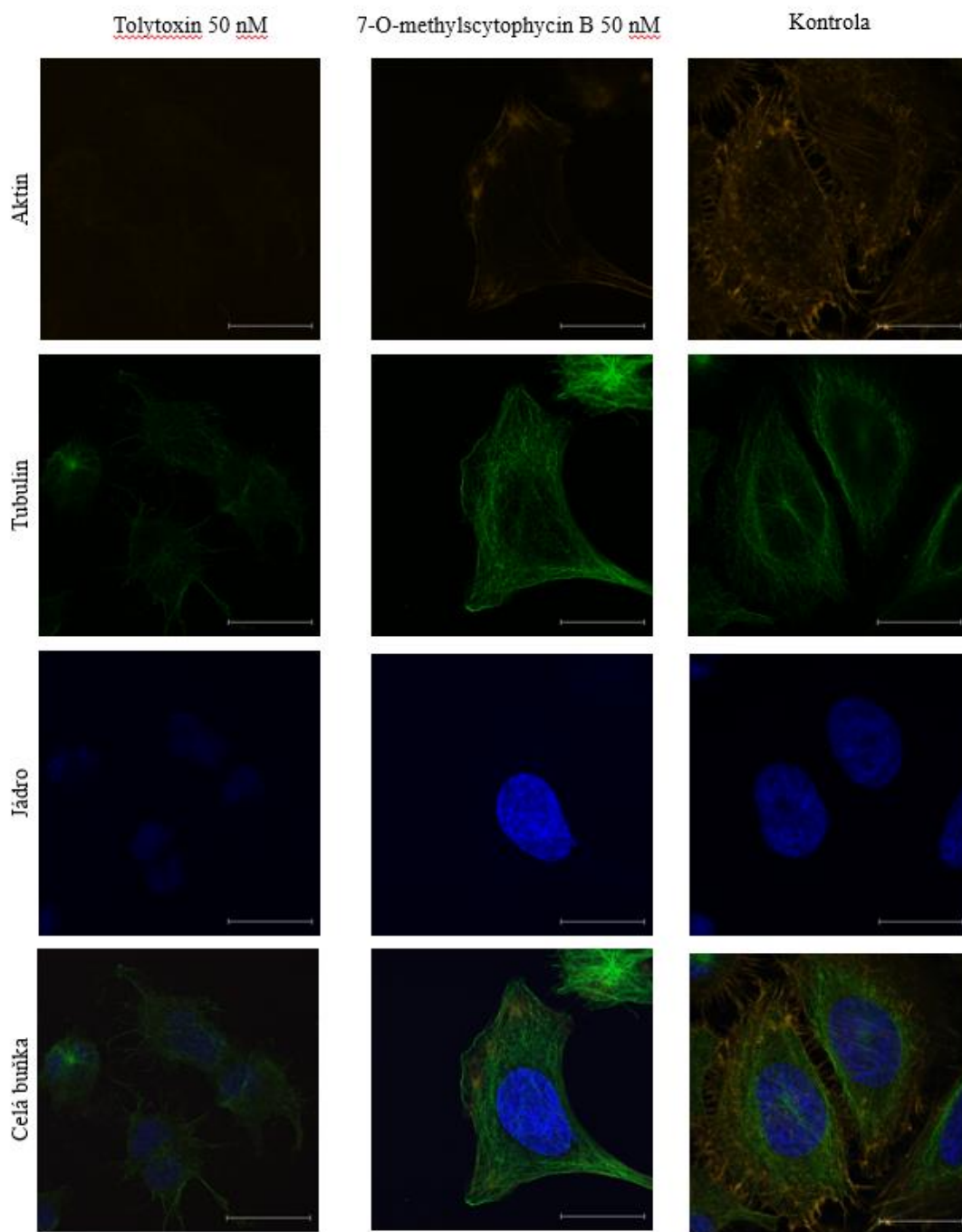
## **6.6. Morfologie buněčné linie HeLa WT po 24h expozice TLX a 7-OMeSB**

Pro lepší pochopení působení látek na rakovinnou buněčnou linii HeLa WT byly buňky nabarveny třemi fluorescenčními barvivy - DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), které barví jádro, Alexa Fluor 555 Phalloidin, které barví aktin a Alexa Fluor 488 barvicí tubulin. Nabarvené vzorky byly následně vyfoceny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss Axio Imager Z2. TLX i 7-OMeSB byly použity v koncentracích 50 nM a 500 nM. Focení proběhlo po expozičním čase 24 h. Výsledek focení je vyobrazen na následujících fotografiích (Obr. 15. a 16.) a je vidět, že obě látky viditelně depolymerizují aktin. Na tubulinu ani na jádrech není vidět žádná výrazná změna.





