

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**VLIV TOPOISOMERASY II BETA NA CITLIVOST  
NÁDOROVÝCH BUNĚK K PROTINÁDOROVÉ TERAPII**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Veronika Skalická

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2021

Podpis:

Dovolte mi zde touto cestou poděkovat PharmDr. Anně Jirkovské, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a připomínky, díky nimž tato práce mohla vzniknout. Mé zvláště velké poděkování patří i Mgr. Veronice Skalické za její trpělivost a praktické rady při práci v laboratoři. Děkuji také za podporu GAČR 18-08169S, GAUK 1674119 a SVV 260 550. V neposlední řadě děkuji i své rodině za nekonečnou důvěru a podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Nikola Jaščevská

Školitel: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv topoisomerasy II beta na citlivost nádorových buněk  
k protinádorové terapii

Topoisomerasa II (TOP II) je buněčný enzym zodpovědný za řešení topologických problémů dvouřetězcové DNA. Izoformy TOP II alfa a beta jsou produkty různých genů s téměř stejnou katalytickou funkcí. Exprese TOP II $\alpha$  je vázána na G<sub>2</sub>/M fázi buněčného cyklu, zatímco TOP II $\beta$  je exprimována kontinuálně. Je proto na rozdíl od TOP II $\alpha$  přítomna i v neproliferujících diferencovaných buňkách. Antracyklinová antibiotika jsou starou skupinou protinádorových léčiv, která patří mezi TOP II jedy. Ačkoli je jejich klinické použití časté, incidence vedlejších účinků (zejména myelotoxicity a kardiotoxicity) jejich použití omezuje. Stále častěji je diskutována role inhibice TOP II $\beta$ , která je taktéž přítomna v kardiomyocytech. Dexrazoxan, jediné klinicky používané kardioprotektivum, způsobuje depleci TOP II $\beta$  v kardiomyocytech, což by mohlo vysvětlovat jeho účinnost. Ačkoli se již dříve ukázalo, že TOP II $\beta$  je pro buněčnou proliferaci postradatelná, není dosud znám efekt deplece TOP II $\beta$  na citlivost nádorových buněk k protinádorovým léčivům ze skupiny inhibitorů TOP II.

V této práci jsem proto hodnotila vlastnosti nově získané lidské buněčné suspenzní linie mutantních nádorových buněk HL-60 s různými profily exprese TOP II $\beta$ , které byly vytvořeny pomocí technologie CRISPR-Cas9. Tyto buněčné linie jsme nejprve sledovali z hlediska exprese TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  na úrovni mRNA a proteinu (pomocí RT-qPCR, respektive imunoblotování) a následně z hlediska jejich citlivosti k daunorubicinu a dexrazoxanu.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Nikola Jaščevská

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effects of topoisomerase II beta on the sensitivity of the cancer cells to the antineoplastics

Topoisomerase II (TOP II) is a cellular enzyme responsible for solving topological problems of double-stranded DNA. Alpha and beta isoforms of TOP II are different gene products having similar catalytic activities. The expression of TOP II $\alpha$  is cell-cycle dependent, peaking in G<sub>2</sub>/M phase, while TOP II $\beta$  isoform is expressed constitutively throughout the cell cycle. It is therefore present also in non-proliferating differentiated cells. Anthracycline antibiotics are an old class of anticancer drugs, belonging to TOP II poisons. Although their clinical usefulness is high, the incidence of side effects (especially myelotoxicity and cardiotoxicity) may limit the therapy. The key role of TOP II $\beta$  inhibition, which is present also in cardiomyocytes, has been increasingly discussed. Dexrazoxane, the only clinically used cardioprotective, leads to depletion of TOP II $\beta$  in cardiomyocytes, which may explain its cardioprotection. Although TOP II $\beta$  was previously shown to be dispensable for cellular proliferation, its possible effects on the sensitivity to various antineoplastic agents is not known.

Therefore, practical aim of this thesis was to describe the properties of a HL-60 human promyelocytic leukaemia cell lines mutated for TOP II $\beta$ . The cells with both, one, or no functional copies of TOP II $\beta$  gene were previously developed by the CRISPR-Cas9 technology. First, we studied these cell lines regarding the TOP II $\alpha$  and TOP II $\beta$  mRNA and protein expression (by RT-qPCR and immunoblotting, respectively), and then regarding their sensitivity to daunorubicin and dexrazoxane.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky.....</b>	<b>10</b>
2.1	DNA topoisomerasy .....	10
2.1.1	Struktura TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$ .....	12
2.1.2	Katalytická aktivita TOP II.....	13
2.1.3	Fyziologické funkce TOP II $\beta$ .....	15
2.1.3.1	Regulace transkripce zprostředkovaná TOP II $\beta$ .....	15
2.1.3.2	Opravy DNA.....	17
2.1.3.3	Stárnutí.....	18
2.2	Inhibice topoisomeras jako mechanismus protinádorové terapie .....	19
2.2.1	Topoisomerasové jedy .....	19
2.2.1.1	Antracykliny .....	20
2.2.2	Katalytické inhibitory topoisomerasy II .....	23
2.2.2.1	Dexrazoxan .....	24
<b>3</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika.....</b>	<b>27</b>
4.1	Materiál.....	27
4.1.1	Buněčná kultura .....	27
4.1.2	Pomůcky a přístrojové vybavení.....	30
4.1.3	Chemikálie .....	31
4.2	Pracovní postupy.....	34
4.2.1	Kultivace buněčné linie HL-60.....	34
4.2.2	Pasážování buněčné linie HL-60 .....	34
4.2.3	Stanovení exprese mRNA.....	35
4.2.3.1	Příprava buněčného lyzátu pro přímé stanovení mRNA metodou RT-qPCR .....	35
4.2.3.2	Výběr referenčního genu .....	35
4.2.3.3	Přímé stanovení mRNA metodou RT-qPCR.....	35
4.2.4	Návrh specifických primerů pro detekci místa mutace enzymu TOP II $\beta$ ..	37

4.2.4.1	Návrh mutačního primeru pro detekci enzymu TOP II $\beta$ v buněčné linii HL-60.....	37
4.2.4.2	Příprava vzorků pro detekci přítomnosti TOP II $\beta$ s využitím navržených primerů .....	37
4.2.4.3	Detekce přítomnosti mutace s využitím navržených primerů .....	37
4.2.4.4	Elektroforetická separace v agarózovém gelu .....	39
4.2.5	Stanovení množství proteinu TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$ .....	39
4.2.5.1	Příprava vzorků pro stanovení obsahu proteinu.....	39
4.2.5.2	Stanovení koncentrace proteinu v buněčných lyzátech .....	39
4.2.5.3	Separace proteinů z buněčného lyzátu pomocí SDS-PAGE a přenos proteinů na membránu (Western-blot).....	40
4.2.5.4	Imunodetekce topoisomerasy II.....	41
4.2.6	Stanovení viability .....	42
4.2.6.1	Stanovení antiproliferačních účinků cytotoxicitním experimentem ...	42
4.2.6.2	Hodnocení buněčné viability metodou MTT .....	43
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>45</b>
5.1	Stanovení exprese mRNA TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$ metodou RT-qPCR.....	45
5.2	Návrh primerů pro detekci mutačního místa v enzymu TOP II $\beta$ v použitých buněčných liniích.....	49
5.3	Detekce přítomnosti TOP II $\beta$ s využitím navržených primerů.....	52
5.4	Zobrazení na agarózovém gelu .....	54
5.5	Stanovení množství proteinu TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$ .....	55
5.5.1	Stanovení celkového proteinu v buněčných lyzátech.....	55
5.5.2	Imunodetekce proteinu TOP II .....	57
5.6	Antiproliferační účinek dexrazoxanu na buněčnou linii HL-60 .....	60
5.7	Antiproliferační účinek daunorubicinu na buněčnou linii HL-60 .....	62
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Závěry .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>72</b>

# 1 Úvod

Tato práce byla vypracována v rámci dlouholetého studia výzkumné skupiny molekulární a buněčné toxikologie při Farmaceutické fakultě v Hradci Králové zaměřující se mimo jiné na kardiovaskulární toxicitu vyvolanou některými léčivými látkami (zejména protinádorovými antracykliny).

Antracyklinová antibiotika patří mezi jedny z nejúčinnějších protinádorových léčiv. Mechanismus jejich účinku je pravděpodobně multifaktoriální, ale formálně jsou řazeny mezi tzv. topoisomerasové jedy. Topoisomerasa je enzym, který je schopen modifikovat strukturu DNA – například její nadšroubovicové vinutí. V buňkách vyšších obratlovců existují dva typy topoisomeras (typ I a typ II) a také dvě izoformy topoisomerasy II – topoisomerasa II alfa (TOP II $\alpha$ ), která je nezbytná pro buněčné dělení a TOP II $\beta$ , jejíž přesná funkce není dosud plně objasněna.

Hlavní faktor limitující klinické použití antracyklinových antibiotik je riziko vzniku nežádoucích účinků, zvláště pak myelotoxicity a na dávce závislé kardiotoxicity. Mechanismus antracykliny navozené kardiotoxicity není stále plně objasněn. V dnešní době je už překonaná, ale stále citovaná teorie oxidačního poškození srdečního svalu kvůli schopnosti antracyklinů produkovat reaktivní kyslíkové radikály. V poslední době se čím dál více diskutuje o možné roli TOP II $\beta$ . Důležitou úlohu v hledání mechanismu antracyklinové kardiotoxicity hraje i dexrazoxan, který je jediným klinicky používaným kardioprotektivem.

Moje práce navazuje na předchozí experimenty této výzkumné skupiny popisující farmakologickou depleci beta izoformy topoisomerasy II (TOP II $\beta$ ) u potkaních kardiomyocytů po inkubaci s kardioprotektivně působícím dexrazoxanem. Funkce TOP II $\beta$  nejsou zcela jasné jak u kardiomyocytů, tak ani u nádorových buněk. V této práci jsem se proto zaměřila na hodnocení vlastností lidské buněčné nádorové linie HL-60 s genetickou deplecí TOP II $\beta$ , která vznikla v rámci stáže dr. Jirkovské a Mgr. Skalické.

Využitím technologie CRISPR-Cas9 vznikly dceřiné buněčné linie HL-60, s homozygotní nebo heterozygotní mutací genu pro TOP II $\beta$  a také linie kontrolní bez mutace. Deplece na úrovni DNA byla už dříve potvrzena pomocí PCR a sekvenace krátkého úseku kolem předpokládaného místa mutace a také pomocí imunofluorescence.

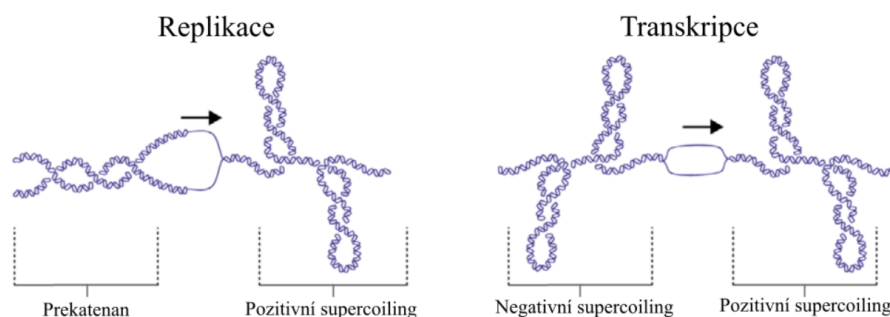


Mým úkolem bylo stanovení množství mRNA TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  v jednotlivých buněčných liniích metodou RT-qPCR. Nejprve byla vyhodnocena exprese pomocí komerčních primerů, které byly používány v předchozích studiích. Následně byl proveden návrh primerů cílících přímo do mutované části genu TOP II $\beta$  v homozygotně mutantní linii HL-60. Několik vybraných dvojic primerů bylo podrobena pilotnímu screeningu v praxi. Ověření přítomnosti či nepřítomnosti deplece bylo provedeno i na úrovni proteinu TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  metodou imunoblotu. Hlavním cílem práce pak bylo studium antiproliferačního účinku dexrazoxanu a daunorubicinu na linie s různou mírou exprese TOP II $\beta$ . Tato data jako součást širšího celku pomohou v objasnění jejich mechanismu účinku a pochopení rozdílů v působení těchto látek na nádorové buňky a kardiomyocyty, což by mohlo přispět např. k návrhu nových protinádorových léčiv s lepším farmakologickým profilem nebo nových kardioprotektiv. V obecnějším měřítku mohou tato data přispět k pochopení biochemického významu jednotlivých izoform TOP II pro proliferující a neproliferující buňky.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 DNA topoisomerasy

DNA topoisomerasy jsou buněčné enzymy zodpovědné za řešení topologických problémů spojených s replikací, transkripcí a rekombinací DNA a také remodelací chromatinu. Jejich stěžejní potřeba vyplývá z dvoušroubovicové struktury DNA a nutnosti uvolnění nadšroubovicového vinutí pro umožnění přístupu ke genetické informaci (Obr. 1). Topoisomerasy zabraňují nadměrnému utažení vláken tvorbou dočasných jednořetězcových (topoisomerasa I, TOP I) nebo dvouřetězcových (topoisomerasa II, TOP II) zlomů v DNA vytvořením přechodných fosfodiesterových vazeb mezi tyrozinovými zbytky v aktivním místě proteinu a jedním z fosfátů na 5' konci rozštěpeného vlákna DNA (Champoux, 2001). Bez působení DNA topoisomeras by akumulace pozitivního nadšroubovicového vinutí před místem rozvíjení rychle zastavila replikaci a transkripci. Akumulace negativního nadšroubovicového vinutí pak může vést až ke vzniku D smyček (invaze DNA duplexu komplementárním jednořetězcovým segmentem DNA), R smyček (trvalé spojení nově vzniklé RNA s DNA templátem za RNA polymerasou), nebo struktur zvaných G-kvadruplexy a Z-DNA. Všechny tyto struktury znemožňují další použití informace uložené v DNA (Pommier *et al.*, 2010).



Obr. 1 Během replikace DNA vede oddělování vláken dvoušroubovice k pozitivnímu supercoilingu před replikační vidličkou. Za proteinovým aparátem pak dochází k tvorbě prekatenanů (vlevo). Během transkripce vede oddělování vláken k tvorbě pozitivních supercoilů před a negativních supercoilů za proteinovým aparátem (vpravo). Převzato a upraveno z McKie, Neuman a Maxwell (2021)

Obě nadrodiny topoisomeras (TOP I i TOP II) můžeme dále dělit do čtyř podskupin – IA, IB, IIA a IIB (Wang, 2002). TOP IA tvoří přechodné kovalentní vazby na 5' konci DNA a funguje na principu průchodu vlákna. TOP IB pak tvoří kovalentní

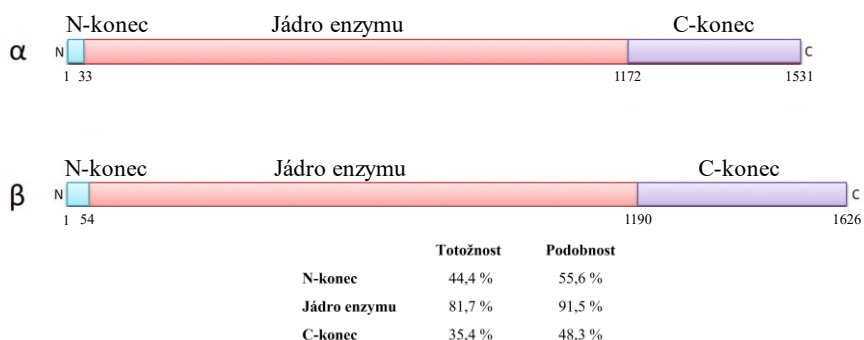
vazby na 3' konci DNA a funguje na základě mechanismu kontrolované rotace. TOP IIA i TOP IIB tvoří přechodné kovalentní vazby na 5' konci DNA na obou vlákních šroubovice a jejich mechanismus spočívá v průchodu dalšího segmentu dvouvlákna (McKie, Neuman a Maxwell, 2021). V buňkách obratlovců jsou přítomny dvě izoformy topoisomerasy typu IIA – topoisomerasa II $\alpha$  (170 kDa, TOP II $\alpha$ ) a topoisomerasa II $\beta$  (180 kDa, TOP II $\beta$ ). Byť mají tyto izoformy podobnou strukturu a téměř identickou katalytickou aktivitu (Sakaguchi a Kikuchi, 2004), jejich zastoupení se liší v závislosti na typu tkáně a fázi buněčného cyklu. TOP II $\alpha$  je nezbytná pro buněčné dělení. Koncentrace tohoto enzymu je regulována v průběhu buněčného cyklu. Výrazně zvýšené hladiny byly pozorovány v období buněčné proliferace (nárůst v průběhu buněčného cyklu počínaje S-fází s vrcholem v G<sub>2</sub>/M fázi) (Woessner *et al.*, 1991). V průběhu mitózy je TOP II $\alpha$  nejvíce patrná v centromerách a raménkách metafázových chromozomů. Při depleci TOP II $\alpha$  v buňkách zůstávají chromozomy v metafázi dekonzenzované a neuspořádané, kdy normálnímu uspořádání brání vzájemné spojení sesterských chromatid. Zásadní role TOP II $\alpha$  pro buněčné dělení vedla také k jejímu navržení jakožto možného markeru nádorového bujení (Heck a Earnshaw, 1986) a je také považována za hlavní cíl protinádorového účinku antracyklinů (Sakaguchi a Kikuchi, 2004).

Izoforma TOP II $\beta$  byla poprvé izolována v roce 1987 z myších leukemických buněk P388 rezistentních k amsakrinu (Drake *et al.*, 1987). Její fyziologické funkce jsou však v porovnání s TOP II $\alpha$  mnohem méně objasněny. Hladina TOP II $\beta$  je téměř konstantní v průběhu buněčného cyklu (Woessner *et al.*, 1991). Zvýšenou expresi nalézáme v terminálně diferenciovaných buňkách (Lyu *et al.*, 2006). TOP II $\beta$  je přítomna ve všech buňkách a je postradatelná pro jejich přežití i dělení (až na *in vivo* nervový vývoj), což z ní pravděpodobně dělá zdánlivě nevhodný protinádorový cíl (Palchaudhuri a Hergenrother, 2007). Vyřazení TOP II $\beta$  pravděpodobně nezasáhne embryonální vývoj, protože ji TOP II $\alpha$  může nahradit. Ve vývoji nervové soustavy má však nečekaně kritickou roli (Yang *et al.*, 2000). Při specifické depleci TOP II $\beta$  dochází v tomto orgánu u myši k defektu v kortikogenezi a vážnému ovlivnění stratifikace mozku (Lyu a Wang, 2003). Pozoruhodná je i studie, kde pouze TOP II $\beta$  (nikoli TOP II $\alpha$ ) byla detekována v srdcích dospělých myši (Capranico *et al.*, 1992).

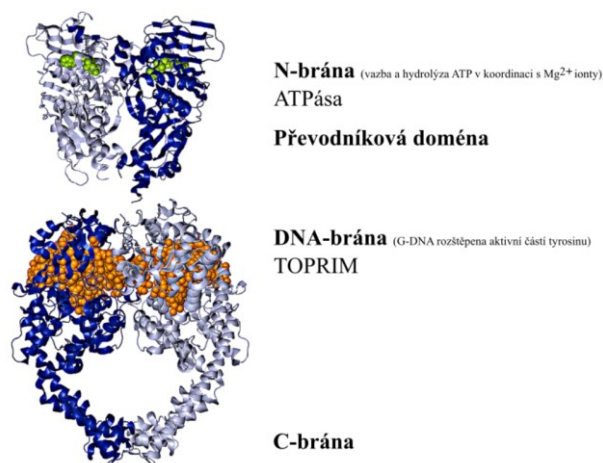
### 2.1.1 Struktura TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$

Gen kódující TOP II $\alpha$  se v lidském genomu nachází na chromozomu 17q21 (Tsai-Pflugfelder *et al.*, 1988), zatímco gen kódující TOP II $\beta$  se nachází na chromozomu 3p24 (Jenkins *et al.*, 1992). Sekvence obou genů i proteinů vykazuje pozoruhodnou shodu. Aminokyselinová sekvence je v 68 % identická, nicméně podobnost jednotlivých částí je různá (Austin *et al.*, 2018).

Kvartérní struktura TOP II je charakterizovaná jako homodimer. Monomerní jednotku těchto enzymů můžeme rozdělit do tří částí (Obr. 2, Obr. 3). Na N-konci proteinu se nachází místo pro vazbu molekuly ATP, střední část proteinu zahrnuje doménu TOPRIM a DNA vázající doménu, kde se nachází aktivní místo s katalyticky aktivním tyrozinem. Právě tato doména zodpovídá za rozpojení a opětovné vytvoření fosfodiesterové vazby DNA. C-konec zodpovědný za enzymovou specifitu je také nejvíce rozdílnou částí. Tato část je potřebná pro jadernou lokalizaci, regulaci enzymové aktivity posttranslačními modifikacemi a regulaci enzymové funkce interakcemi s dalšími proteiny (Nitiss, 2009a).



