

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Biochemických věd

Kandidát: Růžena Melicharová

Školitel: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Detekce kovalentních komplexů proteinů s DNA s použitím fluorescenční mikroskopie

Antracyklinová antibiotika patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva. Jejich mechanismus účinku je komplexní. Působí jako interkalační činidla, způsobují vznik DNA aduktů a působí na topoisomerasu (TopII) jako jedy. Katalytický cyklus TopII je přerušen ve chvíli, kdy antracykliny stabilizují kovalentní komplex DNA a TopII, a tím způsobují buněčné poškození. Použití antracyklinů je však limitováno několika závažnými nežádoucími účinky, jako je myelotoxicita či kardiotoxicita. Mechanismus kardiotoxicity stále není jasný, ale mohl by být spojený s působením na TopII $\beta$  isoformu. TopII $\beta$  je na rozdíl od TopII $\alpha$  přítomna v buňkách diferencovaných, jako jsou kardiomyocyty. Navíc jediný klinicky používaný kardioprotektant dexrazoxan patří mezi TopII katalytické inhibitory. Nicméně detaily protektivního působení zajištěného dexrazoxanem jsou nejasné.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu TARDIS (trapped in agarose DNA immunostaining) k detekci a kvantifikaci kovalentních komplexů, porovnat různé způsoby analýzy počtu komplexů a vybrat vhodnou statistickou metodu. Pro pokusy byly použity buňky lidské leukemické linie HL-60 a primární neonatální ventrikulární kardiomyocyty (NVCM). Po inkubaci s vybranými látkami byly buňky zachyceny v agaróze a lyzovány. Následně byly komplexy označeny primární protilátkou proti TopII $\beta$  a sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční sondou Alexa Fluor. Získaný signál byl analyzován programem Cell Profiler. Použitím optimalizované metody jsme testovali schopnost různých TopII inhibitorů (etoposid, daunorubicin, XK-469, dexrazoxan a BNS-22) stabilizovat kovalentní komplexy, nebo zabránit jejich vzniku.