Obr. 15: Morfologie buněčné linie HeLa WT po 24 h. Koncentrace toxinů 500 nM.

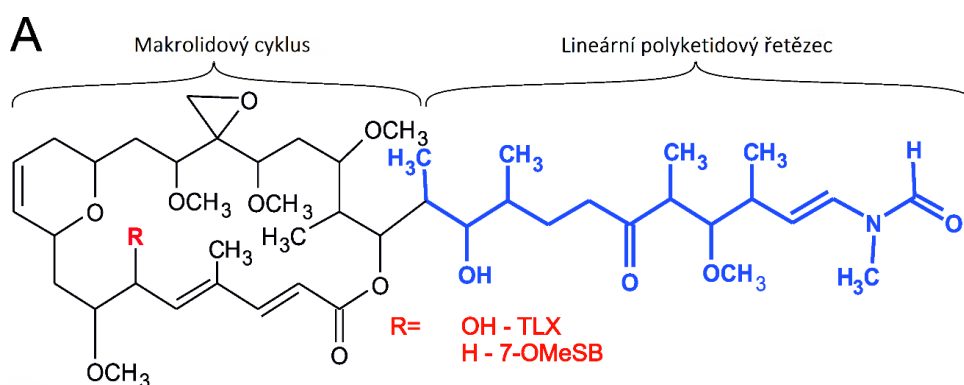


Obr. 16: Morfologie buněčné linie HeLa WT po 24 h. Koncentrace toxinů 50 nM.

## 7. DISKUZE

### 7.1. Hodnocení viability

Ve vyhodnocení viability u MTT testu i u ATP se ukazuje stejný trend, kde TLX vykazuje vyšší toxicitu než 7-OMeSB v expozičních časech 24 h, 48 h a 72 h. Struktura lineárního polyketidového řetězce, který je hlavním činitelem při narušení polymerizace aktinu (Allingham et al., 2006) je u obou látek identická. Jediným rozdílem je přítomnost hydroxylové skupiny na C6 v makrolidovém cyklu u TLX, zatímco u 7-OMeSB tato hydroxylová skupina chybí (Obr.17). I tento nepatrný rozdíl v hlavové části molekuly obou toxinů má velký vliv na jejich potenci, což ukazují výsledky experimentů. Bylo by však vhodné provést další výzkum a upřesnit roli hlavové části molekuly při působení na aktin. Podobný výzkum byl proveden o jiných sloučeninách, avšak u scytophycinů nebyl proveden vůbec (Allingham et al., 2006; Klenchin et al., 2003).



Obr. 17: Rozdíl ve strukturách TLX a 7-OMeSB.

Mechanismus působení TLX na aktin byl odvozen od jiných makrolidů s velmi podobnou strukturou lineárního polyketidového řetězce, jako je například kabiramide C, reidispongiolide, nebo jaspisamide A. Látka se naváže na konec vlákna F-aktinu, především na hydrofobní štěrbinu aktinu, která se nachází mezi podjednotkami 1 a 3 a běžně slouží k navázání monomerního G-aktinu. Následně dojde ke vmezeření lineárního řetězce do štěrbinu, které může vyústit v oddělení nebo narušení navázání G-aktinu. Polymerní vlákno F-aktinu je tak narušeno. O makrolidovém cyklu se předpokládá, že přichytí celou molekulu k aktinu pomocí interakcí s aminokyselinovými zbytky u vstupu hydrofobní štěrbinu (Allingham et al., 2006; Klenchin et al., 2003). Nicméně, jak již bylo zmíněno výše, data naznačují, že hlavová část molekuly hraje daleko větší roli v depolymerizaci aktinu.

## 7.2. Hodnocení buněčné smrti

Po provedení experimentu za účelem zjištění hladiny kaspáz 3/7 ve třech expozičních časech 24 h, 48 h a 72 h, byl zaznamenán největší nárůst hladiny kaspáz 3/7 ve 48 h. Pokles aktivity kaspáz 3/7 naopak nastal po 72 h, z čeho se dá usuzovat, že buňky podstoupily apoptózu zejména po 48 h.