Obr. 2 Schéma porovnávající aminokyselinovou sekvenci izoforem TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$ . Pod obrázkem je procentuální zastoupení pro totožnost a podobnost (vysoká podobnost v oblasti enzymu a variace v krátkém úseku na N-konci a C-konci). Převzato a upraveno z Bollimpelli, Dholaniya a Kondapi (2017)



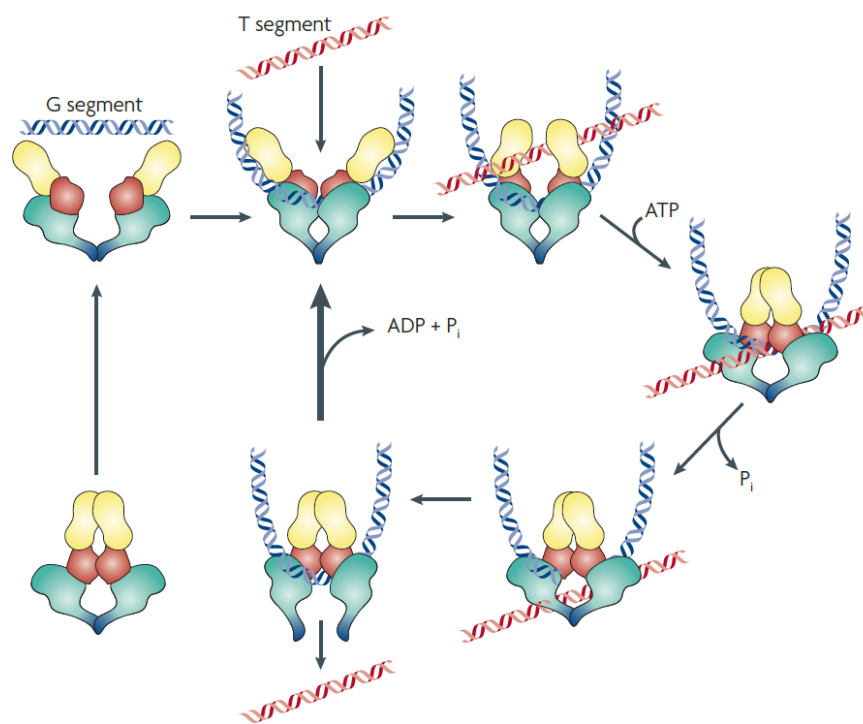
Obr. 3 Krystalická struktura enzymu TOP II eukaryotických buněk. Zeleně znázorněna vazba ATP a oranžově vazba DNA. Převzato a upraveno z Vávrová a Šimůnek (2012)

### 2.1.2 Katalytická aktivita TOP II

Hlavní katalytickou funkcí TOP II je schopnost štěpit fosfodiesterové vazby v obou vláknech DNA. Enzym provede dvouřetězcový zlom v části DNA označované jako G-segment (z angl. gate). Tímto zlomem se provlékne druhá část dvouvláknové neporušené DNA nazývané T-segment (z angl. transported). Fosfodiesterová skupina přerušeno vlákna se kovalentně váže na tyrozinové zbytky na každé monomerní jednotce (Tyr805 a Tyr821 pro lidskou TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$ ). Pro reakci je nutná přítomnost  $Mg^{2+}$  a energie z hydrolyzy ATP (Deweese a Osheroff, 2009).

Před kontaktem s DNA mají podjednotky enzymu otevřenou konformaci umožňující přístup k DNA. V prvním kroku se TOP II váže na DNA pomocí části nazvané DNA-brána (Obr. 3, červená část enzymu v Obr. 4). Během štěpné reakce se tyrozinový zbytek v aktivním místě každého monomeru kovalentně naváže na 5' fosfátovou skupinu jednoho z vláken DNA. V sekvenci DNA je patrný rozdíl 4 bází mezi jednotlivými místy rozdělení. Tento meziprodukt je označován jako štěpný komplex a má za normálních okolností pouze krátkou životnost. Následuje prostup T-segmentu do prostoru C-brány (zelená část enzymu na Obr. 4) a jeho uvolnění. Hydrolyza molekul ATP za vzniku ADP a anorganického fosfátu v N-bráně probíhá asynchronně. Hydrolyza jedné molekuly ATP probíhá ve chvíli průchodu vlákna, zatímco hydrolyzou druhé molekuly ATP se uvolňuje N-brána a struktura enzymu se vrací do počáteční fáze (Nitiss, 2009a). Celý proces je znázorněn na Obr. 4.

Specifika této reakce se liší mezi jednotlivými zástupci TOP II, přičemž každý díky vnitřním (např. struktura), tak vnějším (např. interakce protein-protein a časová/prostorová regulace) charakteristikám umožňuje rozdílné topologické změny DNA. Pravděpodobně nejvýraznější rozdíly můžeme najít u eukaryotní TOP II a bakteriální gyrasy, které jsou si relativně podobné strukturně, ale gyrasa je na rozdíl od TOP II schopná zvyšovat nadšroubovicové vinutí. Chemická reakce je při štěpení a opětovném uzavření dvouřetězcové DNA vysoce účinná, aby se zabránilo rozsáhlému genotoxickému poškození. Představuje však také zranitelný bod pro inhibici antimikrobiálními nebo protinádorovými látkami (McKie, Neuman a Maxwell, 2021).



Obr. 4 Schématické znázornění katalytického cyklu TOP II. Převzato a upraveno z Nitiss (2009a)

### 2.1.3 Fyziologické funkce TOP II $\beta$

Mechanismus enzymatické reakce TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  je téměř identický (Drake *et al.*, 1987). Jejich funkce v buňkách jsou však specifické a obě jsou ve svých specifických funkcích nezastupitelné. TOP II $\alpha$  je nezbytná pro dělení buněk, konkrétně je na ní závislá kondenzace chromozomů (Grue *et al.*, 1998) a segregace sesterských chromatid po replikaci DNA, aby bylo možné nově syntetizovaný genom věrně rozdělit do dceřiných buněk v mitóze. Tato funkce se odráží i na regulaci její buněčné exprese, která je obecně velmi malá, ale zvyšuje se na konci syntetické fáze buněčného cyklu a nejvyšší hladiny jsou pozorovatelné v přechodu G<sub>2</sub> fáze a mitózy (Woessner *et al.*, 1991; Lee a Berger, 2019). Na základě nových studií je TOP II $\alpha$  nutná i k dalšímu udržení struktury chromozomů a dá se tedy říct, že má i strukturní funkci. Ke kondenzaci chromatinu pravděpodobně částečně dochází na základě souhry mezi TOP II $\alpha$  a dalšími proteiny z rodiny tzv. SMC komplexů, jako je kondenzin (Nielsen *et al.*, 2020). Specifická dekatenační aktivita TOP II $\alpha$  je podmínkou správné a úplné segregace chromozomů před nástupem metafáze (Porter a Farr, 2004; Nagasaka *et al.*, 2016) a je také důležitá pro rozdělení chromatid v oblastech ribosomální DNA během anafáze spolu s dalšími proteiny jako je PICH, tankyrasa a kondenzin II (Nielsen *et al.*, 2015; Daniloski *et al.*, 2019). Z tohoto vyplývá zásadní role TOP II $\alpha$  pro proliferující, a tedy i nádorové buňky. Buněčné role TOP II $\beta$  jsou však v porovnání s TOP II $\alpha$  pochopeny mnohem méně. Na rozdíl od TOP II $\alpha$  genetické vyřazení TOP II $\beta$  nevede bezprostředně k buněčné smrti nebo ke zjevným defektům na buněčné úrovni. Její nedostatek se projeví až při procesu buněčné diferenciaci. Buněčné funkce TOP II $\beta$  jsou proto v současnosti aktivně zkoumány (Bollimpelli, Dholaniya a Kondapi, 2017).

#### 2.1.3.1 Regulace transkripce zprostředkovaná TOP II $\beta$

Účast TOP II $\beta$  v regulaci transkripce některých genů a její asociaci s různými proteinovými komplexy během tohoto procesu poskytují mnohé literární zdroje. Pro expresi genů, které jsou aktivované jadernými receptory hormonů, jsou místně specifické přechodné dvouřetězcové zlomy navozené TOP II $\beta$  nezbytné. TOP II $\beta$  byla nalezena v oblasti promotoru těchto genů spolu s proteiny, které se za normálních podmínek účastní oprav DNA (PARP, DNA-PK, Ku-70, Ku-86) (Ju *et al.*, 2006). Pro produkty genů nezbytných pro časný vývoj nervové soustavy a diferenciaci neuronů postačuje

přítomnost TOP II $\beta$  v promotorové oblasti k indukci jejich exprese, aniž by byl přítomen jakýkoliv vnější podnět (Madabhushi *et al.*, 2015). U kortikálních neuronů s deplecí TOP II $\beta$  pomocí RNA interference byla exprese genů delších než 200 kb celkově snížena kvůli narušení elongace při transkripci (King *et al.*, 2013). Ve studii Lyu *et al.* (2006) bylo pozorováno, že u přibližně 30 % genů spojených s buněčnou diferenciací v mozku myších embryí je změněný profil exprese po depleci TOP II $\beta$ , a to v obou směrech. Naopak exprese genů kódujících proteiny potřebné obecně pro růst nebo i pro velmi časně fáze buněčné diferenciace zůstala nezměněna. Přítomnost TOP II $\beta$  byla prokázána i pomocí imunoprecipitace chromatinu na 5' konci mnoha těchto genů. Následně studie jednoho z genů, jejichž exprese byla pozměněná po depleci TOP II $\beta$  (Kcnd2), odhalily přítomnost TOP II $\beta$  v promotorové části tohoto genu. Tyto výsledky společně podporují roli TOP II $\beta$  v aktivaci/represi genů, jejichž exprese je regulována v průběhu vývoje, zvláště pak v pozdních stádiích diferenciace neuronů. Podobné velmi rozsáhlé změny v transkripci genů byly pozorovány i ve studii, která se zaměřila na rozdíly v transdiferenciaci mesenchymálních kmenových buněk kostní dřevě do neuronálního fenotypu po depleci TOP II $\beta$  pomocí RNA interference. I v těchto buňkách deplece TOP II $\beta$  způsobila změnu exprese genů pro některé iontové kanály a transportéry, geny vápníkového metabolismu, a také genů pro signální molekuly účastnící se například nitro-buněčného transportu, tvorby buněčné morfologie, polarity nebo tvorby axonů (Isik *et al.*, 2015). Při analýze kmenových buněk postmitotických neuronů byla odhalena vazba TOP II $\beta$  na chromozomy v regulačních oblastech obsahujících histon H3 methylovaný na lysinu (Tiwari *et al.*, 2012). Bylo také zjištěno, že TOP II $\beta$  aktivuje expresi genů, které byly původně potlačeny ve struktuře chromatinu vyššího řádu a lokalizovány vedle AT bohatých intergenových oblastech (Sano *et al.*, 2008). Tato vazebná místa fungují jako promotorové oblasti genů zahrnutých v neuronální diferenciaci (Tiwari *et al.*, 2012).

Při mutaci TOP II $\beta$  u myších embryí pozorujeme normální neurogenezi, avšak motorické axony nedosahují ke kosterním svalům a senzorní axony do míchy. Tyto poruchy vedou k poškození dýchání a smrti mláďat krátce po narození (Yang *et al.*, 2000). Klíčovou roli TOP II $\beta$  v pozdějších stádiích diferenciace předpokládá i studie provádějící pozorování na modelu *in vitro* kultury neuronů izolovaných ze středního mozku myši, kde při absenci gliových buněk byly neurony viabilní po dobu devíti dní. Desátý den



následovalo radikální snížení viability těchto buněk (Bollimpelli a Kondapi, 2015). Studie se specifickým vyřazením TOP II $\beta$  u myších modelů prokázala odchylku vzoru stratifikace při vývoji mozkové kůry v důsledku downregulace extracelulárního matrixového proteinu reelinu zprostředkovanou topoisomerasou (Lyu a Wang, 2003). Poškození normální funkce nervových buněk bylo pozorováno i po farmakologické inhibici TOP II $\beta$  pomocí ICRF-193, kdy dochází k signifikantní blokaci růstu neuritů a formaci růstové čepičky (growth cone). Navíc embryonální neurony bez TOP II $\beta$  nebyly schopné navázat spojení se svalovými buňkami (Nur-E-Kamal *et al.*, 2007). Mutovaná TOP II $\beta$  byla při genetickém screeningu odhalena jako příčina poruchy cílení neuritů v axonech gangliových buněk narušující vizuální reakci u organismu *Danio rerio* (Nevin *et al.*, 2011). Navíc v mezencefalických dopaminergních neuronech byla TOP II $\beta$  detekována jako navazující cíl v genezi axonů zprostředkované Nurr1 (Heng *et al.*, 2012). Také upregulace genu NGFR P75, který je obvykle vázán a potlačován TOP II $\beta$ , vede k předčasné smrti postmitotických neuronů (Tiwari *et al.*, 2012). Byl také nalezen transkripční faktor Sp1 regulující odnětí TOP II $\beta$  při neuronální diferenciaci buněk SH-SY5Y (Guo *et al.*, 2014).

#### 2.1.3.2 Opravy DNA

Již jedny z prvních studií týkajících se vlivu inhibice TOP II a UV záření na DNA navrhly, že existuje vzájemný vztah mezi aktivitou TOP II $\beta$  a opravami poškozené DNA. Později byla dokonce TOP II $\beta$  označena jako jeden z klíčových enzymů ovlivňující reparaci DNA (Popanda a Thielmann, 1992). Pouze hladiny TOP II $\beta$  (nikoli TOP II $\alpha$ ) jsou určující pro poškození alkylačními činidly, jako je melfalan, které způsobují vznik kovalentních vazeb mezi sousedními řetězci DNA (Emmons *et al.*, 2006). Také po podání genotoxinů s jiným mechanismem poškození DNA, bleomycinu a VP-16, byla zaznamenána zvýšená akumulace poškození DNA v myších ovariálních granulosačních buňkách, kterým byla exprese TOP II $\beta$  snížena po narození pomocí Cre rekombinasového systému (Zhang *et al.*, 2013). Zvýšené zatížení poškozením DNA bylo pozorováno i v NCH421k glioblastomové buněčné linii s deplecí TOP II $\beta$ , které byly ovlivněny sloučeninami navozující přímé poškození DNA alkylací (methylmesylát, cisplatina, temozolomid) nebo oxidací (peroxid vodíku) (Kenig *et al.*, 2016). Vliv obou izoform na poškození DNA vyvolané peroxidem vodíku bylo sledováno také v buněčných liniích odvozených z neuroblastomu a astrocytomu. V této studii použili

RNA interferenci k ovlivnění exprese jak TOP II $\alpha$ , tak TOP II $\beta$ . Zatímco deplece TOP II $\alpha$  v těchto buňkách oxidační poškození DNA snižovala, deplece TOP II $\beta$  naopak míru poškození zvyšovala a buňky byly k poškození citlivější cestami Ku-70, WRN ATP-dependentní helikasa a cestou závislou na DNA polymerase  $\beta$  (Mandraju, Kannapiran a Kondapi, 2008). Podobné zjištění provedla stejná skupina na modelu primárních cerebelárních granulárních neuronů (Mandraju *et al.*, 2011). Mutace WRN helikasy způsobuje jeden ze syndromů předčasného stárnutí (Wernerův syndrom). Uvádí se tedy, že TOP II $\beta$  je buď přímo nebo nepřímo spojena s procesy a znaky stárnutí jako je například postupná ztráta genomové stability, epigenetické změny, dysfunkce mitochondrií a změny v mezibuněčné komunikaci. Vzhledem k tomu, že role TOP II $\beta$  v transkripci a reparaci DNA je nepopiratelná, je možné, že se uplatňuje i jako klíčový hráč při udržování stability genomu. Dále byla pozorována i regulace excize bází přímo nebo nepřímo zprostředkovaná TOP II $\beta$  v primárních cerebelárních granulárních neuronech ovlivněných nitrosoureou (Gupta *et al.*, 2012).

#### 2.1.3.3 Stárnutí

Role TOP II $\beta$  se předpokládá například při modifikaci struktury chromatinu a epigenetické regulaci neuronálních genů spojených s diferenciací neuronů a dlouhověkostí (Tiwari *et al.*, 2012). Podobný způsob modifikace chromatinu zprostředkovaný TOP II $\beta$  byl zaznamenán i další studií (Ju *et al.*, 2006). Předpokládá se i role TOP II $\beta$  v mitochondriální dysfunkci: TOP II $\beta$  je jediná známá TOP II, nalezená v savcích mitochondriích. Avšak jedná se o zkrácený derivát jaderné TOP II $\beta$  o velikosti přibližně 150 kDa (Low, Orton a Friedman, 2003). V nervovém systému je proces, při kterém neurony vysílají axony, aby dosáhly svých správných cílů, jednou z klíčových funkcí v mezibuněčné komunikaci. Některé výzkumy naznačují jasnou roli TOP II $\beta$  v tomto procesu, a také při formaci růstových čepiček neuronů. Pokles aktivity TOP II $\beta$  v průběhu stárnutí tak možná může vést ke komplikacím v intracelulární komunikaci u dospělých. TOP II $\beta$  je v některých studiích označována za marker stárnutí a DNA reparace (Mandraju *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2012). Tuto teorii podporuje také to, že se exprese TOP II $\beta$  snižuje v závislosti na věku v oblasti smozečku u potkanů (Kondapi *et al.*, 2004).

## 2.2 Inhibice topoisomeras jako mechanismus protinádorové terapie

Topoisomerasy jsou důležitým buněčným cílem v terapii nádorových onemocnění zejména vzhledem k jejich stěžejní roli při metabolismu DNA (transkripci a replikaci), které jsou v nádorových buňkách často narušeny. Většina látek cílí buď na TOP I nebo TOP II, zatímco známe i látky, které jsou schopné inhibice obou enzymů. Bylo prokázáno, že lidské nádory exprimují vyšší hladiny mRNA TOP II než normální tkáň, přičemž zvýšená exprese TOP II $\alpha$  je spojena s nejagresivnějšími a vysoce proliferativními novotvory (Cummings a Smyth, 1993). Protinádorová léčiva cílicí na TOP II jsou jedny z nejběžněji používaných chemoterapeutických látek (zahrnují například doxorubicin, etoposid, mitoxantron a další). V současné době představují efektivní strategii při boji s nádorovými onemocněními. Léčiva zasahující TOP II spadají do dvou kategorií – jedná se buď o topoisomerasové jedy nebo katalytické inhibitory topoisomerasy II. Za normálních okolností má štěpný komplex DNA s kovalentně navázanou TOP krátkou životnost a je snadno vratný (Nitiss, 2009b). V případě, že se celková aktivita TOP, a tedy i množství štěpného komplexu sníží, buňky nebudou schopné segregace sesterských chromatid, buněčný cyklus se zastaví v tzv. dekatenačním kontrolním bodě (Deming *et al.*, 2001) a pokud není zajištěna včasná náprava, může být spuštěna apoptóza. Na druhou stranu zvýšení hladiny štěpného komplexu vede k permanentním dvouřetězcovým zlomům DNA. Opět je zastaven buněčný cyklus a opravné procesy a pokud je poškození závažné, nastává apoptóza a buněčná smrt (Deweese a Osheroff, 2009).

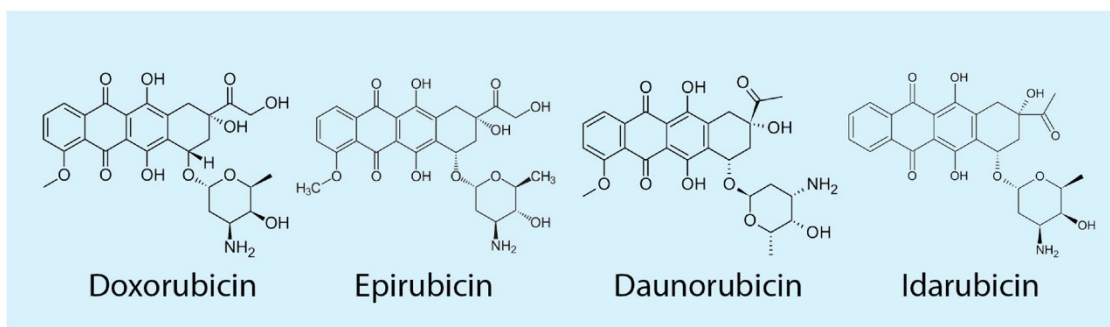
### 2.2.1 Topoisomerasové jedy

Za topoisomerasové jedy označujeme látky stabilizující vzniklý štěpný, nebo také ternární komplex (složený z inhibitoru, enzymu a DNA). Přítomnost inhibitoru zabraňuje opětovnému spojení vláken G-segmentu DNA a znemožňuje obnovení enzymu. Název skupiny vyplývá právě ze schopnosti transformace enzymu do silných buněčných toxinů. Tuto skupinu můžeme obecně rozdělit na látky interkalační (např. akridiny, elipticiny, aktinomyciny, antracendiony, antracykliny) a neinterkalační (např. epipodofylotoxiny) (Topcu, 2001). Objev TOP II $\beta$  vyvolal otázku, zda TOP II $\alpha$ , TOP II $\beta$  nebo obě izoformy jsou cílem různých TOP II jedů. Nicméně řada studií ukazuje, že obě formy, jak TOP II $\alpha$ , tak TOP II $\beta$ , jsou cílem těchto látek (Austin *et al.*, 2018).

### 2.2.1.1 Antracykliny

Antracykliny patří mezi tzv. interkalační inhibitory TOP II. První zástupce této skupiny se podařilo izolovat již v šedesátých letech dvacátého století. Dnes patří mezi jedny z nejúčinnějších protinádorových léčiv. Strukturou (Obr. 5) se jedná o planární molekuly složené z tetracyklického aglykonu vázající cukernou složku (například daunosamin v molekule daunorubicinu) prostřednictvím glykosidické vazby (Marinello, Delcuratolo a Capranico, 2018).

Antracyklinová antibiotika jsou zásadní složkou kombinované chemoterapie pro různé typy nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu, leukemie, lymfomů a sarkomů. Zástupci doxorubicin a daunorubicin patří do první generace antracyklinů. Zatímco daunorubicin je indikován při akutních lymfoblastických a myeloblastických leukemiích, doxorubicin je aktivnější v terapii lymfomů, sarkomů a širokém spektru solidních nádorů (rakovina prsu, plic, močového měchýře, kostí a děložního čípku). V současnosti je však nejpoužívanější druhá generace antracyklinů (epirubicin a idarubicin) (Martins-Teixeira a Carvalho, 2020).



Obr. 5 Chemická struktura klinicky nejpoužívanějších antracyklinových antibiotik. Převzato z Marinello, Delcuratolo a Capranico (2018)

Stabilizace ternárního komplexu je pouze jedním z možných mechanismů účinku těchto látek. Vzhledem ke struktuře planární části molekuly mohou působit interkalačně. Dále je možná indukce vzniku volných radikálů vedoucí k oxidačnímu poškození DNA. Popsán byl i vznik DNA aduktů (Gewirtz, 1999). O molekulárním mechanismu protinádorového účinku antracyklinů se spekulovalo relativně dlouho, také kvůli jejich ovlivnění více buněčných cílů a jednoznačné určení TOP II jako hlavního a zásadního cíle antracyklinů přinesly až korelační studie mezi expresí TOP II $\alpha$  a citlivostí k antracyklinům u různých nádorových buněk (Tewey *et al.*, 1984). Při absenci TOP II

nemohl totiž sám doxorubicin produkovat dvouřetězcové zlomy v DNA. Doxorubicin, jako jeden z klasických zástupců antracyklinů může inhibovat katalytický cyklus ve dvou různých krocích. Při nízké koncentraci doxorubicin blokuje opětovné spojení vláken DNA, čímž vznikají vysoké hladiny tzv. štěpných komplexů TOP II proteinu kovalentně navázaného na rozštěpená vlákna DNA. Ve vysokých koncentracích se doxorubicin chová jako interkalátor zabráněním navázání TOP II na DNA (Tewey *et al.*, 1984). Těmito mechanismy dochází k blokádě transkripce, replikace a tvorba zlomů vláken DNA může vést až k apoptóze. Součástí buněčné odpovědi na stabilizaci štěpných komplexů (a tedy jejich vyšší koncentraci v jádře) je selektivní proteolýza zprostředkovaná 26S proteasomem. I když během této odpovědi byla zaznamenána i degradace TOP II $\alpha$ , byla značně nižší než degradace TOP II $\beta$ . A degradace TOP II $\beta$  zprostředkovaná terapií byla závislá na transkripci nikoli na replikaci. Vysvětlením může být převládající role TOP II $\beta$  v transkripci spíše než role TOP II $\alpha$  v tomto procesu (Mao *et al.*, 2001). Dřívější experimenty předpokládají, že buňky se zvýšenou expresí TOP II jsou citlivější k TOP II jedům oproti buňkám s nižšími hladinami TOP II (Beck *et al.*, 1993).

Klinické použití antracyklinů je často limitováno nežádoucími účinky, zejména pak kardiotoxicitou. Byly popsány tři odlišné typy antracykliny navozené kardiotoxicity. Akutní nebo subakutní toxicita se vzácně objevuje během léčby nebo bezprostředně po jejím skončení. Následkem jsou přechodné arytmie, perikarditida či selhání levé komory. Chronická antracykliny navozená kardiotoxicita se obvykle projeví během prvního roku léčby a je asociována s kumulativní dávkou léku (Shan, Lincoff a Young, 1996). Podle von Hoff *et al.* (1979) byl výskyt městnavého srdečního selhání při dávkách nižších než 400 mg/m<sup>2</sup> povrchu těla zaznamenán v 0,14 % případů. Výskyt se dále zvyšoval až k 1 % s dávkou 550 mg/m<sup>2</sup> a k 18 % při dávce 700 mg/m<sup>2</sup>. Třetí formou je pak tzv. pozdní forma kardiotoxicity projevující se v řádu let od ukončení terapie. Můžeme ji pozorovat zvláště u dospělých s historií malignity v dětství. Navíc kardiotoxicita vznikající v důsledku dvouvláknových zlomů DNA zprostředkovaná vazbou TOP II $\beta$ -doxorubicin navodila i další související transkripční změny vedoucí k vadné mitochondriální biogenezi a metabolickému selhání (Zhang *et al.*, 2012). Mezi další nežádoucí účinky se pak řadí například myelosuprese, nauzea, zvracení, alopecie či mukositida. Pokud v průběhu infuze dojde k extravazaci, antracykliny způsobují těžkou místní tkáňovou

reakci spojenou s postupným vznikem těžce se hojících vředů (Shan, Lincoff a Young, 1996).

Mechanismy vzniku kardiotoxicity byly už od jejího prvního klinického pozorování předmětem intenzivního výzkumu, což vedlo k mnoha hypotézám. Hypotéza vzniku kardiotoxicity založená na oxidačním stresu zahrnující intramyokardiální produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) získala pravděpodobně nejširší uznání, nicméně celá řada výsledků, převážně z klinického pozorování hovoří proti této teorii (Štěrbá *et al.*, 2013).

Mezi další diskutované mechanismy kardiotoxicity patří například metabolismus antracyklinů na více hydrofilní a kardiotoxické látky hromadící se v kardiomyocytech (Menna *et al.*, 2007); poškození exprese různých důležitých srdečních proteinů (Boucek *et al.*, 1999); rozvrat buněčné a mitochondriální homeostázy  $\text{Ca}^{2+}$  (Solem, Henry a Wallace, 1994) nebo poškození mitochondriální DNA (Lebrecht *et al.*, 2005).

Jelikož je TOP II $\beta$  pravděpodobně jediná TOP II přítomná v terminálně diferencovaných kardiomyocytech, některé studie předpokládají, že může přispívat k rozvoji kardiotoxicity. Například studie Lyu *et al.* (2007) doložila, že dexrazoxan specificky snižuje fosforylaci histonu H2AX (marker poškození DNA) navozenou doxorubicinem v H9C2 buněčné linii. Snížení fosforylace dexrazoxanem nebylo patrné, pokud poškození DNA bylo navozeno kamptotecinem (inhibitor TOP I) nebo peroxidem vodíku. Doxorubicinem indukované poškození DNA bylo také sníženo po inhibici proteazomu bortezomibem a MG132. Taktéž mnohonásobně nižší byla fosforylace H2AX myších embryonálních fibroblastů s geneticky depletovanou TOP II $\beta$ . Tyto skutečnosti naznačují, že dexrazoxan antagonizuje doxorubicinem navozené poškození DNA díky interferenci s TOP II $\beta$ . Tuto hypotézu potvrdila na molekulární úrovni studie Zhang *et al.* (2012), která na myších kardiomyocytech se specifickou deplecí TOP II $\beta$  prezentuje, že TOP II $\beta$  může přímo přispívat k rozvoji doxorubicinem navozené kardiotoxicity, protože TOP II $\beta$  mutantní kardiomyocyty byly doxorubicinem mnohem méně poškozené než kardiomyocyty s funkční TOP II $\beta$ . Tato studie také nabízí spojení se vznikem mitochondriální dysfunkce jako jednoho z nejdůležitějších průvodních jevů antracyklinové kardiotoxicity ve formě změny membránového potenciálu ústící v strukturní a funkční abnormality (Wallace, 2003; Tokarska-Schlattner *et al.*, 2006). Zhang *et al.* (2012) popisují, že mitochondriální dysfunkce vzniká sekundárně po

potlačení PPAR $\gamma$  1 $\alpha$  a PPAR 1 $\beta$  (Peroxisome proliferator-activated receptor koaktivátor 1 $\alpha$ , respektive koaktivátor 1 $\beta$ ). Jejich hladiny byly o 50 % sníženy po expozici doxorubicinu, avšak při depleci TOP II $\beta^{-/-}$  v kardiomyocytech nedošlo k žádné změně.

Pro minimalizaci srdeční toxicity vyvolané antracykliny je v klinické praxi jednoznačně doporučeno pro všechny pacienty v současnosti pouze omezení kumulativní dávky (např. doxorubicin 450–550 mg/m<sup>2</sup>). Další navržené metody zahrnují změnu způsobu podání (upřednostnění pomalé infuze), použití analogů z druhé generace antracyklinů, liposomálních lékových forem (liposomální daunorubicin či doxorubicin, pegylovaný liposomální doxorubicin). Navrženo bylo také možné podání kardioprotektiva (dexrazoxan, N-acetylcystein, probukol) či zařazení výživových doplňků (vitamín A, vitamín C, koenzym Q, karnitin) (Wouters *et al.*, 2005). Jediným kardioprotektivem registrovaným pro prevenci antracyklinové kardiotoxicity je však dosud pouze dexrazoxan. Antioxidanty, které by měly omezovat vznik ROS a které se zdály účinné v *in vitro* studiích však nepřinesly konzistentní výsledky, pokud byly podávány u zvířecích modelů (Van Vleet, Ferrans a Weirich, 1980; Herman *et al.*, 1985) nebo dokonce v klinickém hodnocení. I u N-acetylcysteinu (nejvíce preklinicky slibné látky) se v prospektivní randomizované klinické studii ukázala jeho neúčinnost při použití za účelem zmírnění antracykliny navozené kardiotoxicity (Dresdale, Barr a Myers, 1982).

### 2.2.2 Katalytické inhibitory topoisomerasy II

Katalytické inhibitory TOP II jsou heterogenní skupinou sloučenin se schopností inhibovat aktivitu TOP II. Na rozdíl od klasických topoisomerasových jedů jim však chybí schopnost stabilizovat štěpný komplex (Andoh a Ishida, 1998). Tyto sloučeniny mají různorodou strukturu i rozmanitý mechanismus účinku, kdy mohou zasahovat do různých částí katalytického cyklu. Mohou blokovat vazbu mezi DNA a TOP II (aklarubicin a suramin), stabilizovat nekovalentní komplexy DNA a TOP II (merbaron, ICF-187, strukturně příbuzné deriváty bisdioxopiperazinu) nebo inhibovat vazbu ATP (novobiocin). Některé jsou specifické pro TOP II, jiné mohou mít i další biologické cíle (např. fostriecin). Používají se například jako protinádorová léčiva (aklarubicin, sobuzoxan), kardioprotektiva (dexrazoxan) nebo jako modulátory za účelem zvýšení účinnosti jiných látek (suramin, novobiocin) (Larsen, Escargueil a Skladanowski, 2003).

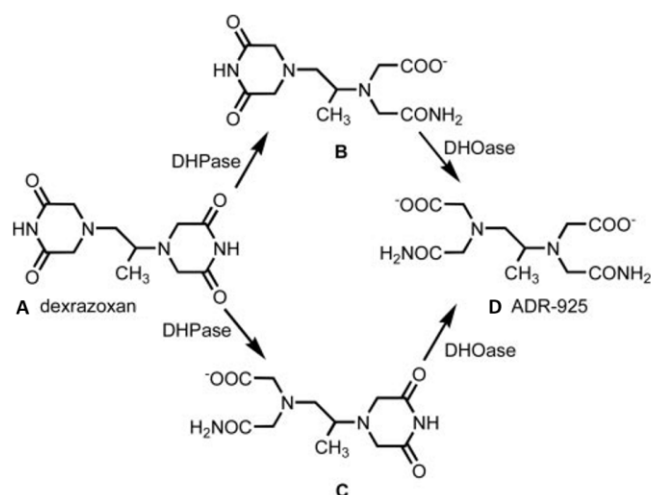
### 2.2.2.1 *Dexrazoxan*

Dexrazoxan je (+) enantiomer racemické sloučeniny ICRF-159 (razoxan) ze skupiny bis-dioxopiperazinů (Andoh, 1998). Jedná se o cyklický ve vodě rozpustný derivát silného chelatačního činidla kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Weiss, Loyevsky a Gordeuk, 1999).

Dexrazoxan (ICRF-187) byl původně vyvíjen jako protinádorová látka. Jeho protinádorové účinky ale nebyly výrazné (Weiss, Loyevsky a Gordeuk, 1999). U zvířecích modelů byl však potvrzen jeho kardioprotektivní účinek při terapii antracyklinovými antibiotiky (Herman *et al.*, 1972). Při současném podávání dexrazoxanu s antracyklinovými antibiotiky bylo prokázáno zlepšení přežití a minimalizace funkčních změn srdce u různých zvířecích modelů. Dexrazoxan navíc umožňoval u zvířat tolerovat vyšší kumulativní dávky antracyklinů s nižšími srdečními vedlejšími účinky (Herman *et al.*, 1988). I v prospektivní randomizované klinické studii provedené u žen s pokročilým karcinomem prsu byla ve skupině s dexrazoxanem zaznamenána významně nižší incidence městnavého srdečního selhání s lepším zachováním ejekční frakce levé komory ve srovnání s placebo skupinou (Speyer *et al.*, 1988). I v randomizovaných dvojitě zaslepených studiích u pacientů v dětském i dospělém věku s různými formami nádorového bujení byl ochranný účinek dexrazoxanu před poškozením srdce potvrzen (Hensley *et al.*, 2009). Díky dexrazoxanu je také možné podávat pacientům vyšší kumulativní dávku doxorubicinu za současné tolerance vedlejších účinků cílících na srdeční sval (Speyer *et al.*, 1992).

Mechanismus kardioprotektivního působení dexrazoxanu byl původně přisuzován schopnosti chelatovat volné ionty sloučeninou vznikající hydrolyzou dexrazoxanu (Obr. 6). Dexrazoxan totiž podléhá hydrolyze za vzniku ADR-925 (analog EDTA), který je schopen chelatovat železo.





Obr. 6 Reakční schéma hydrolyzy dexrazoxanu (A) na meziproducty s jedním otevřeným kruhem (B a C) a finální produkt ADR-925 (D) – převzato a upraveno z Hasinoff a Herman (2007)

Dexrazoxan má však další biologickou aktivitu, která může ovlivnit mechanismus účinku. Je to jeho schopnost inhibovat TOP II (Hasinoff a Herman, 2007). Ani samotné působení ADR-925 nemá protektivní efekt proti působení antracyklinů u neonatálních ventrikulárních kardiomyocytů (Jirkovsky *et al.*, 2019).

### 3 Cíle práce

- Stanovit expresi mRNA TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  u buněčné linie 1 HL-60 a TOP II $\beta$  depletovaných linií 49 HL-60 a 71 HL-60 metodou RT-qPCR
- Návrh a pilotní screening primerů cílících na mutovanou oblast enzymu TOP II $\beta$  použité buněčné linie HL-60
- Stanovit množství proteinu TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  u buněčné linie 1 HL-60 a TOP II $\beta$  depletovaných linií 49 HL-60 a 71 HL-60
- Stanovit citlivost buněčné linie 1 HL-60 a TOP II $\beta$  depletovaných linií 49 HL-60 a 71 HL-60 k dexrazoxanu a stanovit hodnoty IC<sub>50</sub>
- Stanovit citlivost buněčné linie 1 HL-60 a TOP II $\beta$  depletovaných linií 49 HL-60 a 71 HL-60 k daunorubicinu a stanovit hodnoty IC<sub>50</sub>

## 4 Materiál a metodika

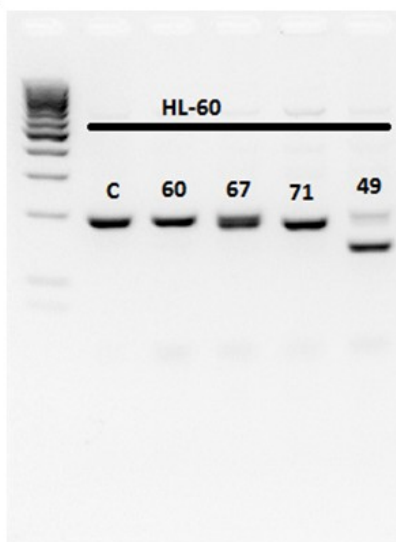
### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Buněčná kultura

Buněčná linie HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) byla odvozená z periferní krve 36leté pacientky trpící onemocněním akutní promyelocytární leukemie v roce 1977 (Collins, Gallo a Gallagher, 1977). Tato buněčná linie má kulatý nebo vejčitý tvar, roste kontinuálně v suspenzní kultuře a neadheruje k plastu ani sklu. Doba zdvojení se pohybuje mezi 36–48 hod (Collins, 1987). Mezi další charakteristiku patří indukovatelnost k diferenciaci v rozličné typy buněk. Převládajícím typem buněk jsou neutrofilní promyelocyty (Gallagher *et al.*, 1979). Příležitostně jsou přítomné myeloblasty, myelocyty a zralejší promyelocytární formy. V přítomnosti DMSO pak buňky dozrávají v granulocyty a po expozici esterům forbolu diferencují v nedělící se mononukleární fagocyty. Charakteristická je také skutečnost, že tyto buňky na svém povrchu neexprimují žádné lymfocytární markery – nejsou přítomné žádné povrchové imunoglobuliny, antigeny spojené s virem Epstein–Barrové ani nedochází k tvorbě rozet s ovčími červenými krvinkami. Pouze okolo 5 % populace buněčné linie HL-60 tvoří rozety s erytrocyty s povrchovou protilátkou nebo protilátkou a komplementem. Enzym terminální deoxyribonukleotidyltransferasa (přítomný v nezralých lymfocytech a vzácně i buňkách akutní myeloidní leukemie) nebyl v linii HL-60 detekován (Koeffler a Golde, 1980). Byť specifické markery pro lymfoidní buňky chybí, tyto buňky exprimují povrchové receptory pro Fc fragment a komplement, které jsou spojovány s diferenciovanými granulocyty (Gallagher *et al.*, 1979). K proliferaci dochází prostřednictvím receptorů pro transferin a inzulin exprimovaných na povrchu buněk. Proto je nezbytná jejich přítomnost v kultivačním mediu (Breitman, Collins a Keene, 1980).

V rámci práce byly využity klony HL-60, které byly modifikovány dr. Jirkovskou a Mgr. Skalickou pomocí metody CRISPR-Cas9 v rámci jejich stáže na pracovišti Newcastle University v Newcastle upon Tyne ve spolupráci s vědeckým týmem prof. Austin. Celý postup přípravy následuje metodiku popsanou v článku dr. Khazeema (Khazeem *et al.*, 2020). Nejprve byly připraveny plasmidy pro kontrolní a potenciálně mutantní linii. Jako základ byl využit plasmid PX458 (Addgene plasmid #48138), který

obsahuje gen pro efektorový protein Cas9, zelený fluorescenční protein (GFP) a v případě potenciálně mutantní linie do něj byla navíc zaklonována naváděcí RNA (gRNA) cílící na exon 1 genu TOP2B. Tyto plasmidy byly poté nukleofekcí vpraveny do buněk. Dva dny poté byly jednotlivé buňky tříděny do jamek 96-jamkové destičky pomocí průtokové cytometrie s využitím signálu GFP jako selekčního markeru. Po dvou až čtyřech týdnech jednotlivé buňky vytvořily kolonie, které bylo možné genotypizovat. Z jednotlivých kolonií byla izolována DNA, poté byl metodou PCR amplifikován gen TOP2B a transkripty byly rozděleny na horizontální gelové elektroforéze (Obr. 7). Pokud se velikost transkriptu lišila od kontrolní kolonie (byla zde očekávaná mutace, došlo tedy k vystřížení několika bází), transkript byl extrahován z gelu a sekvenován. Sekvenování heterozygotních mutantů s mutací v jedné nebo obou alelách nebylo z technických důvodů možné provést (klon č. 49). Následně byly sekvenované transkripty potenciálně mutantních kolonií porovnány s kontrolními v programu LALIGN, a tím došlo k přesnému popisu jednotlivých mutací (Obr. 8). Dále byla deplece TOP2B potvrzena na proteinové úrovni imunofluorescenčně (*pAb – Rabbit Anti-TOP2B 4555, Newcastle University, sAb – Anti rabbit AlexaFluor A11008*) a imunoblotingem (*pAb – Human/mouse monoclonal to human TOP2B, RD Systems, MAB 6348; sAb – Anti-mouse IgG, GE healthcare, NXA931*). Na experimenty popisující depleci proteinu TOP2B dále navazuje tato práce. Celkem bylo vytvořeno a identifikováno několik heterozygotně a 10 homozygotně mutovaných klonů s depletovanou TOP2B, z nichž byl v této práci využit klon číslo 71 jako homozygotní mutant (71 HL-60) a klon číslo 49 jako heterozygotní mutant (49 HL-60).