Jelikož byl největší nárůst hladiny kaspáz 3/7 zaznamenán ve 48 h, byl proveden experiment s buněčnou linií HeLa WT, HeLa DKO Bax/Bak a inhibítorem kaspáz Z-VAD-FMK v tomto expozičním čase. Výrazně snížená hladina kaspáz po ošetření inhibítorem Z-VAD-FMK dokazuje, že luminiscenční signál opravdu pochází z enzymatické aktivity kaspáz. Jelikož ale buněčná linie HeLa DKO Bax/Bak postrádá Bax/Bak proteiny, které slouží k indukci kaspáz v buňce skrze mitochondriální cestu, naměřená data potvrzují, že kaspázy 3/7 jsou v případě vystavení látek indukovány mitochondriální cestou. Studované látky tedy aktivují kaspázy skrze mitochondriální cestu, ale buňky nutně neumírají na apoptózu. Bylo by tedy vhodné provést další výzkum a otestovat jiné apoptické markery, aby bylo možné zodpovědět otázku, jestli hlavní příčinou smrti buněk byla apoptóza, popř. jiný druh buněčné smrti.

Jedním z těchto markerů je fosfatidylserin. Je to fosfolipid, který je po spuštění apoptózy v buňce vyloučen z vnitřní strany cytoplazmatické membrány na vnější a buňka je tak označena pro destrukci fagocytózou okolními buňkami, nebo buňkami imunitního systému (Alberts et al., 2014). Způsob otestování tohoto markeru apoptózy je možný pomocí nabarvení annexinem V s použitím sady FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry a vyhodnocením na průtokovém cytometru. Tato metoda byla provedena, ovšem neúspěšně. Ani v různých koncentracích a expozičních časech nebyl fosfatidylserin detekován.

## 7.3. Hemolytický test

Již v dřívější studii bylo prokázáno, že TLX postrádá hemolytické účinky (Patterson & Carmeli, 1992). Výsledky našeho experimentu ukazují pouze zanedbatelný účinek na červené krvinky, tedy max. 15 % u nejvyšší testované koncentrace. Oba toxiny jsou tak slibnými kandidáty pro další výzkum léčby rakoviny.

## 7.4. Morfologie

Experiment, který byl proveden na konfokálním mikroskopu po expozici 24 h viditelně ukázal, že obě látky depolymerizují aktin. Na jádrech a tubulinu nebyla pozorována výrazná změna. V současné době existuje velké množství cytotoxických látek inhibujících tubulin, které se již využívají v klinickém prostředí (Mooberry, 2007). Ačkoliv je aktin při proliferaci buněk také velmi důležitý, zejména při cytokinezi (Kato et al., 2008), zatím nebyla klinicky schválena žádná cytotoxická látka inhibující aktin (Trendowski, 2014). TLX i 7-OMeSB jsou tak nadějnými kandidáty pro další výzkum.

## 7.5. Působení látek na různé rakovinné buněčné linie

### 7.5.1. Citlivé linie

Výsledky velkokapacitního screeningu ukázaly zvýšenou citlivost následujících buněčných liniích na obě zkoumané látky. Jelikož mají níže zmíněné typy rakoviny často vysokou úmrtnost, jsou proto terapeuticky relevantní a obě látky by mohly být vhodnými kandidáty pro výzkum jejich léčby.

D283 Med je rakovinná buněčná linie, která se řadí mezi meduloblastomy, nádory centrální nervové soustavy. Byla izolována z peritoneálního implantátu a ascitické tekutiny dítěte s metastázami meduloblastomu (Friedman et al., 1985). Meduloblastom je nejčastějším maligním pediatrickým mozgovým nádorem. Navzdory pokroku v nových způsobech léčby zůstává riziko recidivy a úmrtí velké a dlouhodobé následky na přeživších pacientech jsou značné (Casciati et al., 2020). Za rok 2020 celosvětově přibylo 1,6 % nových případů a 2,5 % úmrtí (Sung et al., 2021). Současná léčba spočívá v chirurgii následované radioterapií a chemoterapií. Po pěti letech léčby přežívá pouze 60 % pacientů (Patties et al., 2016).