Obr. 7 Rozdělení transkriptů genu *TOP2B* na horizontální gelové elektroforéze. „C“ značí kontrolní kmen buněk, č. 71 představuje homozygotního mutantu, č. 49 heterozygotního mutantu

```

>>71mutant (150 aa)
Waterman-Eggert score: 1159; 53.9 bits; E(1) < 1.4e-12
89.0% identity (89.6% similar) in 154 aa overlap (1-152:10-150)

      10      20      30      40      50
contro GGGACAGCGGCCCGCAGGG-AGGCGGGAGCGGCG-GCTGCGGCCTCAGGGCCTGTGAGCT
      :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::
71muta GGGCCAGCGGCCCGCAGGGTAGGCGGGAGCGGCGTGCTGCGGCCTCAGGGCCTGTGAGCT
      10      20      30      40      50      60

      60      70      80      90      100     110
contro GGAGGCACTGCCATGGCCAAGTCGGGTGCTGCGGCAGCGGGAGCCGGCGTGGGCGGCGG
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
71muta GGAGGCACTGCC-----GTCGCTGCAGCGCGGGAGCCGGCGTGGGCGGCGG
      70      80      90      100     110

      120     130     140     150
contro CAACGGGGCACTGACCTGGGTGGTAAGTGGCTGG
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
71muta CAACGGGGCACTGACCTGGGTGGTAAGTGGCTGG
      120     130     140     150

```

Obr. 8 Porovnání sekvence kontrolní (1) a homozygotní kolonie (71) HL-60. U homozygotního klonu byla identifikována deleční mutace o délce 13 bází (vyznačeno žlutým rámečkem)

#### 4.1.2 Pomůcky a přístrojové vybavení

- Kultivační lahev 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Švýcarsko)
- Vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- Inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub>, model 311 (Forma Scientific, USA)
- Box s laminárním prouděním vzduchu TopSafe 1.2 (BioAir, Itálie)
- Pístové pipety a špičky (Eppendorf, Německo)
- Pipetovací rozplňovač Midi Plus (BioHit, UK)
- Sérologická pipeta 10 ml (TPP, Švýcarsko)
- Nesterilní mikrozkuhavky různých objemů (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka Assistent (Brand, SRN)
- Optický mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Pipetovací špičky LoRetention pro PCR (Eppendorf, T.I.P.S., Švýcarsko)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní třepačka Vortex V-1 Plus (BioSan, Litva)
- Mikrozkuhavky pro PCR 0,5 ml (Eppendorf, Německo)
- Hlubokomrazicí box -80 °C (Trigon-Plus, Česká republika)
- Mikrotitrační destička pro PCR MicroAmp (Applied Biosystems, USA)
- Transparentní adhezivní film MicroAmp na mikrotitrační destičku pro PCR (Applied Biosystems, USA)
- Centrifuga Hermle Z 300 (Hermle, Německo)
- Real-Time PCR systém Quant studio 6 Flex (Applied Biosystems, USA)
- Owl EasyCast B1 Mini Gel Electrophoresis Systems (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr Tecan Infinite 200M Pro (Tecan, Švýcarsko)
- Destička 96-jamková s vypouklým dnem (GamaGroup, Česká republika)
- Stolní třepací inkubátor NB-205 (N-Biotek, Korea)
- Pasteurova pipeta (Kartell S.p.A, Itálie)
- Termoblok ThermoMixer C (Eppendorf, Německo)
- Elektroforetická vana Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Mini-Protean Glass Plates (Bio-Rad Laboratories, USA)
- ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, USA)

- ImageLab 4.1 software pro ChemiDoc MP
- Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer Stacks (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Nitrocellulose Membranes 0,2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Transferový systém Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Polypropylenová zkumavka s víčkem o objemu 50 ml (Avantor, Česká republika)
- BioSan Programmable rotator Multi Bio RS-24 (Biosan, Litva)
- Sterilní mikrozskumavky o objemu 5 ml (Eppendorf, Německo)
- Pipetovací vanička pro multikanálové pipety (Eppendorf, Německo)
- Mikrotitrační destička 96-jamková (TPP, Švýcarsko)
- Automatická multikanálová pipeta (Eppendorf, Německo)
- Desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph, Německo)
- GraphPad Prism 9 (GraphPadSoftware, Inc., USA)

#### 4.1.3 Chemikálie

- Kultivační médium IMDM (Gibco, Irsko)
- 10 % FBS (Gibco, Irsko)
- 0,4 % Trypanová modř (Sigma, Německo)
- PBS tablety (Sigma, Německo), připraveno podle návodu výrobce použitím redestilované vody, sterilizováno autoklávováním
- NaCl sterilní pro PCR (připraveno pomocí DEPC), 2M
- Trizma hydrochloride solution, 1 M, pH 7,4; pro molekulární biologii (Sigma, Německo)
- Igepal CA-630, 0,08 mM, pro molekulární biologii (Sigma, Německo)
- Lyzační roztok pro PCR (10 mM Tris HCl 7,4; 0,25 % Igepal CA-630; 2 M NaCl, voda pro molekulární biologii)
- DNase I, RNase Free, 1 U/ $\mu\text{l}$  (Thermo-Scientific, USA)
- Luna Universal Probe, One step RT-qPCR Kit (Biolabs Inc., USA)
  - One-Step Reaction Mix – #M3006S, 2 $\times$  koncentrovaný
  - Enzyme Mix – #M3002S, 20 $\times$  koncentrovaný
  - Nuclease-free Water – B1502A
- Real-time PCR kit for Human Reference Genes (Generi Biotech, Česká republika)

- hB2M\_Q3 (HEX), 10×
- Primary TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA)
  - TOP2 $\alpha$  – Hs01032137\_ml (FAM) PN4448892, 20×
  - TOP2 $\beta$  – Hs00172259\_ml (FAM) PN4448892, 20×
- Luna Universal, One step RT-qPCR Kit (Biolabs Inc., USA) – na SybrGreen
  - One-step Reaction Mix – #M3005S, 2× koncentrovaný
  - Enzyme Mix – #M3002S, 20× koncentrovaný
  - Nuclease-free Water – B1502A
- Navrhnuté primery, referenční geny B2M, SDHA, YWHAZ (Generi Biotech, Česká republika)
- Agaróza (Serva, Německo)
- TAE pufr pro gelovou elektroforézu (Thermo-Scientific, USA)
- SYBR safe DNA gel Stain (Invitrogen, USA)
- 50 bp DNA ladder, #N3236L (BioLabs Inc., USA)
- Gel loading Dye blue 6× koncentrovaný #B07021S
- BSA o koncentraci 10 mg/ml (MP Biomedicals, Francie)
- Tris (Penta, Česká republika)
- SDS (Serva, Německo)
- Zásobní roztok 2 % SDS-Tris (0,1 M Tris a pH = 7,5)
- QPRO-BCA kit Standard – 1 % BCA (Cyanagen, Itálie)
- QPRO-BCA kit Standard – 4 % CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (Cyanagen, Itálie)
- TGX Stain-Free FastCast 7,5 % Acrylamide Kit (Bio-Rad Laboratories, USA)
- 10 % APS (Bio-Rad Laboratories, USA)
- TEMED (Bio-Rad Laboratories, USA)
- 5× koncentrovaný nanášecí pufr LSB bez SDS SDS (300 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 25 %  $\beta$ -merkaptoethanol, 0.1 % bromfenolová modř, 50 % glycerol)
- TGS elektroforézový pufr (1×: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Marker molekulových hmotností: Rotimarker Tricolor extra (Roth, Německo)
- Trans-Blot Turbo Transfer Buffer, 5× (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Sušené odstředěné mléko pro blokování (Serva, Německo)



- TBS (10× koncentrovaný roztok: 24 g Tris baze, 5,6 g Tris-HCl, 88 g NaCl, 1000 ml)
- TBS-T 0,05 % (1×, 500 ml TBS, 250 µl Tween-20)
- Blokovací roztok (TBS-T s 5 % sušeného odtučněného mléka)
- Primární protilátka anti-TOP2A a anti-TOP2B, EPR 5377, 1 : 2000 (Abcam, UK)
- Sekundární protilátka 1 mg/ml, Goat pAb6112, 1 : 10000 (Abcam, UK)
- Dexrazoxan (Huaren Chemicals, China)
- DMSO (Sigma, Německo)
- Daunorubicin (Pfizer, Švýcarsko)
- MQ, ultračistá voda pro molekulární biologii (Millipore, USA)
- MTT (Sigma, Německo)
- Isopropanol (Sigma, Německo)
- HCl (Penta, Česká republika)
- Triton X-100 (Sigma, Německo)
- Lyzační roztok MTT (Isopropanol 475 ml; 0,1M HCl 4,35 ml; TritonX-100 25 ml)

## **4.2 Pracovní postupy**

### **4.2.1 Kultivace buněčné linie HL-60**

Práce s buněčnou linií probíhala v buněčné laboratoři Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Kultivace buněk probíhala v plastových sterilních kultivačních lahvích T-25. Bylo používáno kultivační medium obohacené o 10 % fetálního bovinního séra. Kultivační médium bylo temperováno na 37 °C ve vodní lázni. Buňky byly uchovávány v inkubátoru s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub> při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Tyto podmínky měly co nejpřesněji napodobit prostředí lidského těla. V průběhu práce byly dodrženy zásady aseptických technik prací v boxu s laminárním prouděním vzduchu.

### **4.2.2 Pasážování buněčné linie HL-60**

Pasážování buněk probíhalo pravidelně každý třetí až čtvrtý den. Po důkladné homogenizaci buněčné kultury lehkým kýváním se ze zásobní plastové lahve T-25 odebralo 20 µl buněčné suspenze. Ta se v nesterilní mikrozkuhavce o objemu 0,5 ml smísila v poměru 1 : 1 s promíchaným 0,4 % roztokem trypanové modři v PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok). Po 2–5 min, kdy se vzorek s trypanovou modří nechal inkubovat při pokojové teplotě, bylo po promíchání nanášeno 10 µl ke krajům krycího sklíčka na horní a dolní polovinu vyčištěné Bürkerovy komůrky. Trypanová modř je supravitální barvivo a pasivně proniká přes membrány. Živé buňky se díky aktivnímu transportu pomocí ATP tohoto barviva zbavují a nezbarví se. Pomocí optického mikroskopu se proto počítaly buňky jevící se jako bílé na modrém pozadí roztoku trypanové modři v dolní i horní oblasti vždy v pěti čtvercích z devíti – vždy stejným způsobem. Nepočítaly se buňky dotýkající se spodního nebo pravého okraje. Dále byl proveden výpočet pro zjištění počtu buněk v 1 ml suspenze (korekce ředění vynásobením dvěma tisíci). Směšovací rovnicí se vypočetl objem původní suspenze a objem kultivačního média potřebný pro získání koncentrace 0,1 milionů buněk na mililitr obvykle v celkovém objemu 10 ml (dle potřeby buněk v dalším týdnu). Nová kultivační lahev se suspenzí byla označena názvem linie, datem, ředěním, pořadím pasáže a iniciálami pracovníka, který pasážování prováděl. Buňky nepotřebné pro pasáž byly použity pro provedení experimentů.

### 4.2.3 Stanovení exprese mRNA

#### 4.2.3.1 Příprava buněčného lyzátu pro přímé stanovení mRNA metodou RT-qPCR

Při lyzaci buněčné kultury byl používán plastik pro PCR (v čistotě PCR clean). Příslušný objem suspenze s 2 miliony buněk v mililitru byl napipetován do mikrozkuvek. Následovala centrifugace 700× g po dobu 10 min a při teplotě 4 °C. Vzniklá peleta se resuspendovala v 100 µl PBS. Ze vzniklé suspenze se odebralo 2,5 µl suspenze, která byla lyzována 25 µl lyzačního pufru pro PCR. Před použitím byl lyzační roztok doplněn o 10 % DNAsy. Poté proběhla inkubace při pokojové teplotě v délce 5 min. Následovala stejně dlouhá inkubace při 75 °C. Nakonec byly ependorfy přeneseny na led a uložily se do -80 °C v hlubokomrazícím boxu, kde byly skladovány do doby analýzy.

#### 4.2.3.2 Výběr referenčního genu

Pro stanovení genové exprese TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  bylo potřeba vybrat vhodný referenční gen. Na základě dříve provedených studií byl jako referenční gen vybrán B2M z komerčně navržené soupravy Real-time PCR kit for Human Reference Genes obsahující deset nejběžněji používaných referenčních genů včetně genu B2M (Klieber, 2019).

#### 4.2.3.3 Přímé stanovení mRNA metodou RT-qPCR

Nejprve bylo do každé jamky nanášeno 7,5 µl reakční směsi, která byla předem připravena do mikrozkuvky v objemu podle počtu vzorků (s 10 % nadbytkem) za použití promíchaných a centrifugovaných reagensů ze setu Luna Universal Probe, One step RT-qPCR Kit a primerů (Tab. 1). Spočítaný potřebný objem reakční směsi s 10 % objemovým nadbytkem byl připraven do mikrozkuvky. Buněčné lyzáty obsahující mRNA byly po jednom rychle rozmrazeny v dlani a po promíchání na vortexu nanášeny na 96-jamkovou mikrotitrační destičku pro PCR v kvadruplikátech (Obr. 9) – do každé jamky 2,5 µl příslušného lyzátu. Po přikrytí transparentním adhezivním filmem a krátké centrifugaci (2500 rpm) byly vzorky podrobeny polymerázové řetězcové reakci v přístroji Quant Studio 6 Flex (Tab. 2).

	1	49	71	1	49	71	1	49	71	1	49	71
TOP II $\alpha$												
										NFW + TOP II $\alpha$		
TOP II $\beta$												
										NFW + TOP II $\beta$		
B2M												

Obr. 9 Schématické znázornění pipetování na 96-jamkovou PCR mikrotitrační destičku (1 = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; 49 = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; 71 = HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ; NFW = nuclease-free water)

Tab. 1 Příprava reakční směsi pro PCR (převzato a upraveno z Instrukční manuál Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit [online])

Složka	10 $\mu$ l reakce
Luna Universal Probe Reaction Mix	5,0 $\mu$ l
Enzyme Mix	0,5 $\mu$ l
Primery	0,4 $\mu$ l
Nuclease free water	1,6 $\mu$ l

Tab. 2 Nastavení PCR reakce (převzato a upraveno z Instrukční manuál Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit [online])

Cyklus	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	55 °C	10 min	1
Počáteční denaturace	95 °C	1 min	1
Denaturace	95 °C	10 s	40–45
Extenze	60 °C	30 s	

#### 4.2.4 Návrh specifických primerů pro detekci místa mutace enzymu TOP IIβ

##### 4.2.4.1 Návrh mutačního primeru pro detekci enzymu TOP IIβ v buněčné linii HL-60

Pro návrh primeru pro PCR detekci genu byl za pomoci programu Microsoft Excel vytvořen seznam potenciálních primerů v mutaci o délce 18–24 nukleotidů. Stejným principem byl hledán i druhý primer. Program Oligocalc umožnil vytvoření jak forward, tak i reverse primeru a to funkcí SWAP STRANDS. Následně za použití stejného programu byly primery zkontrolovány a do tabulky se zapsaly dvě hlavní charakteristiky – procentuální zastoupení GC a  $T_m$  Salt Adjusted ve °C. Následně pomocí funkce Podmíněné formátování v MS Excel byly barevně zvýrazněny vyhovující parametry. Vybrané primery, které vyhovovaly jak zastoupením GC, tak i  $T_m$  Salt Adjusted ve °C a dalšími charakteristikami, byly poslány do výroby.

##### 4.2.4.2 Příprava vzorků pro detekci přítomnosti TOP IIβ s využitím navržených primerů

Vzorky s buněčným lyzátem mRNA klonů HL-60 TOP IIβ<sup>+/+</sup> a HL-60 TOP IIβ<sup>-/-</sup> pro stanovení přítomnosti TOP IIβ s využitím navržených primerů byly připraveny obdobně jako v bodu 4.2.3.1 a do doby analýzy byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

##### 4.2.4.3 Detekce přítomnosti mutace s využitím navržených primerů

Reakční směsi s obsahem různých kombinací forward a reverse primerů (Tab. 3) byly připraveny do mikrozkrumavek v objemu podle počtu vzorků (s 10 % nadbytkem) za použití promíchaných a centrifugovaných reagentů ze setu Luna Universal, One step RT-qPCR Kit a primerů (Tab. 4). Stejně byly připraveny i reakční směsi s obsahem housekeep genů, které byly vybrány na základě článku Zárybnický *et al.* (2019). Konkrétně se jednalo o B2M, SDHA, YWHAZ. Reakční směsi byly pipetovány na destičku v objemu 7,5 μl pro každý klon. Buněčné lyzáty HL-60 TOP IIβ<sup>+/+</sup> a HL-60 TOP IIβ<sup>-/-</sup> obsahující mRNA byly po jednom rychle rozmrazeny v dlani a po promíchání na vortexu naneseny na 96-jamkovou PCR destičku – do každé jamky 2,5 μl příslušného lyzátu. Pro každou reakční směs byl vytvořen i kontrolní vzorek bez templátu. Po přikrytí transparentním adhezivním filmem a krátké centrifugaci (2500 rpm) byly vzorky analyzovány v přístroji Quant Studio 6 Flex (Tab. 5).

Tab. 3 Kombinace forward a reverse primerů v jednotlivých reakčních směsích. Použité pracovní označení forward a reverse primerů viz Tab. 11

Reakční směs	Forward primer	Reverse primer
MM 1	69	16
MM 2	68	17
MM 3	16	51
MM 4	17	45
MM 5	69	17
MM 6	68	16
MM 7	16	45
MM 8	17	51
MM 9	B2M_F	B2M_R
MM 10	SDHA_F	SDHA_R
MM 11	YWHAZ_F	YWHAZ_R

Tab. 4 Příprava reakční směsi pro PCR (převzato a upraveno z Instrukční manuál Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit [online])

Složka	10 µl reakce
Luna Universal Reaction Mix	5,0 µl
Enzyme Mix	0,5 µl
Forward primer	0,4 µl
Reverse primer	0,4 µl
Nuclease free water	1,2 µl

Tab. 5 Nastavení PCR reakce (převzato a upraveno z Instrukční manuál Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit [online])

Cyklus	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	55 °C	10 min	1
Počáteční denaturace	95 °C	1 min	1
Denaturace	95 °C	10 s	40–45
Extenze	60 °C	30 s	
Křivka tání	60–95 °C	variabilní	1

#### 4.2.4.4 *Elektroforetická separace v agarózovém gelu*

Den před samotným stanovením jsme připravili 3 % agarózový gel v objemu 50 ml a do doby analýzy jsme jej uchovávali v alobalu v lednici. Použili jsme vzorky z předchozího stanovení – konkrétně vzorky s kombinací primerů odpovídající reakčním směsím s označením MM 4 a MM 7 s buněčnými liniemi HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  a kontrolní vzorky bez templátu. Do těchto vzorků jsme přidali barvivo a do jamek gelu jsme vzorky nanесли ve výsledném objemu 5  $\mu$ l. Na agarózový gel byl současně nanесen i obarvený velikostní marker 50 bp DNA v objemu 2  $\mu$ l. Do elektroforetické vany s TAE pufrém bylo přiváděno konstantní napětí 56 V po dobu 2,5 hod. Gel byl poté obarven směsí 4  $\mu$ l SYBR safe DNA Gel Stain v 50 ml vody. V této směsi byl gel třepán po dobu 15 min. Pomocí softwaru Image Lab 4.1 technologií SYBR-Free byla vizualizováno separace fragmentů nukleových kyselin.

### 4.2.5 Stanovení množství proteinu TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$

#### 4.2.5.1 *Příprava vzorků pro stanovení obsahu proteinu*

Ze zbylých buněk po pasáži byl příslušný objem suspenze se 2 miliony buněk v mililitru přenesen do mikrozkuavek a centrifugován při RCF 700 $\times$  g, po dobu 10 min a při teplotě 4 °C. Sediment buněk byl propláchnut v PBS. Po opětovném stočení bylo odsáto přebytečné množství supernatantu a sediment buněk se resuspendoval v SDS-Tris. Poté se 5 min zahřívalo při 95 °C. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C v hlubokomrazícím boxu do doby analýzy.

Z naměřených hodnot celkového proteinu metodou BCA byly vypočteny nanášky odpovídající 10  $\mu$ g celkového proteinu. Vzorky pro nanášení obsahovaly vypočtené množství proteinu, 4  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného nanášecího pufru LSB bez SDS a SDS-Tris pro doplnění celkového objemu do 20  $\mu$ l. Na malé stolní centrifuze byly všechny vzorky stočeny a následně povařeny na termobloku při 95 °C po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C do doby analýzy.

#### 4.2.5.2 *Stanovení koncentrace proteinu v buněčných lyzátech*

V prvním kroku bylo nutno vytvořit kalibrační řadu ředěním standardu BSA ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/ml v SDS-Tris. Z tohoto zásobního roztoku byly

vytvořeny do pěti různých mikrozkušavek roztoky o koncentraci 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 a 0,2 mg/ml, vzorek o nulové koncentraci obsahoval pouze rozpouštědlo (SDS-Tris). Do jamek 96-jamkové destičky bylo pipetováno 10  $\mu$ l těchto zásobních roztoků v triplikátech. Na stejnou destičku bylo také v triplikátech napipetováno 10  $\mu$ l buněčného lyzátu různých ředění (1 $\times$ , 2 $\times$  a 3 $\times$ ). Multikanálovou pipetou bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l reakčního roztoku pro BCA (kyseliny bicinchonové a 4 % roztoku pentahydrátu síranu měďnatého v objemovém poměru 50:1). Poté proběhla inkubace 96-jamkové destičky po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Následně změřila absorbance při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru Tecan. Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační křivka a pomocí rovnice křivky byla vypočítána koncentrace proteinu ve vzorcích.