HL-60 je rakovinná buněčná linie, která byla izolována z leukocytů periferní krve pacientky s akutní promyelocytární leukémií (APL) (Collins et al., 1977). Jedná se o odlišnou variantu akutní myeloidní leukémie (AML) (Tallman & Kwaan, 1992). APL je neobvyklá, ale vysoce léčitelná leukémie, avšak velká část pacientů zemře měsíc od diagnózy ještě před začátkem léčby (Lehmann et al., 2011). Za rok 2020 celosvětově přibylo 2,5 % nových případů a 3,1 % úmrtí (Sung et al., 2021). Velkým pokrokem v léčbě je použití kyseliny all-trans retinové (ATRA) a v poslední době také oxidu arsenitého (ATO). Existuje tedy několik léčebných

strategií využívajících tyto látky samotné, v kombinaci s chemoterapií, nebo se využívá jen chemoterapie (Sanz et al., 2009).

MDA-MB-231 je rakovinná buněčná linie, která byla izolována z pleurálního výpotku pacientky s metastatickým adenokarcinomem prsu (Cailleau et al., 1974). MDA-MB-231 patří mezi tzv. triple negativní rakovinu prsu (TNBC), jež má negativní expresi estrogenového receptoru, progesteronového receptoru a sníženou hladinu proteinu HER2/Neu (Brenton et al., 2005). Rakovina prsu je nejčastější typ rakoviny u žen na světě a za rok 2020 přibylo 11,7 % nových případů a 6,9 % úmrtí (Sung et al., 2021). TNBC je nejvíce agresivní forma rakoviny prsu (DeSantis et al., 2016). Optimální léčebný režim TNBC zůstává nedefinovaný, nicméně se v léčbě užívá neoadjuvantní chemoterapie, chemoterapie a imunoterapie (Bergin & Loi, 2019).

Rko je rakovinná buněčná linie tlustého střeva (Brattain et al., 1981). Kolorektální karcinom je třetí nejčastější typ rakoviny a je druhým nejsmrtelnějším typem rakoviny na světě. Za rok 2020 celosvětově přibylo 10 % nových případů a 9,4 % úmrtí (Sung et al., 2021). Pro pacienty s potencionálně léčitelným kolorektálním karcinomem existuje léčba v podobě chirurgie a chemoterapie, avšak pro pacienty s neléčitelným onemocněním nabírá léčba spíše paliativního charakteru za účelem zmírnění příznaků a rozšíření nemoci v těle (Labianca et al., 2010).

### **7.5.2. Rezistentní linie**

Výsledky velkokapacitního screeningu ukázaly vysokou rezistenci následujících buněčných liniích pro obě zkoumané látky. I přesto, že mají níže zmíněné typy rakoviny vysokou úmrtnost a jsou terapeuticky relevantní, TLX a 7-OMeSB nejsou vhodnými kandidáty pro výzkum jejich léčby.

Rakovinná buněčná linie AsPC-1 byla založena jako xenograft v athymické nahé myši, původní nádorové buňky však byly získány od pacienta s adenokarcinomem slinivky břišní (Tan et al., 1981). Za rok 2020 celosvětově přibylo 2,6 % nových případů a 4,7 % úmrtí (Sung et al., 2021). V současné době je chirurgie jedinou léčbou, která nabízí potencionální vyléčení a přidání adjuvantní chemoterapie zvyšuje šanci na přežití (McGuigan et al., 2018).

HCT 116 je buněčná linie pocházející z kolorektálního karcinomu, která byla izolována z primárního nádoru vzestupného tračníku. (Brattain et al., 1981). Jedná se o agresivní buněčnou linii (Olejniczak et al., 2018).

#### **7.6. Potenciál TLX a 7-OMeSB**

Řada látek působících na rakovinné buňky je již v klinickém užívání, například taxany, epothilony, nebo vinca alkaloidy. Cílem působení těchto látek jsou však mikrotubuly, které jsou součástí mitotického vřetenka a látky jsou tak schopny přerušit proliferaci rakovinných buněk. Látky, jejichž cílem jsou aktinová mikrofilamenta, se v klinickém prostředí zatím nepoužívají (Trendowski, 2014).

Vlastnosti TLX diskutované výše naznačují, že má velký potenciál pro další výzkum rakoviny navzdory počátečním pokusům *in vivo* na myších, které prokázaly značnou toxicitu (Patterson & Carmeli, 1992). TLX by tak mohl být vhodným kandidátem pro selektivní dodávání látky. V nedávné době byl vyvinut konjugát lidské protilátky AGS67E a silné antitubulinové látky MMAE využívající spojení štěpící katepsin pro selektivní dodávku látky. V současné době podstupuje klinické testování na buňkách non-Hodgkinova lymfomu a chronické lymfocytární leukémii (Pereira et al., 2015). TLX má zvýšený účinek na terapeuticky relevantní rakoviny, jako je např. meduloblastom CNS, krevní leukémie nebo adenokarcinom prsu, u kterých lze uvažovat o selektivním dodávání látky.

7-OMeSB je v literatuře velmi neprozkoumaná látka, která je strukturně podobná TLX a vykazuje i podobné účinky. I přesto, že vykazuje nižší potenci než TLX, má také velký potenciál pro další výzkum.

## 8. ZÁVĚR

- TLX a 7-OMeSB jsou strukturně podobné cytotoxiny produkované sinicemi rodu, jako je např. *Scytonema* a *Tolypothrix*.
- Stanovení viability u buněčné linie HeLa WT ošetřené látkami pomocí detekce MTT a ATP prokázalo vyšší toxicitu TLX.
- Proběhlo zhodnocení  $IC_{50}$  na široké škále rakovinných a primárních buněčných linií.
- Proběhlo porovnání účinků obou toxinů na červených krvinkách pomocí hemolytického testu. Výsledkem byla nízká hladina hemolýzy u obou látek.
- Zhodnocení morfologických změn buněčné linie HeLa WT ošetřené oběma látkami na konfokálním mikroskopu ukázalo depolymerizaci aktinu.
- Stanovení hladiny kaspáz 3/7 u buněk HeLa WT, jako jednoho z apoptických markerů, ukázalo zvýšenou hladinu kaspáz 3/7 po 48 h expozice oběma látkami.
- Ošetření buněčné linie HeLa WT oběma látkami a navíc inhibitorem kaspáz Z-VAD-FMK prokázalo, že luminiscenční signál opravdu pochází z enzymatické aktivity kaspáz.
- Ošetření buněčné linie HeLa DKO Bax/Bak oběma látkami potvrdilo, že jsou kaspázy 3/7 indukovány mitochondriální cestou. Buňky ale nutně nemusí umírat na apoptózu.
- Detekce apoptických buněk pomocí průtokové cytometrie barvením apoptického markeru fosfatidylserinu se nezdařila.
- TLX i 7-OMeSB jsou díky svým vlastnostem slibnými kandidáty pro další výzkum rakoviny.



## 9. SEZNAM LITERATURY

Alberts A., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2014. *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition. *Garland Science* ISBN 9780815344322.

Allingham J. S., Klenchin V. A., Rayment I. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**:2119-2134.

Bergin A. R. T., Loi S. 2019. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res* **8**:F1000 Faculty Rev-1342.

Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* **11**:127–52.

BMA. 2007. *Illustrated Medical Dictionary*, 1st edition. *DK*. ISBN 0-7513-3383-2.

Brattain M. G., Brattain D. E., Fine W. D., Khaled F. M., Marks M. E., Kimball P. M., Arcolano L. A., Danbury B. H. 1981. Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. *Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2**:355-366.

Brenton J. D., Carey L. A., Ahmed A. A., Caldas C. 2005. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology* **23**:7350–7360.

Cailleau R., Young R., Olivé M., Reeves W.J. Jr. 1974. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *Journal of the National Cancer Institute* **53**: 661-74.

Carmeli S., Moore R. E., Patterson G. M. L. 1990. Tolytoxin and new scytonoxins from 3 species of scytonema. *Journal of Natural Products* **53**:1533-42.

Carmeli S., Moore R. E., Patterson G. M. L., Yoshida W. Y. 1993. Biosynthesis of tolytoxin - origin of the carbons and heteroatoms. *Tetrahedron Letters* **34**:5571-74.