#### 4.2.5.3 *Separace proteinů z buněčného lyzátu pomocí SDS-PAGE a přenos proteinů na membránu (Western-blot)*

Z akrylamidového kitu TGX Stain-Free FastCast 7,5 % byly ve dvou 50 ml zkumavkách s víčkem dle návodu smíseny roztoky A a B pro separační a zaostřovací část gelu. Poté bylo do každé přidáno ekvivalentní množství 10 % APS a TEMED (Tab. 6, Tab. 7). Takto připravené 7,5 % polyakrylamidové gely se pomocí Pasteurovy pipety nanasly mezi předem vyčištěná skla. Po nalití se vložil hřebínek do gelu mezi skly a takto se nechal gel 45 min polymerizovat. Pokud byla elektroforéza prováděna v jiný den, skla s gely byla obalená navlhčenými utěrkami a byla uchovávána při 8 °C.

*Tab. 6 Složení separačního roztoku v množství přepočítaném pro 2 gely*

<b>Složka</b>	<b>Objem</b>
Resolver A	4,5 ml
Resolver B	4,5 ml
APS	45,0 $\mu$ l
TEMED	4,5 $\mu$ l



Tab. 7 Složení zaostřovacího roztoku v množství přepočítaném pro 2 gely

Složka	Objem
Stacker A	1,75 ml
Stacker B	1,75 ml
APS	17,5 $\mu$ l
TEMED	3,5 $\mu$ l

V den analýzy byly gely ve sklech s vytvořenými jamkami umístěny do kazet a nalitím pufru byla zkontrolována těsnost. Do jednotlivých jamek byly nanесeny kvadruplikáty vzorků v objemu 20  $\mu$ l. Dále bylo do jedné z krajních jamek nanесeno i 2,5  $\mu$ l proteinového žebříčku Rotimarker Tricolor pro odhad molekulové hmotnosti proteinů po rozdělení. Takto připravené kazety se vzorky byly přeneseny do elektroforetické vany s TGS a elektroforetický pufr byl doplněn po odpovídající rysku. Na elektrody bylo následně přiváděno konstantní napětí 120 V. Elektroforéza probíhala do doby, než bromfenolová modř v nanášecím pufru dosáhla konce gelu (přibližně 90 min).

Poté, co proběhla elektroforéza, byla v zobrazovacím systému ChemiDoc provedena aktivace a navázání barviva na proteiny v gelu pomocí UV záření po dobu 5 min. Obarvené separované proteiny byly vizualizovány s dobou expozice 2 s. Gel byl přenesen do blotovacího souvrství napuštěného transferovým pufrém připraveného podle návodu výrobce zředěním zásobního roztoku dvojitě destilovanou vodou s přidáním absolutního ethanolu (20 %). Vše se umístilo mezi elektrody transferového systému a proběhl přenos proteinů z gelu na membránu (dle protokolu výrobce pro přenos proteinů s vysokou molekulovou hmotností). V systému Trans-Blot Turbo Transfer System bylo nastaveno maximální vložené napětí 25 V a byl zachován konstantní elektrický proud po dobu 10 min. Membrána byla usušena a před následnou imunodetekcí skladována při teplotě 8 °C v lednici.

#### 4.2.5.4 Imunodetekce topoisomerasy II

Každá blotovací membrána byla vložena do 50 ml zkumavky s víčkem tak, aby strana s navázaným proteinem směřovala dovnitř. Do každé zkumavky bylo přidáno 10 ml blokovacího roztoku. Zkumavky byly umístěny na rotátor, kde byla membrána po dobu 1 hod blokována. Poté byl blokovací roztok slit do odpadní nádoby. Membrána byla

10 min promývána v TBS-T. Poté byly membrány inkubovány za stálé rotace při pokojové teplotě 1 hod s 5 ml primární protilátky EPR 5377 (anti-TOP2A a anti-TOP2B – rozeznává obě izoformy TOP II) ředěné v poměru 1 : 2000. K jejímu naředění byl použit roztok 5 % BSA v TBS-T. Po inkubaci s primární protilátkou byly membrány šestkrát po dobu 5 min promyty v TBS-T o objemu 7 až 10 ml. Následně se do každé zkumavky přidalo 5 ml sekundární protilátky Ab6112 (ředění 1 : 10000) a proběhla 1 hod dlouhá inkubace opět při pokojové teplotě. Po inkubaci sekundární protilátkou byly membrány opět šestkrát promyty pomocí TBS-T po dobu 5 min. Nakonec byly membrány jedenkrát opláchnuty TBS, protože přítomnost detergentu by mohla negativně ovlivnit detekci. V tomto roztoku byly membrány přeneseny k zobrazovacímu systému ChemiDoc MP.

Dle návodu výrobce byl nejprve připraven chemiluminiscenční substrát Clarity Western ECL Substrate a byl uchováván ve tmě. Pomocí softwaru Image Lab 4.1 pro ChemiDoc MP proběhlo nejprve kolorimetrické snímání s dobou expozice 0,001 s. Takto byl získán reálný obraz membrány s markerem molekulových hmotností. Poté byl snímán fluorescenční signál celkového proteinu na membráně pomocí UV excitační lampy (nastavení pro StainFree technologii) s expozičním časem 2 s. Chemiluminiscenční substrát byl rovnoměrně nanesen na membránu v celkovém objemu 500  $\mu$ l. Membrána byla následně překryta průsvitnou plastovou folií, která jednak zajistila rovnoměrné rozložení substrátu na membráně, a také zamezila vysychání membrány v průběhu aktivace signálu (5 min) a samotného snímání. Poté bylo provedeno chemiluminiscenční snímání s vhodnou dobou expozice.

Vyhodnocení množství jednotlivých izoform TOP II bylo provedeno normalizací na množství celkového proteinu pomocí softwaru Image Lab 4.1 pro ChemiDoc MP.

## **4.2.6 Stanovení viability**

### *4.2.6.1 Stanovení antiproliferačních účinků cytotoxicitním experimentem*

V prvním kroku byla v pipetovací vaničce pro multikanálové pipety připravena nasazovací suspenze. Pro nasazení buněk na destičky za účelem cytotoxicitního experimentu byla použita dvojnásobná koncentrace než pro pasážování (tj. 0,2 milionu buněk na mililitr). To proto, že suspenze byla následně v dalším kroku zředěna

kultivačním médiem, ve kterém byly rozpuštěny sledované látky. Do jamek sloupců 3 až 10 v řadách B až G na 96-jamkové destičce bylo automatickou multikanálovou pipetou přeneseno 50 µl homogenní buněčné suspenze (homogenizováno průběžně kýváním korýtky). Po nanesení suspenze do jamek byla uzavřená destička označena názvem linie, datem, pořadím pasáže s jménem a ovlivňující látkou.

V dalším kroku byly vždy do šesti sterilních mikrozkušavek o objemu 5 ml připraveny roztoky látek v kultivačním mediu. V případě ovlivňování buněk DEX (zásobní roztok v DMSO) byly finální koncentrace 1, 3, 10, 30 a 100 µl. V případě ovlivňování buněk DAU (zásobní roztok ve vodě MQ) byly finální koncentrace 1, 3, 10, 30, 100 a 300 µl. Kultivační medium s ovlivňujícími látkami se po promíchání na laboratorní třepačce pipetovalo v objemu 50 µl do sloupců 4 až 9. Do sloupců 2 a 11 se napipetovalo 100 µl kultivačního media. Tyto sloupce sloužily jako negativní kontrola neboli blank, byla zde tedy nulová viabilita. Do sloupců 3 a 10 se k buňkám připipetovalo po 50 µl kultivačního media. Tyto sloupce sloužily jako kontrola. Byla zde tedy maximální viabilita buněk neovlivněná žádnými přidanými látkami. Schématické znázornění rozvržení pokusu je zobrazeno níže (Obr. 10). Takto připravená destička byla vložena do inkubátoru a započala tak 72 hod ovlivňující fáze.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B		Blank	Kontrola	0 µl (1 µl DMSO + 500 µl média)	1 µl (1 µl 1 mM DEX + 500 µl média)	3 µl (1 µl 3 mM DEX + 500 µl média)	10 µl (1 µl 10 mM DEX + 500 µl média)	30 µl (1 µl 30 mM DEX + 500 µl média)	100 µl (1 µl 100 mM DEX + 500 µl média)	Kontrola	Blank		
C													
D		Blank	Kontrola	1 nM (1 µl 1 µM DAU + 500 µl média)	3 nM (3 µl 1 µM DAU + 500 µl média)	10 nM (1 µl 10 µM DAU + 500 µl média)	30 nM (3 µl 10 µM DAU + 500 µl média)	100 nM (10 µl 10 µM DAU + 500 µl média)	300 nM (30 µl 10 µM DAU + 500 µl média)	Kontrola	Blank		
E													
F													
G													
H													

Obr. 10 Schématické znázornění rozvržení pokusu pro cytotoxicitní experiment (vlevo – ovlivňování dexrazoxanem; vpravo – ovlivňování daunorubicinem)

#### 4.2.6.2 Hodnocení buněčné viability metodou MTT

Cytotoxicitní experiment byl vyhodnocen pomocí metody MTT. Ta spočívá v metabolizaci žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu na

modrofialový krystalický formazan. Těto přeměny jsou schopné pouze živé buňky s aktivně respirujícími mitochondriemi.

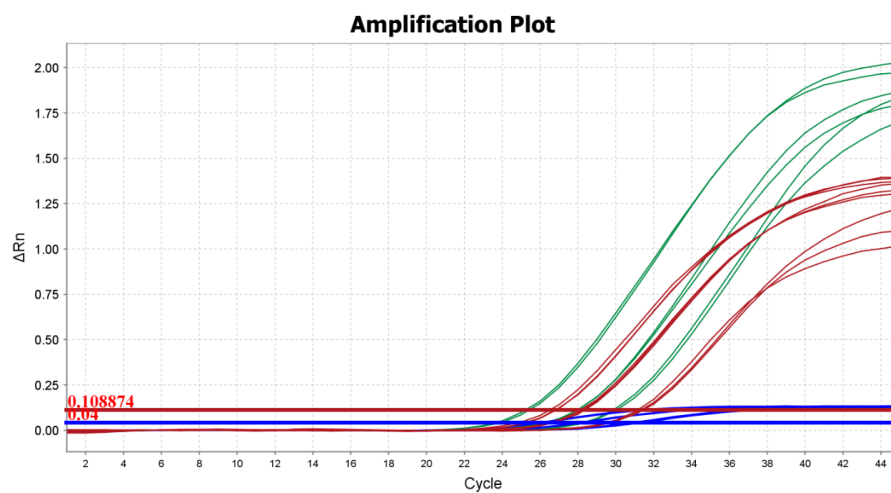
Nejprve bylo v polypropylenové zkumavce s víčkem o objemu 50 ml připraveno ekvivalentní množství roztoku MTT v PBS o koncentraci 3 mg/ml. Takto připravený roztok předeřtátý v lázni na 37 °C byl napipetován do jamek B2 až G11 po 25 µl. Následovala inkubace v inkubátoru dlouhá 2 hod. Poté bylo do všech jamek přidáno 100 µl lyzačního roztoku MTT. Přes noc byly destičky umístěny na deskovou třepačku při rychlosti 600 rpm. Ráno byla přístrojem TECAN změřena absorbance při dvou vlnových délkách – absorpční maximum modrého formazanu (570 nm) a referenční měření žlutého MTT (690 nm).

## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení exprese mRNA TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$ metodou RT-qPCR

Ze vzorků buněčných lyzátů připravených pro buněčné linie 1 HL-60 (předpokládaná exprese TOP II $\beta^{+/+}$ ), 49 HL-60 (předpokládaná exprese TOP II $\beta^{-/+}$ ) a 71 HL-60 (předpokládaná exprese TOP II $\beta^{-/-}$ ) a nanesených s reakčními směsmi na destičku v biologickém kvadruplikátu a v technickém triplikátu (TOP II $\beta$ , B2M) nebo duplikátu (TOP II $\alpha$ ) byly metodou RT-qPCR stanoveny hodnoty  $C_t$  a následně v programu MS Excel vypočítány hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  pro TOP II $\alpha$  (Tab. 8) respektive TOP II $\beta$  (Tab. 9) vůči referenčnímu genu B2M a inverzních hodnot  $\Delta\Delta C_t$  vůči HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ . Hodnoty byly poté graficky a statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 9 (Obr. 12, Obr. 13). Jako fluorescenční barviva byla použita FAM (TOP II $\alpha$ , TOP II $\beta$ ) a HEX (B2M).

Výsledky stanovení exprese mRNA TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  s využitím komerčně dostupných primerů cílících na tyto enzymy a vyhodnocení metodou RT-qPCR neprokázalo, že by deplece TOP II $\beta$  ovlivňovala expresi TOP II $\alpha$ . Vzhledem k rozsahu sekvence TOP II $\beta$  a neznámému cílení komerčně navržených primerů (pravděpodobně cílí do jiného místa, než je místo mutace použitých buněčných linií), nebylo u jednotlivých linií možné s jistotou potvrdit expresi TOP II $\beta$ , a proto jsme v následující část této práce navrhli primery cílící přímo do místa mutace v použité buněčné linii a také provedli stanovení exprese proteinu.



Obr. 11 Ukázka amplifikačního grafu z RT-qPCR reakce (zeleně exprese TOP II $\beta$ – zleva HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ; analogicky červeně exprese TOP II $\alpha$ ; modře exprese referenčního genu B2M)

Tab. 8 Vypočtené hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  vztažené na B2M a inverzní hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  vztažené na linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  pro TOP II $\alpha$  u buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  a průměr inverzních hodnot

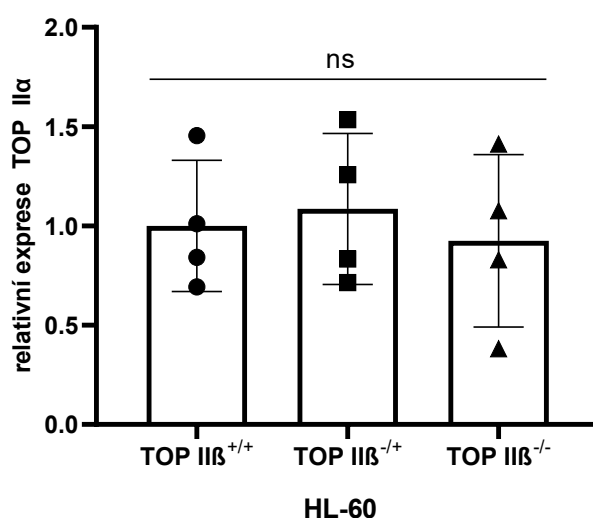
Biologický replikát	HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$		HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$		HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$	
	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$
1	0,594	1,00	0,912	1,535	0,839	1,412
2	0,489	1,00	0,615	1,258	0,406	0,830
3	0,714	1,00	0,595	0,834	0,769	1,077
4	1,027	1,00	0,734	0,715	0,391	0,381
<b>Průměr</b>	–	1,00	–	1,085	–	0,925

Ukázka rovnice výpočtu exprese TOP II $\alpha$  metodou  $\Delta\Delta C_t$  pro linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  (analogicky vypočteno i pro linie HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ):

$$\Delta\Delta C_t = 2^{-(C_t \text{ TOP II}\alpha - C_t \text{ B2M}) \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{+/+}}$$

Ukázka výpočtu exprese TOP II $\alpha$  buněčné linie HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  vztažená na buněčnou linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  (analogicky i pro linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$ ):

$$\text{Relativní snížení exprese} = \frac{2^{-\Delta\Delta C_t \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{-/-}}}{2^{-\Delta\Delta C_t \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{+/+}}}$$



Obr. 12 Graf znázorňující relativní snížení exprese TOP II $\alpha$  buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$

Tab. 9 Vypočtené hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  vztažené na B2M a inverzní hodnoty  $\Delta\Delta C_t$  vztažené na linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  pro TOP II $\beta$  u buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  a průměr inverzních hodnot

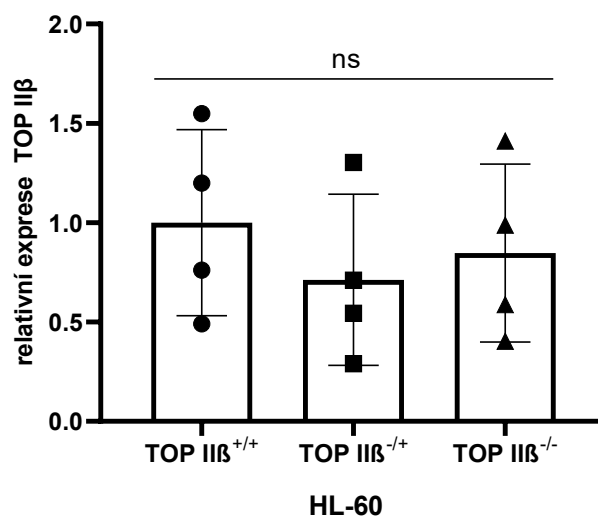
Biologický replikát	HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$		HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$		HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$	
	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$	$\Delta\Delta C_t$	Inverzní $\Delta\Delta C_t$
1	1,537	1,00	1,093	0,711	2,168	1,411
2	0,990	1,00	1,290	1,304	0,978	0,988
3	2,420	1,00	0,701	0,290	1,422	0,588
4	3,126	1,00	1,702	0,544	1,262	0,404
<b>Průměr</b>	–	1,00	–	0,712	–	0,848

Ukázka rovnice výpočtu exprese TOP II $\beta$  metodou  $\Delta\Delta C_t$  pro linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  (analogicky vypočteno i pro linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ):

$$\Delta\Delta C_t = 2^{-(C_t \text{ TOP II}\beta - C_t \text{ B2M}) \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{+/+}}$$

Ukázka výpočtu exprese TOP II $\beta$  buněčné linie HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  vztažená buněčnou linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  (analogicky i pro linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ):

$$\text{Relativní snížení exprese} = \frac{2^{-\Delta\Delta C_t \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{-/-}}}{2^{-\Delta\Delta C_t \text{ vzorku HL-60 TOP II}\beta^{+/+}}}$$



Obr. 13 Graf znázorňující relativní snížení exprese TOP II $\beta$  buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$



## 5.2 Návrh primerů pro detekci mutačního místa v enzymu TOP II $\beta$ v použitých buněčných liniích

Na základě rozdílů v sekvenci DNA klonu HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a klonu HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  byla identifikována deleční mutace v délce 13 bp. Pro návrh primeru byl v programu MS Excel vytvořen seznam potenciálních primerů před mutací, v mutaci a za mutací v délkách 18–24 nukleotidů (Tab. 10). Následně byly do tabulky zapsány hodnoty zastoupení GC [%] a Tm Salt Adjusted [°C] zjištěné v programu OligoCalc. Optimální procentuální zastoupení GC pro analýzu odpovídá 50–60 % a optimální Tm Salt Adjusted odpovídá 55–60 °C. Ideálnímu zastoupení těchto parametrů však odpovídalo velmi málo sekvencí, proto byly hledány i hodnoty o 5 °C a 5 % přesahující toto rozmezí v obou směrech. Tyto hodnoty byly podmíněným formátováním v programu MS Excel vyznačeny. Vybrané primery byly objednány u společnosti Generi Biotech. Konkrétně se jednalo o sekvence uvedené v Tab. 11.

Tab. 10 Ukázka navrhnutých sekvencí, znázornění jejich lokalizace, délky, zastoupení GC [%] a T<sub>m</sub> Salt Adjusted [°C]

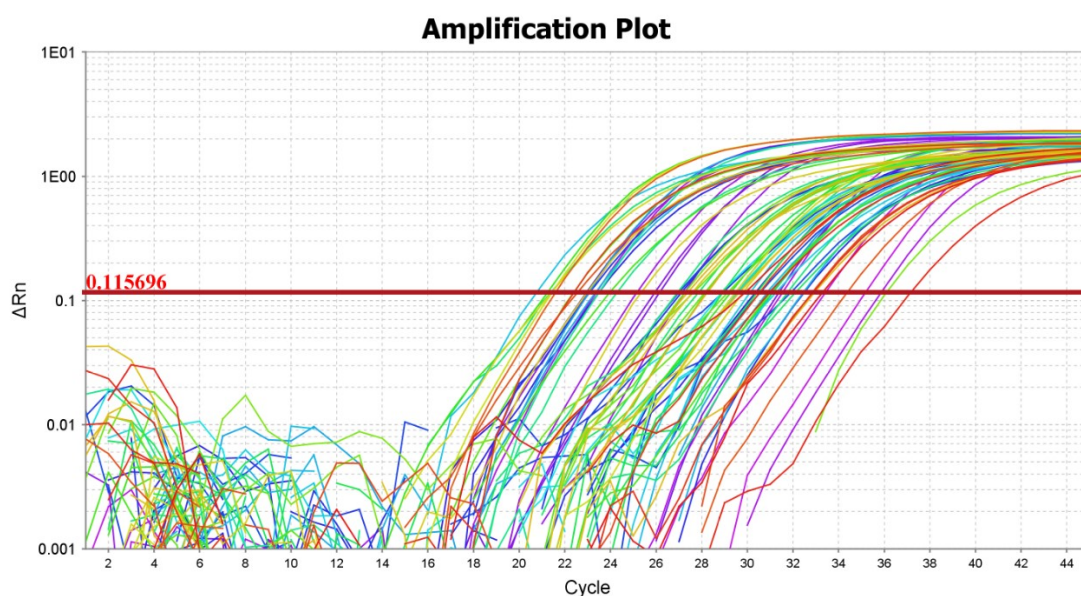
Umístění vzhledem k mutaci	Délka	Sekvence (zelená = před mutací; červená = v mutaci; modrá = za mutací)	Zastoupení GC [%]	T <sub>m</sub> [°C]
Před mutací	18	TAGGGGAGAGGCGGGCCA	72	62,9
		TCAGGGCCTGTGAGCTGG	67	60,8
		CTGTGAGCTGGAGGCACT	61	58,4
	20	CGGGAGCGGCGGCTGCGGCC	90	74,8
		AGGGCCTGTGAGCTGGAGGC	70	66,6
		CCTGTGAGCTGGAGGCACTC	65	64,6
	21	GGGGAGAGGCGGGCCAGCGGC	86	75,1
		GGAGCGGCGGCTGCGGCCTCA	81	73,1
		GCCTCAGGGCCTGTGAGCTGG	71	69
V mutaci	18	CACTCGCCATGGCCAAGT	61	58,4
		ACTCGCCATGGCCAAGTC	61	58,4
		GCCATGGCCAAGTCGGGT	67	60,8
	22	TGGAGGCACTCGCCATGGCCAA	64	67,9
		ACTCGCCATGGCCAAGTCGGGT	64	67,9
		GGCCAAGTCGGGTGGCTGCGGC	77	73,2
	23	CTGGAGGCACTCGCCATGGCCAA	65	69,9
		ACTCGCCATGGCCAAGTCGGGTG	65	69,9
		GGCCAAGTCGGGTGGCTGCGGCG	78	75,2
Za mutací	18	GCAACGGGGCACTGACCT	67	60,8
		CACTGACCTGGGTGGTAA	56	56,3
		ACCTGGGTGGTAAGTGGC	61	58,4
	19	GGCACTGACCTGGGTGGTA	63	61,6
		CACTGACCTGGGTGGTAAG	58	59,5
		CTGGGTGGTAAGTGGCTGG	63	61,6
	23	CGTGGGCGGCGGCAACGGGGCAC	83	77,3
		ACGGGGCACTGACCTGGGTGGTA	65	69,9
		ACTGACCTGGGTGGTAAGTGGCT	57	66,6

Tab. 11 Vybrané sekvence primerů použitých v další analýze (zelená = před mutací, červená = v mutaci, modrá = za mutací) včetně lokalizace, zastoupení GC [%] a  $T_m$  Salt Adjusted [ $^{\circ}C$ ]

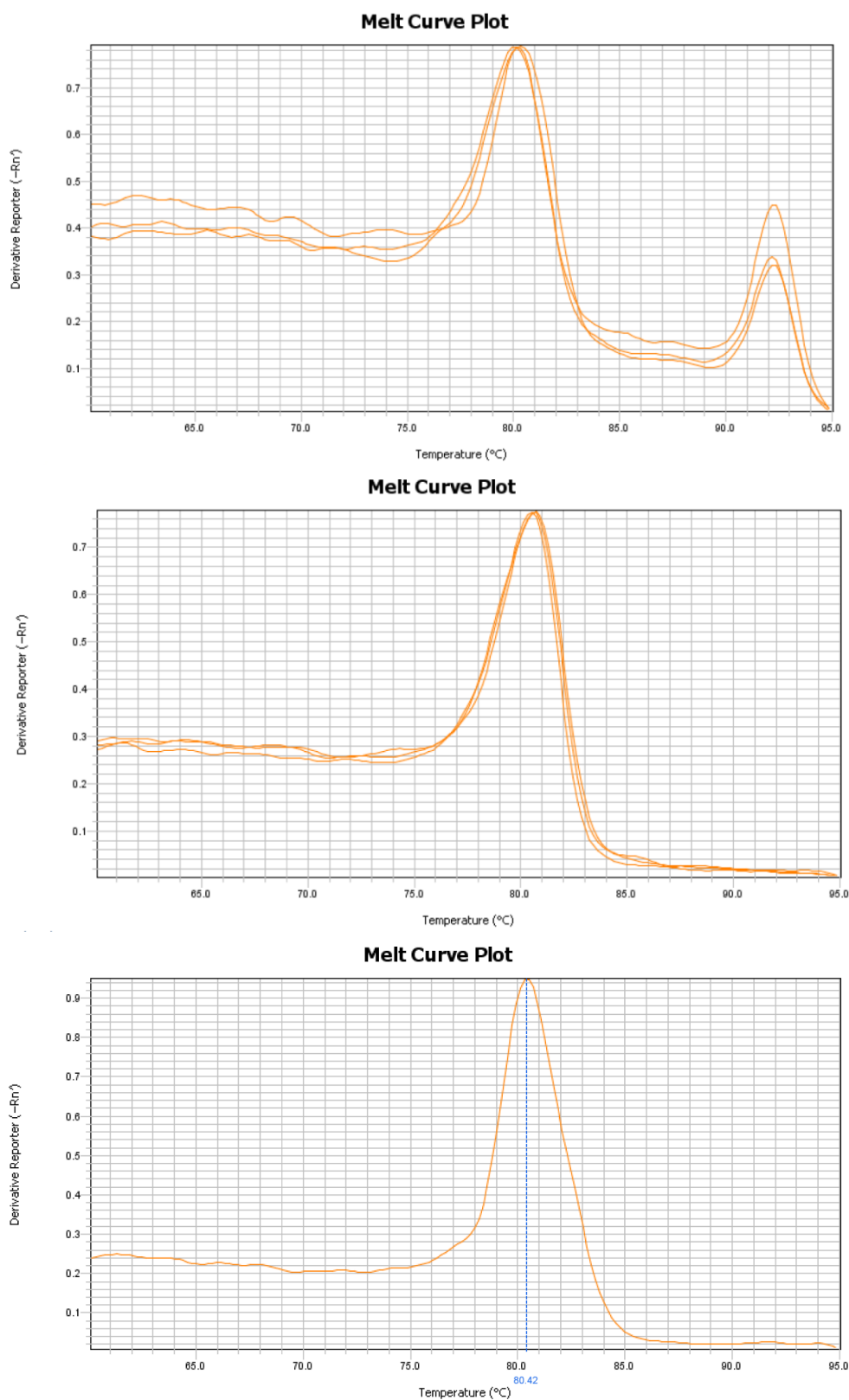
	Pracovní označení	Sekvence	Zastoupení GC [%]	$T_m$ [ $^{\circ}C$ ]
<b>Před mutací</b>	68	AGTGCCTCCAGCTCACAG	61	58,4
	69	GAGTGCCTCCAGCTCACA	61	58,4
<b>V mutaci</b>	16	CACTCGCCATGGCCAAGT	61	58,4
	17	ACTCGCCATGGCCAAGTC	61	58,4
<b>Za mutací</b>	45	TACCACCCAGGTCAGTGC	61	58,4
	51	GCCACTTACCACCCAGGT	61	58,4

### 5.3 Detekce přítomnosti TOP II $\beta$ s využitím navržených primerů

Ze vzorků buněčných lyzátů připravených pro buněčné linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  nanesených s reakčními směsmi na destičku v technických triplikátech byl stanovením získán amplifikační graf (Obr. 14). Na něm se však nepotvrdila očekávaná nepřítomnost signálu u mutantního klonu HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ . Výsledek je patrný z křivek tání (Obr. 15), které umožňují zobrazení i ostatních produktů. Ideálně by na těchto křivkách byl vizualizován jeden pík (při zahřívání dojde k denuraci dvouvláknové DNA za vzniku jednovláknových produktů). Na křivce tání byl vedle jednoho velkého píku u linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  na rozdíl od linie HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  přítomen i druhý menší pík. Předpokládáme, že tento pík je TOP II $\beta$ . Přítomnost většího píku (zejména vzhledem k jeho přítomnosti i ve vzorku bez templátu) považujeme za pozadí (chyba primerů či lyzátu). Dle těchto křivek tedy dvě dvojice primerů (obsažené v reakční směsi MM 4 a MM 7) dokázaly rozlišit mezi mutovanou a nemutovanou linií. Pro ověření byla provedena horizontální elektroforetická separace vzorků na agarózovém gelu.



Obr. 14 Ukázka amplifikačního grafu z PCR reakce provedené za použití navržených primerů

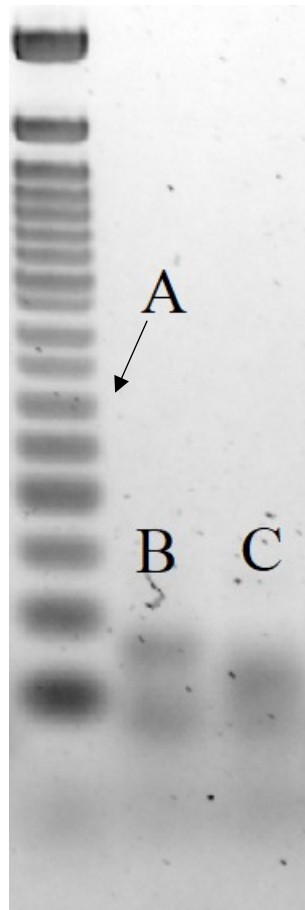


Obr. 15 Křivky tání pro kombinaci primerů reakční směsi MM 4. Nahoře buněčná linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , uprostřed HL-60 TOP II $\beta^{-/}$ , dole reakční směs bez templátu. Velký pik = pozadí; menší pik u HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  = pravděpodobná přítomnost TOP II $\beta$

#### 5.4 Zobrazení na agarózovém gelu

Vzorky z předchozího stanovení s kombinacemi primerů odpovídající reakčním směsím MM 4 a MM 7 buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  byly separovány na 3 % agarózovém gelu po dobu 2,5 hod při konstantním napětí 56 V. Gel byl obarven směsí 4  $\mu$ l SYBER safe DNA Gel Stain v 50 ml vody. Pomocí softwaru Image Lab 4.1 technologií SABR-safe byla vizualizována separace fragmentů nukleových kyselin.

Na agarózovém gelu jsme předpokládali zobrazení jednoho produktu u obou linií (pozadí) a navíc ještě jednoho dalšího produktu pro HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  (přítomnost TOP II $\beta$ ). Tato hypotéza se potvrdila (Obr. 16) a přináší shodnou informaci jako křivky tání předchozího stanovení (Obr. 15).



Obr. 16 Separace nukleových kyselin na agarózovém gelu (A = žebříček; B = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; C = HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ )

## 5.5 Stanovení množství proteinu TOP II $\alpha$ a TOP II $\beta$

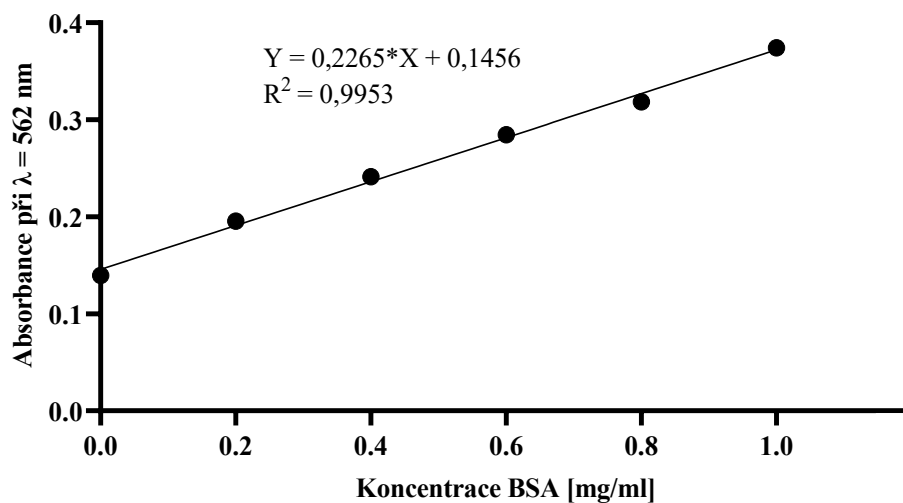
### 5.5.1 Stanovení celkového proteinu v buněčných lyzátech

Ředěním standardního roztoku BSA o koncentraci 10 mg/ml bylo připraveno 5 kalibračních roztoků koncentrací 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 a 0,2 mg/ml. Vzorek koncentrace 0 mg/ml obsahoval pouze SDS-Tris. Po inkubaci s reakčním činidlem byla změřena absorbance v triplikátech nanesených vzorků při vlnové délce 562 nm (Tab. 12). Z průměrných hodnot byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 17).

Za stejných výše popsaných podmínek byla proměřena i absorbance vzorků HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP II $\beta^{-/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  nanesených na destičku v triplikátech v různých ředěních (1 $\times$ , 2 $\times$ , 3 $\times$ ). Po dosažení průměrných hodnot absorbance do rovnice kalibrační křivky a násobení ředěním (2 $\times$ ) byly vypočteny koncentrace celkového proteinu ve vzorcích (Tab. 13). Tyto koncentrace byly použity pro výpočet nanášek buněčného lyzátu pro separaci bílkovin na 7,5 % polyakrylamidovém gelu.

Tab. 12 Naměřené hodnoty absorbance a průměr absorbancí kalibračních roztoků BCA při vlnové délce 562 nm

Koncentrace kalibrátoru [mg/ml]	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	Průměr A
1,0	0,387	0,362	0,374	0,374
0,8	0,327	0,315	0,313	0,318
0,6	0,287	0,280	0,286	0,284
0,4	0,249	0,241	0,234	0,241
0,2	0,201	0,185	0,201	0,196
0	0,135	0,142	0,141	0,139



Obr. 17 Kalibrační křivka s lineární rovnicí a koeficientem determinace pro stanovení koncentrace celkového proteinu ve vzorcích

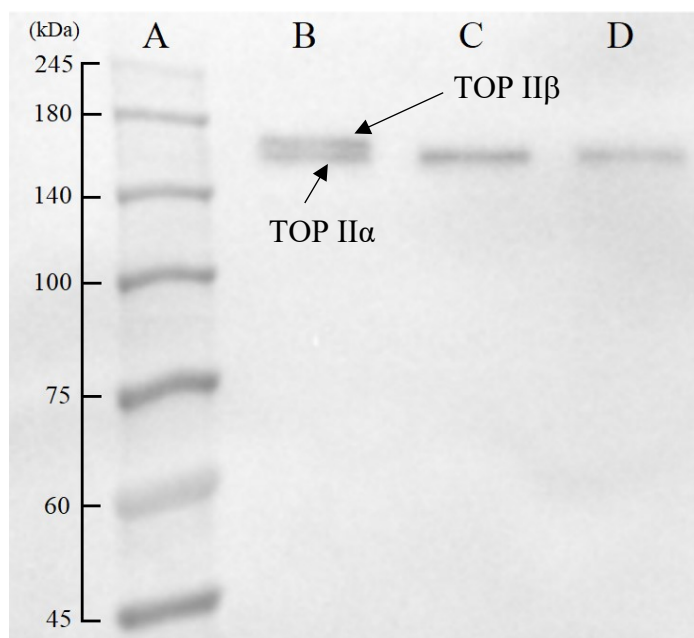
Tab. 13 Koncentrace celkového proteinu v jednotlivých vzorcích

	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4
	<b>Koncentrace [mg/ml]</b>			
<b>HL-60 TOP IIβ<sup>+/+</sup></b>	1,101	1,367	2,135	1,521
<b>HL-60 TOP IIβ<sup>-/+</sup></b>	0,902	1,392	1,670	1,699
<b>HL-60 TOP IIβ<sup>-/-</sup></b>	0,694	0,699	1,915	0,967

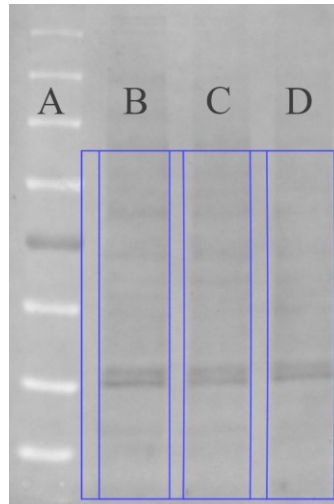


### 5.5.2 Imunodetekce proteinu TOP II

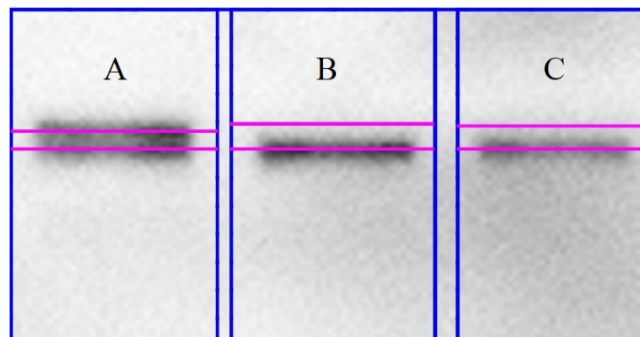
Imunodetekce separovaných proteinů buněčných lyzátů byla provedena rekombinantní primární protilátkou Abcam EPR 5377 (ab109524), která rozeznává obě izoformy TOP II. Pořízené snímky chemiluminiscenčního signálu a fluorescenčního signálu byly vyhodnoceny softwarem Image Lab 4.1 (Obr. 18, Obr. 19, Obr. 20). Nejprve byla vyhodnocena optická hustota v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti proteinu TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  (Obr. 18). Signál obou izoform je dobře patrný ve vzorku HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ . V obou depletovaných klonech signál TOP II $\beta$  zcela chybí. Tento kvantifikovaný signál byl pak vztažen na vyhodnocenou optickou hustotu ve stejném náhodném vzorku proteinů obarvených pomocí chemické modifikace aminokyseliny tryptofanu. Tento náhodný vzorek byl vybrán tak, aby byl co největší, oblast molekulových hmotností byla stejná pro všechny vzorky a aby se vyhnul možným artefaktům, které na membráně bývají přítomny. Množství celkového proteinu v jednotlivých vzorcích bylo stanovenou prostřednictvím Image Lab 4.1 technologií Stain-Free.



Obr. 18 Ukázka překryvu chemiluminiscenčního snímku nitrocelulózové membrány a kolorimetrického snímku pro stanovení  $n = 1$  (A = žebříček včetně molekulových hmotností v kDa; B = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; C = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; D = HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ) znázorňující u buněčné linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  přítomnost TOP II $\alpha$  i TOP II $\beta$



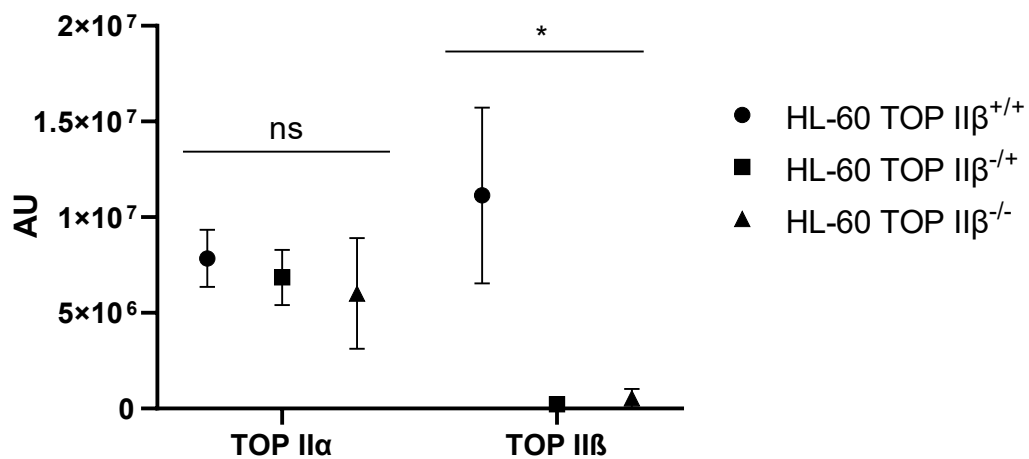
Obr. 19 Ukázka Stain-Free snímku pro stanovení  $n = 2$  s naznačenými oblastmi použitými pro normalizaci (A = marker molekulových hmotností; B = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; C = HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$ ; D = HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ )



Obr. 20 Ukázka chemiluminiscenčního snímku nitrocelulózkové membrány ( $n = 3$ ) znázorňující výběr izoform topoisomerasy II (A = HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ ; B = HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$ ; C = HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$ ) – horní linie pro TOP II $\beta$  a dolní linie pro TOP II $\alpha$

Tab. 14 Hodnoty normalizovaných optických hodnot chemiluminiscenčního signálu TOP II izoform na množství celkového proteinu

	HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$		HL-60 TOP II $\beta^{+/-}$		HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$	
	TOP II $\alpha$	TOP II $\beta$	TOP II $\alpha$	TOP II $\beta$	TOP II $\alpha$	TOP II $\beta$
<b>n = 1</b>	11092812	10025971	87982	6104939	159222	4370496
<b>n = 2</b>	17392476	7391415	426154	8154744	640221	4223703
<b>n = 3</b>	9549035	7296963	127956	5185898	189316	5148632
<b>n = 4</b>	6500597	6654899	285238	7967104	1177301	10314484

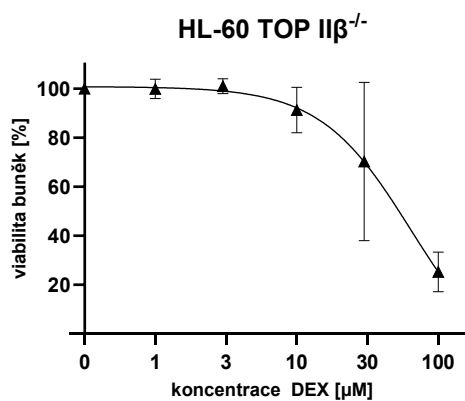
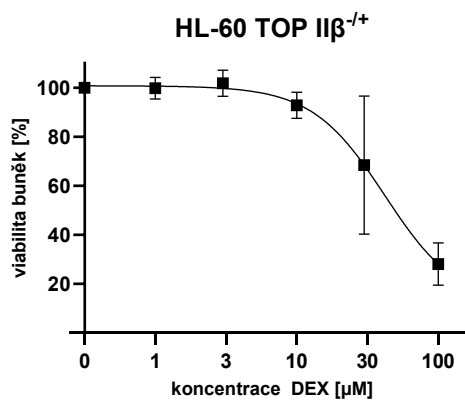
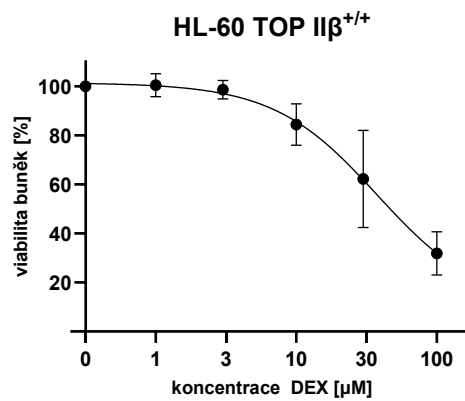


Obr. 21 Graf znázorňující množství proteinu TOP IIα a TOP IIβ u buněčných linií HL-60 TOP IIβ<sup>+/+</sup>, HL-60 TOP IIβ<sup>-/+</sup> a HL-60 TOP IIβ<sup>-/-</sup>. Statisticky významné snížení proteinu u linií HL-60 TOP IIβ<sup>-/+</sup> a HL-60 TOP IIβ<sup>-/-</sup> oproti buněčné linii HL-60 TOP IIβ<sup>+/+</sup> je znázorněno \*

## 5.6 Antiproliferační účinek dexrazoxanu na buněčnou linii HL-60

Kontrolní buněčná linie HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a její TOP II $\beta$  depletované verze HL-60 TOP II $\beta^{-/+}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  byly inkubovány s dexrazoxanem v koncentracích 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$  pro každou koncentraci vždy v biologickém kvadruplikátu a technickém hexaplikátu pro všechny tři linie vždy současně, aby se minimalizoval vliv okolních faktorů jako tlak či teplota v průběhu dne. Cytotoxicitní experiment byl vyhodnocen metodou MTT. Absorbance byla změřena spektrofotometrem TECAN při 570 nm a při 690 nm. Získané hodnoty absorbance byly vyhodnoceny v MS Excel. Hodnoty byly následně normalizovány, graficky a statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 9 (Obr. 22, Tab. 15).