- Casciati A., Tanori M., Manczak R., Saada S., Tanno B., Giardullo P., Porcù E., Rampazzo E., Persano L., Viola G., Dalmay C., Lalloué F., Pothier A., Merla C., Mancuso M. 2020. Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Cancers* **12**:226.
- Collins S. J, Gallo R. C, Gallagher R. E. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**:347-9.
- Danial N. N. 2007. BCL-2 family proteins: Critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research* **13**:7254-63.
- DeSantis C. E., Fedewa S. A., Goding Sauer A., Kramer J. L., Smith R. A., Jemal A. 2016. Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **66**:31–42.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**:495.
- Friedman H. S., Burger P. C., Bigner S. H., Trojanowski J. Q., Wikstrand C. J., Halperin E. C., Bigner D. D. 1985. Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **44**:592-605.
- Galluzzi L., Rudquist N. P. 2019. Methods in Enzymology. Tumor Immunology and Immunotherapy – Molecular Methods, Volume 629. *Elsevier Inc.* ISBN 978-0-12-820662-1.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **25**:486-541.
- Gupta V., Ratha S. K., Sood A., Chaudhary V., Prasanna R. 2013. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) – Prospects and challenges. *Algal Research* **2**:79-97.

- Huang I. S., Zimba P. V. 2019. Cyanobacterial bioactive metabolites-A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae* **86**:139-209.
- Chauvier D., Ankri S., Charriaut-Marlangue C., Casimir R., Jacotot E. 2007. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell death and differentiation* **14**: 387-91.
- Ishibashi M., Moore R. E., Patterson G. M. L., Xu C. F., Clardy J. 1986. Scytophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyte scytonema-pseudohofmanni. *Journal of Organic Chemistry* **51**:5300-06.
- Jung J. H., Moore R. E., Patterson G. M. L. 1991. Scytophycins from a blue-green-alga belonging to the nostocaceae. *Phytochemistry* **30**:3615-16.
- Kato A., Kurita S., Hayashi A., Kaji N., Ohashi K., Mizuno K. 2008. Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *The Biochemical Journal* **414**:261–270.
- King R. C., Mulligan P. K., Stansfield W.D. 2006. A Dictionary of Genetics. *Oxford University Press*, USA. ISBN 0-19-530762-3.
- Kirkin V., Joos S., Zornig M. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1644**:229-49.
- Klenchin, V. A., Allingham J. S., King R., Tanaka J., Marriott G., Rayment I. 2003. Trisoxazole macrolide toxins mimic the binding of actin-capping proteins to actin. *Nature Structural Biology* **10**:1058–1063.
- Labianca R., Beretta G. D., Kildani B., Milesi L., Merlin F., Mosconi S., Pessi A. M., Prochilo T., Quadri A., Gatta G., de Braud F., Wils J. 2010. Colon Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **74**:106–133.
- Lattime E., Gerson S. 2013. Gene Therapy of Cancer. 3rd Edition. *Academic Press*. ISBN 9780123942951

- Lau N. S., Matsui M., Abdullah A. A. A. 2015. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed Research International* **2015**.
- Lehmann S., Ravn A., Carlsson L., Antunovic P., Deneberg S., Möllgård L., Derolf A. R., Stockelberg D., Tidefelt U., Wahlin A., Wennström L., Höglund M., Juliusson G. 2011. Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: A population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia* **25**:1128-1134.
- McGuigan A., Kelly P., Turkington R. C., Jones C., Coleman H. G., McCain R. S. 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology* **24**:4846-4861.
- Mooberry S. L. 2007. Strategies for the development of novel Taxol-like agents. *Methods in Molecular Medicine* **137**:289-302.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival -application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55-63.
- Nakamura R., Tanino K., Miyashita M. 2003. Total synthesis of scytophycin C. 1. Stereoselective syntheses of the C(1)-C(18) segment and the C(19)-C(31) segment. *Organic Letters* **5**:3579-82.
- Olejniczak A., Szaryńska M., Kmiec Z. 2018. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *International Journal of Oncology* **52**:599-612.
- Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal Y. K. 2015. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* **9**:293-304.
- Patterson G. M. L., Bolis C. M. 1993. Determination of scytophycins in cyanophyte cultures by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* **16**:475-86.