Na základě dat uvedených na Obr. 21 a v Tab. 15 jsou hodnoty IC<sub>50</sub> u klonu HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$  a klonu HL-60 TOP II $\beta^{-/+}$  velice srovnatelné. Jediná hodnota, která se liší (u HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  je IC<sub>50</sub> vyšší), není statisticky významná. Její potenciální statistická významnost by mohla naznačovat možné ovlivnění antiproliferačního účinku (například jeho snížení).



Obr. 22 Vliv kardioprotektiva dexrazoxanu na viabilitu buněčných linií HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{+/+}$ , HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/+}$  a HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/-}$

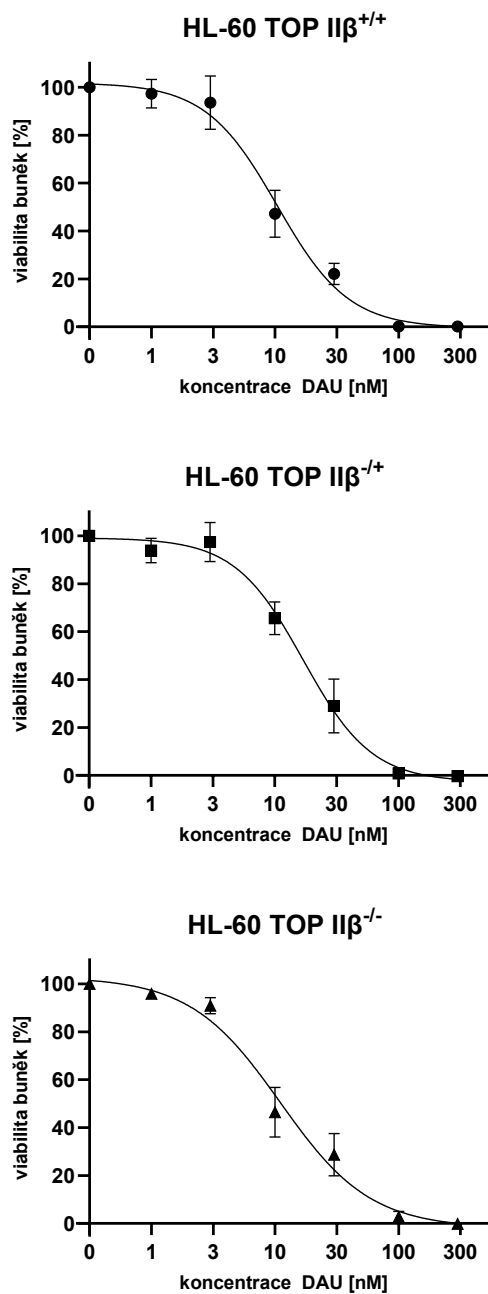
Tab. 15 Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (tj. koncentrace dexrazoxanu způsobující pokles aktivity enzymu na 50 %) se směrodatnými odchylkami. Spočítáno interpolací naměřených dat po ovlivnění dexrazoxanem

	HL-60 TOP $\text{II}\beta^{+/+}$	HL-60 TOP $\text{II}\beta^{-/+}$	HL-60 TOP $\text{II}\beta^{-/-}$
<b><math>\text{IC}_{50} \pm \text{sd}</math></b>	41,21 $\pm$ 17,52	43,13 $\pm$ 22,02	71,14 $\pm$ 29,52

## 5.7 Antiproliferační účinek daunorubicinu na buněčnou linii HL-60

Kontrolní buněčná linie HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{+/+}$  a její TOP  $\text{II}\beta$  depletované verze HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/+}$  a HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/-}$  byly inkubovány s daunorubicinem v koncentracích 1, 3, 10, 30, 100 a 300 nM pro každou koncentraci v biologickém kvadruplikátu a technickém hexaplikátu pro všechny tři linie vždy současně, aby se minimalizoval vliv okolních faktorů jako tlak či teplota v průběhu dne. Cytotoxiciční experiment byl vyhodnocen metodou MTT. Absorbance byla změřena spektrofotometrem TECAN při 570 nm a při 690 nm. Získané hodnoty absorbance byly vyhodnoceny v MS Excel. Hodnoty byly následně normalizovány, graficky a statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 9 (Obr. 23, Tab. 16).

Grafickým a statistickým zpracování dat na Obr. 23 a v Tab. 16 je znázorněno, že přítomnost či nepřítomnost TOP  $\text{II}\beta$  nemá vliv na citlivost buněk po ovlivnění daunorubicinem. Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  u klonu HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{+/+}$  a klonu HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/-}$  jsou velice srovnatelné. Jediná hodnota, která se liší (u HL-60 TOP  $\text{II}\beta^{-/+}$  je  $\text{IC}_{50}$  vyšší), není statisticky významná. Její potenciální statistická významnost by mohla naznačovat možné ovlivnění účinku (například jeho snížení).



Obr. 23 Vliv daunorubicinu na viabilitu buněčných linií HL-60 TOP II $\beta$ <sup>+/+</sup>, HL-60 TOP II $\beta$ <sup>+/-</sup> a HL-60 TOP II $\beta$ <sup>-/-</sup>

Tab. 16 Hodnoty IC<sub>50</sub> (tj. koncentrace daunorubicinu způsobující pokles aktivity enzymu na 50 %) se směrodatnými odchylkami. Spočítáno interpolací naměřených dat po ovlivnění daunorubicinem

	HL-60 TOP II $\beta$ <sup>+/+</sup>	HL-60 TOP II $\beta$ <sup>+/-</sup>	HL-60 TOP II $\beta$ <sup>-/-</sup>
IC <sub>50</sub> ± sd	10,12 ± 2,14	17,20 ± 3,54	10,51 ± 3,83

## 6 Diskuze

Snad nejnápadnějším rysem DNA je propletení dvou komplementárních vláken dvoušroubovice (Watson a Crick, 1953). V buňkách je topologie DNA ovlivňována enzymy známými jako topoisomerasy (TOP). Na základě svého katalytického mechanismu je můžeme rozdělit do dvou podskupin – topoisomerasy typu I (TOP I) a topoisomerasy typu II (TOP II). TOP II se účastní různých biologických procesů tvorbou dvouřetězcových zlomů DNA. Ve skupině TOP II pak najdeme několik enzymů, které jsou často specifické svým výskytem, strukturou a funkcí (jako např. bakteriální enzymy gyrasa a topoisomerasa IV, topoisomerasa VI vyskytující se u archebakterií a v některých vyšších rostlinách). Eukaryota jsou v tomto směru specifická tím, že z této skupiny obsahují pouze tzv. DNA TOP II (Champoux, 2001). U obratlovců nalézáme dvě izoformy TOP II – TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$ . Právě TOP II je cílem řady klinicky používaných a také některých experimentálních protinádorových látek, inhibitorů TOP II. Mechanisticky pak dále rozlišujeme tzv. TOP II jedy a tzv. katalytické inhibitory TOP II (Pommier, 2013).

Tato práce se zaměřila na sledování vlivu účinku protinádorové léčby u lidských nádorových buněk HL-60, kterým byl prostřednictvím CRISPR-Cas9 technologie permanentně modifikován úsek genomu kódující TOP II $\beta$ . Konkrétně šlo o cílenou delecii směřovanou na začátek prvního exonu této sekvence. Transformované buněčné linie byly vytvořeny na pracovišti prof. C. A. Austin volně podle protokolu Dr. Khazeema (Khazeem *et al.*, 2020). Konkrétním cílem této práce bylo nejprve u třech přidělených linií ověřit expresi TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$ . Následně byly sledovány možné změny v citlivosti HL-60 kmenů TOP II $\beta^{+/+}$ , TOP II $\beta^{-/+}$  a TOP II $\beta^{-/-}$  ke klinicky používaným inhibitorům TOP II – daunorubicinu a dexrazoxanu. Tyto látky a také použítá buněčná linie byly vybrány na základě dlouhodobého výzkumu naší skupiny. Dexrazoxan, zástupce tzv. katalytických inhibitorů TOP II je jediné registrované kardioprotektivum proti antracyklinové kardiotoxicitě. Tento tzv. pozdní nežádoucí účinek výrazně omezuje protinádorovou terapii antracyklinovými antibiotiky (jako je daunorubicin nebo doxorubicin) (Lipshultz *et al.*, 2013). Ze zástupců antracyklinů jsme použili daunorubicin jako modelového zástupce proto, že je vzhledem k použité buněčné linii klinicky relevantnější – používá se v terapii hematologických malignit a linie lidské promyelocytární leukemie HL-60 je tedy vhodným modelem.



První část práce je zaměřena na analýzu exprese mRNA TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  metodou RT-qPCR. Pro přípravu vzorku jsme použili lyzační pufr, jehož složení, při výběru vhodné reverzní transkriptasy a DNA polymerasy umožňuje přímé stanovení bez nutnosti izolace mRNA konvenčními technikami, jako je např. fenol-chloroformová extrakce nebo použití chaotropních činidel s následnou precipitací nukleových kyselin ethanolom, použití kolonek pro extrakci na pevné fázi nebo izolace pomocí potažených magnetických částic (Ali *et al.*, 2017). Použití této zjednodušené metody přímého stanovení z lyzátu je výhodné zejména vzhledem k rychlosti a efektivitě (také díky setu Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR – tento set umožňuje provedení reverzní transkripce těsně před PCR reakcí v jedné zkumavce). Z předchozích výsledků, které ukazovaly deleci v DNA jsme předpokládali, že tato relativně velká delece 13 nukleotidů by mohla vyvolat následnou degradaci přepsané mRNA na principu tzv. nonsense-mediated RNA decay (Kurosaki a Maquat, 2016). To se ovšem nepotvrdilo a množství mRNA TOP II $\beta$  u jednotlivých buněčných linií bylo stejné.

Citlivost nádorových buněk vůči TOP II inhibitorům je z velké části závislá na expresi TOP II $\alpha$ , kvůli její stěžejní roli v mitóze. V literatuře existují některé náznaky, že inhibice TOP I nebo TOP II $\beta$  vede ke zvýšení exprese TOP II $\alpha$ . Zaměřili jsme se tedy i na tento cíl. Nicméně pomocí RT-qPCR jsme nezaznamenali zvýšené množství mRNA TOP II $\alpha$  u jednotlivých klonů (Obr. 12) a myslíme tedy, že nárůst pozorovaný v inhibičních studiích nemusí být zprostředkován deplecí TOP II $\beta$  v našem případě.

Sekvence kódující gen TOP2B je tvořena poměrně velkým množstvím nukleotidů (konkrétně 5360 nukleotidů (*TOP2B DNA topoisomerase II beta [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [online]*) a primery obsažené v tomto komerčně navrženém kitu cílí do místa za deletovanou sekvencí, takže v přítomnosti mRNA, která je zkrácená před místem navázání primerů a není degradována, jak je uvedeno výše, nemusíme poznat rozdíl mezi klony. Proto by bylo vhodnější pro stanovení použít primery cílicí do mutačního místa a eventuálně výsledné produkty rozdělit a vizualizovat pomocí polyakrylamidové elektroforézy (Slatko a Albright, 2001). Proto jsme se rozhodli pro návrh vlastních primerů cílicích přímo do místa mutace.

Primery jsou pro PCR reakci nezbytnou komponentou. Aby byly navrhované primery pro stanovení vhodné, musely splňovat určité charakteristiky. Primery musí být komplementární s templátovou oblastí DNA. Zásadní je pak shoda na 3' konci, aby

mohlo probíhat prodloužení (výhodou je přítomnost G/C na konci sekvence). Délka obou primerů by měla být podobná (17–28 nukleotidů). Kratší primery produkují nepřesné a nespecifické produkty a delší primery pak vedou k pomalejší rychlosti hybridizace. Dále by měly být dodrženy parametry  $T_m = 55\text{--}60\text{ }^\circ\text{C}$ , rozdíl  $T_m < 1\text{--}3\text{ }^\circ\text{C}$ , podobné zastoupení bází (GC  $\cong 50\text{--}60\%$ ), nepřítomnost delších úseků stejných bází ( $> 4$ ), nepřítomnost sekundárních struktur (vnitřní vlásenky) či nepřítomnost tvorby dimerů (málo GC nukleotidů na 3' konci). V neposlední řadě je důležitá samozřejmě i specifita (Ye *et al.*, 2012). V této práci byly primery navrženy „manuálně“. Program OligoCalc následně umožnil u navržených primerů kontrolu vlastností (bez nutnosti zadání původní sekvence cílového genu) zahrnující parametry jako například délka, molekulová hmotnost, procentuální zastoupení GC, teplota tání či dimerizace, přítomnost vláskových struktur a teplota hybridizace s templátem (annealing). Při návrhu primerů je ale možné využít i sofistikované programy pro samotné vyhledání sekvence, která může sloužit jako primer. Pro návrh primerů je možné použít například nástroj Primer3, který ze zadané sekvence navrhne dvojici primerů (Rozen a Skaletsky, 2000). Ještě více uživatelsky přívětivé je použít kombinace algoritmu Primer3 s databází sekvencí organizace NCBI (Primer-BLAST), kde stačí zadat název známé sekvence. Dále je možné využít například software mFOLD, který umožňuje predikci struktury DNA/RNA, abychom se vyhnuli místům s vláskou (Zuker, 2003).

Na základě výsledků získaných stanovením s navrženými primery bylo u dvou dvojic navržených a testovaných primerů (Tab. 3: MM 4 a MM 7) možné rozlišit mezi mutovanou a nemutovanou linií. Výsledky však ukázaly přítomnost dalšího produktu. Ten mohl být způsoben přítomností (a možnou amplifikací) genomové DNA, protože pro detekci bylo použito interkalační barvivo (Sybr-Green), nebo také existuje možnost, že byla amplifikovaná jiná mRNA. Protože měl nespecifický signál menší teplotu tání, což může znamenat kratší produkt, nemůžeme pravděpodobně zcela vyloučit ani přítomnost dimerů primerů. Pro odstranění signálu tohoto produktu by bylo možné navrhnout primer se sondou, čímž by se docílilo vyšší specifity detekce, než má metoda Sybr-Green. Hledání pravé příčiny tohoto nespecifického signálu bylo již mimo rozsah této diplomové práce.

Následně byla deplece izoformy TOP II $\beta$  potvrzena na úrovni proteinu v buněčném lyzátu metodou imunodetekce, a to i přes použití primární protilátky detekující obě izoformy TOP II, které mají však dostatečně odlišnou velikost a dají se

tedy rozdělit při použití vhodné koncentrace polyakrylamidového gelu. Tedy i přes přítomnost pravděpodobně zkrácené formy mRNA nevzniká v buňkách protein, nebo je rychle degradován. Identifikace detailního mechanismu tohoto procesu byla opět už mimo možnosti této diplomové práce. Také jsme v souladu s výsledky exprese mRNA nezaznamenali změny v množství TOP II $\alpha$  po depleci TOP II $\beta$  (Obr. 21).

Biologické funkce TOP II jsou důležité pro zajištění genomové integrity, schopnost interferovat s TOP II a zprostředkovávat poškození DNA je tedy efektivní strategií protinádorové terapie. TOP II je cílem vysoce účinných protinádorových léčiv, které navozují poškození DNA zprostředkovanou enzymem (Pommier *et al.*, 1985; Liu, 1989). Protinádorová léčiva jako doxorubicin, mitoxantron, amsakrin, etoposid, cílí na obě izoformy enzymu TOP II, působí tedy nespecificky (Lyu *et al.*, 2007). Za molekulární podstatu protinádorového účinku doxorubicinu je však považována spíše interakce s TOP II $\alpha$  (Martin *et al.*, 2009). Ve studii Lyu *et al.* (2007) byla u myších embryonálních fibroblastů bez TOP II $\beta$  zaznamenána ochrana před vznikem kardiotoxicity navozené doxorubicinem. Za předpokladu, že TOP II $\beta$  není vyžadovaná pro protinádorové působení antracyklinů, by léčiva specificky cílicí na TOP II $\alpha$  a nikoli na TOP II $\beta$  mohla přinést klinicky vyšší hodnotu vzhledem k jejich pravděpodobně omezené kardiotoxicitě (Zhang *et al.*, 2012). Látky specifické k TOP II $\alpha$  by navíc mohly vykazovat nižší riziko vzniku sekundárních malignit, na jejichž vzniku se TOP II $\beta$  pravděpodobně také podílí. Například u myši s kožní deplecí TOP II $\beta$  se po expozici etoposidem vyskytuje melanom méně často (Azarova *et al.*, 2007). Několik látek specifických pouze k TOP II $\alpha$  již bylo navrženo a vykazují vynikající protinádorovou účinnost *in vitro* (Toyoda *et al.*, 2008).

Někteří autoři spekulují i o možnosti cílit TOP II $\beta$  u některých malignit. Relativně novým selektivním inhibitorem TOP II je XK-469. Preferenčně cílí na TOP II $\beta$ , zatímco TOP II $\alpha$  je ovlivněna velmi málo. Účinnost vykazuje zejména proti solidním tumorům, konkrétně například buňkám kolorektálního karcinomu. Důvodem je pravděpodobně skutečnost, že tyto buňky obsahují populaci pomalu se množících buněk s poměrně vysokým zastoupením TOP II $\beta$ . Skutečnost, že TOP II $\beta$  je méně hojná než TOP II $\alpha$ , neznamená, že jde o méně důležitý cíl. Pozoruhodná specifická solidních nádorů k XK469 naznačuje, že TOP II $\beta$  může být velmi důležitým cílem pro protinádorová léčiva (Gao *et al.*, 1999).

V této práci jsme se proto zaměřili i na stanovení citlivosti HL-60 klonů s různou expresí TOP II $\beta$  k daunorubicinu a dexrazoxanu. Využili jsme modelu již dříve používaného v naší výzkumné skupině, kdy je buněčná kultura inkubována kontinuálně se studovanými látkami po dobu 72 hod. Podobně jako v předchozích experimentech na neovlivněné parentní linii HL-60 vyvolal daunorubicin dávkově závislé snížení proliferace buněk. Hodnoty IC<sub>50</sub> (přibližně 10–17 nM) jsou prakticky stejné jako hodnoty IC<sub>50</sub> (přibližně 15–23 nM) v předchozích publikacích (Bures *et al.*, 2017; Jirkovská *et al.*, 2021). Statisticky signifikantní změna citlivosti mezi jednotlivými klony nalezena nebyla (Tab. 16). K obdobnému závěru, tedy že přítomnost či nepřítomnost TOP II $\beta$  nijak neovlivní citlivost buněk, jsme došli i u dexrazoxanu (Tab. 15).