- Patterson, G. M. L., Bolis C. M. 1997. Fungal cell-wall polysaccharides elicit an antifungal secondary metabolite (phytoalexin) in the cyanobacterium *Scytonema ocellatum*. *Journal of Phycology* **33**:54-60.
- Patterson, G. M. L., Carmeli S. 1992. Biological effects of tolytoxin (6-hydroxy-7-o-methyl-scytophycin-b), a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. *Archives of Microbiology* **157**:406-10.
- Patterson G. M. L., Smith C. D., Kimura L. H., Britton B. A., Carmeli S. 1993. Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **24**:39-48.
- Patties I., Kortmann R. D., Menzel F., Glasow A. 2016. Enhanced inhibition of clonogenic survival of human medulloblastoma cells by multimodal treatment with ionizing irradiation, epigenetic modifiers, and differentiation-inducing drugs. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **35**:94.
- Pereira D. S., Guevara C. I., Jin L., Mbong N., Verlinsky A., Hsu S. J., Avina H., et al. 2015. AGS67E, an Anti-CD37 Monomethyl Auristatin E Antibody–Drug Conjugate as a Potential Therapeutic for B/T-Cell Malignancies and AML: A New Role for CD37 in AML. *Molecular Cancer Therapeutics* **14**:1650-1660.
- Pfeffer C. M., Singh A. T. K. 2018. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:448.
- Sanz A. M., Grimwade D., Tallman M. S., Lowenberg B., Fenau P., Estey E. H., Naoe T., Lengfelder E., Büchner T., Döhner H., Burnett A. K., Lo-Coco F. 2009. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **113**:1875–1891.
- Saurav K., Kannabiran K. 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi Journal of Biological Sciences* **19**:81–86.

- Senol A. D., Repe A., Grudina C., Sassoon N., Reiko U., Bousset L., Melki R., Pie J., Guggert M., Zurzolo C. 2019. Effect of tolytoxin on tunneling nanotube formation and function. *Scientific Reports* **9**:15.
- Shishido, T. K., Humisto A., Jokela J., Liu L. W., Wahlsten M., Tamrakar A., Fewer D. P., Permi P., Andreote A. P. D., Fiore M. F., Sivonen K. 2015. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. *Marine Drugs* **13**:2124-40.
- Slee E. A., Zhu H. J., Chow S. C., MacFarlane M., Nicholson D. W., Cohen G. M. 1996. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochemical Journal* **315**:21-24.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **0**:1-41.
- Tallman M., Kwaan H. 1992. Reassessing the Hemostatic disorder associated with acute promyelolytic leukemia. *Blood* **79**:543-53.
- Tan M. H., Shimano T., Chu T. M. 1981. Differential localization of human pancreas cancer-associated antigen and carcinoembryonic antigen in homologous pancreatic tumoral xenograft. *Journal of National Cancer Institute* **67**:563-9.
- Tomsickova J., Ondrej M., Cerny J., Hrouzek P., Kopecky J. 2014. Analysis and Detection of Scytopycin Variants by HPLC-ESI-MS. *Chemistry of Natural Compounds* **49**:1170-71.
- Trendowski M. 2014. Exploiting the cytoskeletal filaments of neoplastic cells to potentiate a novel therapeutic approach. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1846**:599-616.
- Trojan S. a kolektiv. 2003. Lékařská fyziologie, 4. vydání. *Grada publishing*, Praha. ISBN 0-19-530762-3.
- Vijayakumar R. 2018. Secondary Metabolites. Sources and Applications. *IntechOpen*. ISBN 978-1-78923-643-9.

- Wong R. S. Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **30**:87.
- Yadav J. S., Sunitha V., Reddy B. V. S., Gyanchander E. 2008. The stereoselective synthesis of the C6-C18 fragment of scytopycin C employing a novel synthetic methodology. *Synthesis-Stuttgart* **2008**:2933-38.
- Zhang X. Q., Minale L., Zampella A., Smith C. D. 1997. Microfilament depletion and circumvention of multiple drug resistance by sphinxolides. *Cancer Research* **57**:3751-58.

## **10. SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ**

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry Product Information. [cit: 12.11.2020]. Dostupné na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp13242.pdf>

HiMedia Cell Culture L-glutamin Product Information.[cit: 30.3.2020]. Dostupné na: <http://himedialabs.com/TD/TC243.pdf>

Promega, Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin.[cit: 13.3.2020]. Dostupné na: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?la=en>

Promega, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin. [cit: 13.3.2020]. Dostupné na: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en>