Stejně jako v naší práci byl vztah exprese TOP II izoforem studován v práci Satherley *et al.* (2000) avšak se zaměřením na vztah exprese TOP II izoforem a chemosenzitivity u choroidálního melanomu. U explantů odebraných několika (29) pacientům s tímto nádorem bylo zjištěno, že některé z těchto nádorů vykazují poměrně překvapivě nepřítomnost nebo depleci TOP II $\beta$ . U několika explantů byla pozorovaná také deplece TOP II $\alpha$ . Ale exprese ani jedné z izoforem nijak neovlivnila rezistenci k terapii antracykliny. I další zjištění z klinické praxe ohledně role TOP II $\beta$  při vzniku rezistence k protinádorové terapii jsou prozatím nejednoznačné. Objevily se studie jak potvrzující, že TOP II $\beta$  by mohla sloužit jako negativní prognostický marker některých tumorů (*TOP2B protein expression summary - The Human Protein Atlas* [online]), tak i doklady toho, že vyšší relativní zastoupení TOP II $\beta$  vzhledem k TOP II $\alpha$  značí lepší prognózu u pacientů (Song *et al.*, 2012).

Doufáme, že výsledky této práce by mohly pomoci k pochopení mechanismu účinku antracyklinových antibiotik a dexrazoxanu používaného jako prevence antracykliny navozené kardiotoxicity a objasnění úlohy enzymu TOP II $\beta$  v nádorových buňkách. Tyto buněčné linie jsou dále využívány při studiu TOP II specifických inhibitorů cílících na jednotlivé izoformy.

## 7 Závěry

- Stanovené hodnoty relativní exprese mRNA TOP II $\alpha$  a relativní exprese TOP II $\beta$  metodou RT-qPCR s využitím komerčně navržených primerů nepotvrdily závislost hladiny enzymu TOP II $\alpha$  na přítomnosti TOP II $\beta$  v buňkách. Hodnoty však neodpovídaly původní hypotéze (očekávaná exprese TOP II $\beta$  u HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  blížící se nule). Důvodem však bylo pravděpodobně cílení komerčně navržených primerů do jiného místa, než je místo mutace použité buněčné linie. Proto jsme navrhli vlastní primery cílící přímo do místa mutace.
- Dvě dvojice navržených primerů cílících do místa mutace dokázaly odlišit depleci enzymu TOP II $\beta$ .
- Množství proteinu TOP II $\alpha$  a TOP II $\beta$  bylo stanoveno metodou imunodetekce a kvantitativně vyhodnoceno na množství celkového proteinu pomocí softwaru Image Lab 4.1. Touto metodou bylo zaznamenáno snížení exprese TOP II $\beta$  u buněčných linií HL-60 TOP II $\beta^{-/-}$  a HL-60 TOP II $\beta^{-/+}$  oproti kontrolní buněčné linii HL-60 TOP II $\beta^{+/+}$ . Rozdílné hladiny TOP II $\beta$  neměly signifikantní vliv na hladiny TOP II $\alpha$  u žádné z použitých buněčných linií.
- Stanovením antiproliferačního účinku dexrazoxanu o koncentracích 1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M nebyly zaznamenány statisticky významné změny viability v porovnání buněk depletovaných a nedepletovaných v enzymu TOP II $\beta$ .
- Stanovením antiproliferačního účinku daunorubicinu o koncentracích 1, 3, 10, 30, 100 a 300 nM taktéž nebyly zaznamenány statisticky významné změny viability v porovnání buněk depletovaných a nedepletovaných v enzymu TOP II $\beta$ .

## 8 Seznam zkratek

A	Absorbance
APS	Amonium persulfát
ATP	Adenosintrifostát
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BCA	Kyselina bicinchoninová
BSA	Bovinní sérový albumin
DAU	Daunorubicin
DEX	Dexrazoxan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní protein kinasa
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ENU	N-ethyl-N-nitrosomočovina
FBS	Fetální bovinní sérum
g	Tíhové zrychlení
GFP	Zelený fluorescentní protein
gRNA	Naváděcí RNA
kDa	Molekulová hmotnost
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina
NFW	Nuclease free water
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-0,1 % Tween-20

PCR	Polymerázová řetězová reakce
PPAR	Receptory aktivované proliferátory peroxisomů
RCF	Relativní centrifugační zrychlení
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Otáčky za minutu – anglická zkratka (revolutions per minute)
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SDS	Dodecysíran sodný
SMC	Structural maintenance of chromosomes
TAE	Tris base/acetic acid/EDTA
TBS	Tris-buffered saline
Temed	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris/Glycin/SDS
Tm	Teplota tání (melting temperature)
TOP	Topoisomerasa
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultrafialové záření
V	Volt, jednotka elektrického napětí
WRN helikasa	Werner syndrom ATP-dependentní helikasa

## 9 Literatura

- Ali, N. *et al.* (2017) „Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics", *BioMed Research International*, 2017, s. 1–13. doi: 10.1155/2017/9306564.
- Andoh, T. (1998) „Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs", *Biochimie*, 80(3), s. 235–246. doi: 10.1016/S0300-9084(98)80006-0.
- Andoh, T. a Ishida, R. (1998) „Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II", *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1400(1–3), s. 155–171. doi: 10.1016/S0167-4781(98)00133-X.
- Austin, C. A. *et al.* (2018) „TOP2B: The First Thirty Years", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), s. 1–21. doi: 10.3390/ijms19092765.
- Azarova, A. M. *et al.* (2007) „Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), s. 11014–11019. doi: 10.1073/pnas.0704002104.
- Beck, W. T. *et al.* (1993) „Drug resistance associated with altered DNA topoisomerase II", *Advances in Enzyme Regulation*, 33, s. 113–116. doi: 10.1016/0065-2571(93)90012-3.
- Bollimpelli, V. S., Dholaniya, P. S. a Kondapi, A. K. (2017) „Topoisomerase II $\beta$  and its role in different biological contexts", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 633, s. 78–84. doi: 10.1016/j.abb.2017.06.021.
- Bollimpelli, V. S. a Kondapi, A. K. (2015) „Enriched rat primary ventral mesencephalic neurons as an in-vitro culture model", *NeuroReport*, 26(12), s. 728–734. doi: 10.1097/WNR.0000000000000420.
- Boucek, R. J. *et al.* (1999) „Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(8), s. 1435–1446. doi: 10.1006/jmcc.1999.0972.
- Breitman, T. R., Collins, S. J. a Keene, B. R. (1980) „Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line,



HL-60", *Experimental Cell Research*, 126(2), s. 494–498. doi: 10.1016/0014-4827(80)90296-7.

Bures, J. *et al.* (2017) „Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase II $\beta$  but not its iron chelating metabolite", *Toxicology*, 392, s. 1–10. doi: 10.1016/j.tox.2017.09.012.

Capranico, G. *et al.* (1992) „Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development", *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1132(1), s. 43–48. doi: 10.1016/0167-4781(92)90050-A.

Collins, S. J. (1987) „The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression", *Blood*, 70(5), s. 1233–1244. doi: 10.1182/blood.v70.5.1233.1233.

Collins, S. J., Gallo, R. C. a Gallagher, R. E. (1977) „Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture", *Nature*, 270(5635), s. 347–349. doi: 10.1038/270347a0.

Cummings, J. a Smyth, J. F. (1993) „DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs", *Annals of Oncology*, 4(7), s. 533–543. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a058584.

Daniloski, Z. *et al.* (2019) „Resolution of human ribosomal DNA occurs in anaphase, dependent on tankyrase 1, condensin II, and topoisomerase II $\alpha$ ", *Genes and Development*, 33(5–6), s. 276–281. doi: 10.1101/gad.321836.118.

Deming, P. B. *et al.* (2001) „The human decatenation checkpoint", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), s. 12044–12049. doi: 10.1073/pnas.221430898.

Deweese, J. E. a Osheroff, N. (2009) „The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing", *Nucleic Acids Research*, 37(3), s. 738–748. doi: 10.1093/nar/gkn937.

Drake, F. H. *et al.* (1987) „Purification of Topoisomerase II from Amsacrine-resistant P388 Leukemia Cells. Evidence for two forms of the enzyme", *Journal of Biological Chemistry*, 262(34), s. 16739–16747. doi: 10.1016/s0021-9258(18)49317-9.

- Dresdale, A. R., Barr, L. H. a Myers, C. E. (1982) „Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy", *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 5(6), s. 657–663. doi: 10.1097/00000421-198212000-00015.
- Emmons, M. *et al.* (2006) „Topoisomerase II beta levels are a determinant of melphalan-induced DNA crosslinks and sensitivity to cell death", *Biochemical Pharmacology*, 72(1), s. 11–18. doi: 10.1016/j.bcp.2006.03.017.
- Gallagher, R. *et al.* (1979) „Characterization of the Continuous, Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) From a Patient With Acute Promyelocytic Leukemia", *Blood*, 54(3), s. 713–733. doi: 10.1182/blood.v54.3.713.713.
- Gao, H. *et al.* (1999) „XK469, a selective topoisomerase II $\beta$  poison", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), s. 12168–12173. doi: 10.1073/pnas.96.21.12168.
- Gewirtz, D. A. (1999) „A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochemical Pharmacology*, 57(7), s. 727–741. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
- Grue, P. *et al.* (1998) „Essential Mitotic Functions of DNA Topoisomerase II $\alpha$  Are Not Adopted by Topoisomerase II $\beta$  in Human H69 cells", *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), s. 33660–33666. doi: 10.1074/jbc.273.50.33660.
- Guo, H. *et al.* (2014) „Specificity protein 1 regulates topoisomerase II $\beta$  expression in SH-SY5Y cells during neuronal differentiation", *Journal of Neuroscience Research*, 92(10), s. 1374–1383. doi: 10.1002/jnr.23403.
- Gupta, K. P. *et al.* (2012) „Topoisomerase II $\beta$  regulates base excision repair capacity of neurons", *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(4), s. 203–213. doi: 10.1016/j.mad.2012.03.010.
- Hasinoff, B. B. a Herman, E. H. (2007) „Dexrazoxane: How it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?", *Cardiovascular Toxicology*, 7(2), s. 140–144. doi: 10.1007/s12012-007-0023-3.
- Heck, M. M. S. a Earnshaw, W. C. (1986) „Topoisomerase II: A Specific Marker for Cell Proliferation", *Journal of Cell Biology*, 103(6), s. 2569–2581. doi:

10.1083/jcb.103.6.2569.

Heng, X. *et al.* (2012) „Nurr1 regulates Top II $\beta$  and functions in axon genesis of mesencephalic dopaminergic neurons", *Molecular Neurodegeneration*, 7(4), s. 1–18. doi: 10.1186/1750-1326-7-4.

Hensley, M. L. *et al.* (2009) „American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of Chemotherapy and Radiation Therapy Protectants", *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), s. 127–145. doi: 10.1200/JCO.2008.17.2627.

Herman, E. H. *et al.* (1972) „Prevention of the Cardiotoxic Effects of Adriamycin and Daunomycin in the Isolated Dog Heart", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140(1), s. 234–239. doi: 10.3181/00379727-140-36432.

Herman, E. H. *et al.* (1985) „Comparison of the Effectiveness of ( $\pm$ )-1,2-Bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-Acetylcysteine in Preventing Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles", *Cancer Research*, 45(1), s. 276–281.

Herman, E. H. *et al.* (1988) „Effect of Pretreatment with ICFR-187 on the Total Cumulative Dose of Doxorubicin Tolerated by Beagle Dogs", *Cancer Research*, 48(23), s. 6918–6925.

von Hoff, D. D. *et al.* (1979) „Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure", *Annals of Internal Medicine*, 91(5), s. 710–717. doi: 10.7326/0003-4819-91-5-710.

Champoux, J. J. (2001) „DNA Topoisomerases: Structure, Function and Mechanism", *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), s. 369–413. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369.

Instrukční manuál: *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit. New England BioLabs Inc.* [online]. [cit. 2021-05-05]. Dostupné z: <<https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale3005.pdf>>.

Instrukční manuál: *Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit. New England BioLabs Inc.* [online]. [cit. 2021-05-05]. Dostupné z: <<https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale3006.pdf>>.

Isik, S. *et al.* (2015) „DNA topoisomerase II $\beta$  as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells", *Annals of Hematology*, 94(2), s. 307–318.

doi: 10.1007/s00277-014-2209-7.

Jenkins, J. R. *et al.* (1992) „Isolation of cDNA clones encoding the  $\beta$  isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24", *Nucleic Acids Research*, 20(21), s. 5587–5592. doi: 10.1093/nar/20.21.5587.

Jirkovská, A. *et al.* (2021) „Structure–Activity Relationship Study of Dexrazoxane Analogues Reveals ICRF-193 as the Most Potent Bisdioxopiperazine against Anthracycline Toxicity to Cardiomyocytes Due to Its Strong Topoisomerase II $\beta$  Interactions", *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(7), s. 3997–4019. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c02157.

Jirkovsky, E. *et al.* (2019) „79 Effective cardioprotection against anthracycline cardiotoxicity in isolated cardiomyocytes and rabbits is based on dexrazoxane interaction with topoisomerase II beta instead of iron chelation by its metabolite ADR-925", in *Heart Failure*. BMJ, s. A67.1-A67. doi: 10.1136/heartjnl-2019-bcs.77.

Ju, B. G. *et al.* (2006) „A topoisomerase II $\beta$ -mediated dsDNA break required for regulated transcription", *Science*, 312(5781), s. 1798–1802. doi: 10.1126/science.1127196.

Kenig, S. *et al.* (2016) „Topoisomerase II $\beta$  mediates the resistance of glioblastoma stem cells to replication stress-inducing drugs", *Cancer Cell International*, 16(1), s. 58. doi: 10.1186/s12935-016-0339-9.

Khazeem, M. M. *et al.* (2020) „Transcription of carbonyl reductase 1 is regulated by DNA topoisomerase II beta", *FEBS Letters*, 594(20), s. 3395–3405. doi: 10.1002/1873-3468.13904.

King, I. F. *et al.* (2013) „Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism", *Nature*, 501(7465), s. 58–62. doi: 10.1038/nature12504.

Klieber R. (2019): Použití RNA interference pro ovlivnění hladin DNA topoisomerasy II v nádorových buňkách a její vliv na protinádorový účinek antracyklinových cytostatik. *Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové*, 81 stran

Koeffler, H. P. a Golde, D. W. (1980) „Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review", *Blood*, 56(3), s. 344–350. doi: 10.1182/blood.v56.3.344.344.

- Kondapi, A. K. *et al.* (2004) „Analysis of age dependent changes of Topoisomerase II  $\alpha$  and  $\beta$  in rat brain", *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(1), s. 19–30. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2003.10.006.
- Kurosaki, T. a Maquat, L. E. (2016) „Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance", *Journal of Cell Science*, 129(3), s. 461–467. doi: 10.1242/jcs.181008.
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E. a Skladanowski, A. (2003) „Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy", *Pharmacology & therapeutics*, 99(2), s. 167–181. doi: 10.1016/s0163-7258(03)00058-5.
- Lebrecht, D. *et al.* (2005) „Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin", *Journal of Pathology*, 207(4), s. 436–444. doi: 10.1002/path.1863.
- Lee, J. H. a Berger, J. M. (2019) „Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II", *Genes*, 10(11), s. 1–18. doi: 10.3390/genes10110859.
- Lipshultz, S. E. *et al.* (2013) „Long-term Cardiovascular Toxicity in Children, Adolescents, and Young Adults Who Receive Cancer Therapy: Pathophysiology, Course, Monitoring, Management, Prevention, and Research Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association", *Circulation*, 128(17), s. 1927–1955. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182a88099.
- Liu, L. F. (1989) „DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs", *Annual Review of Biochemistry*, 58, s. 351–375. doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.002031.
- Low, R. L., Orton, S. a Friedman, D. B. (2003) „A truncated form of DNA topoisomerase II $\beta$  associates with the mtDNA genome in mammalian mitochondria", *European Journal of Biochemistry*, 270(20), s. 4173–4186. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03814.x.
- Lyu, Y. L. *et al.* (2006) „Role of Topoisomerase II $\beta$  in the Expression of Developmentally Regulated Genes", *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), s. 7929–7941. doi: 10.1128/mcb.00617-06.
- Lyu, Y. L. *et al.* (2007) „Topoisomerase II $\beta$ -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane", *Cancer Research*, 67(18), s. 8839–8846. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1649.
- Lyu, Y. L. a Wang, J. C. (2003) „Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse

embryos lacking DNA topoisomerase II $\beta$ ", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), s. 7123–7128. doi: 10.1073/pnas.1232376100.

Madabhushi, R. *et al.* (2015) „Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes", *Cell*, 161(7), s. 1592–1605. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.032.

Mandraj, R. *et al.* (2011) „Topoisomerase II $\beta$  associates with Ku70 and PARP-1 during double strand break repair of DNA in neurons", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516(2), s. 128–137. doi: 10.1016/j.abb.2011.10.001.

Mandraj, R. K., Kannapiran, P. a Kondapi, A. K. (2008) „Distinct roles of Topoisomerase II isoforms: DNA damage accelerating  $\alpha$ , double strand break repair promoting  $\beta$ ", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 470(1), s. 27–34. doi: 10.1016/j.abb.2007.10.017.

Mao, Y. *et al.* (2001) „26 S Proteasome-mediated Degradation of Topoisomerase II Cleavable Complexes", *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), s. 40652–40658. doi: 10.1074/jbc.M104009200.

Marinello, J., Delcuratolo, M. a Capranico, G. (2018) „Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), s. 3480–3497. doi: 10.3390/ijms19113480.

Martin, E. *et al.* (2009) „Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy", *Toxicology*, 255(1–2), s. 72–79. doi: 10.1016/j.tox.2008.10.011.

Martins-Teixeira, M. B. a Carvalho, I. (2020) „Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives", *ChemMedChem*, 15(11), s. 933–948. doi: 10.1002/cmdc.202000131.

McKie, S. J., Neuman, K. C. a Maxwell, A. (2021) „DNA topoisomerases: Advances in understanding of cellular roles and multi-protein complexes via structure-function analysis", *BioEssays*, 43(4), s. 1–19. doi: 10.1002/bies.202000286.

Menna, P. *et al.* (2007) „An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity", *Cardiovascular Toxicology*, 7(2), s. 80–85. doi: 10.1007/s12012-007-0011-7.

- Nagasaka, K. *et al.* (2016) „Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase", *Nature Cell Biology*, 18(6), s. 692–699. doi: 10.1038/ncb3353.
- Nevin, L. M. *et al.* (2011) „Topoisomerase II $\beta$  is required for lamina-specific targeting of retinal ganglion cell axons and dendrites", *Development*, 138(12), s. 2457–2465. doi: 10.1242/dev.060335.
- Nielsen, C. F. *et al.* (2015) „PICH promotes sister chromatid disjunction and co-operates with topoisomerase II in mitosis", *Nature Communications*, 6, s. 8962–8977. doi: 10.1038/ncomms9962.
- Nielsen, C. F. *et al.* (2020) „Topoisomerase II $\alpha$  is essential for maintenance of mitotic chromosome structure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(22), s. 12131–12142. doi: 10.1073/pnas.2001760117.
- Nitiss, J. L. (2009a) „DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions", *Nature Reviews Cancer*, 9(5), s. 327–337. doi: 10.1038/nrc2608.
- Nitiss, J. L. (2009b) „Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy", *Nature Reviews Cancer*, 9(5), s. 338–350. doi: 10.1038/nrc2607.
- Nur-E-Kamal, A. *et al.* (2007) „Role of DNA topoisomerase II $\beta$  in neurite outgrowth", *Brain Research*, 1154(1), s. 50–60. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.029.
- Palchadhuri, R. a Hergenrother, P. J. (2007) „DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action", *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), s. 497–503. doi: 10.1016/j.copbio.2007.09.006.
- Pommier, Y. *et al.* (1985) „Effects of DNA Intercalating Agents on Topoisomerase II Induced DNA Strand Cleavage in Isolated Mammalian Cell Nuclei", *Biochemistry*, 24(23), s. 6406–6410. doi: 10.1021/bi00344a014.
- Pommier, Y. *et al.* (2010) „DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs", *Chemistry and Biology*, 17(5), s. 421–433. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
- Pommier, Y. (2013) „Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges", *ACS Chem Biol.*, 8(1), s. 82–95. doi: 10.1021/cb300648v.
- Popanda, O. a Thielmann, H. W. (1992) „The function of DNA topoisomerases in UV-

induced DNA excision repair: Studies with specific inhibitors in permeabilized human fibroblasts", *Carcinogenesis*, 13(12), s. 2321–2328. doi: 10.1093/carcin/13.12.2321.

Porter, A. C. G. a Farr, C. J. (2004) „Topoisomerase II: Untangling its contribution at the centromere", *Chromosome Research*, 12(6), s. 569–583. doi: 10.1023/B:CHRO.0000036608.91085.d1.

Rozen, S. a Skaletsky, H. (2000) „Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 132, s. 365–386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365.

Sakaguchi, A. a Kikuchi, A. (2004) „Functional compatibility between isoform  $\alpha$  and  $\beta$  of type II DNA topoisomerase", *Journal of Cell Science*, 117(7), s. 1047–1054. doi: 10.1242/jcs.00977.

Sano, K. *et al.* (2008) „Topoisomerase II $\beta$  Activates a Subset of Neuronal Genes That Are Repressed in AT-rich Genomic Environment", *PLoS ONE*, 3(12), s. e4103. doi: 10.1371/journal.pone.0004103.

Satherley, K. *et al.* (2000) „Relationship between expression of topoisomerase II isoforms and chemosensitivity in choroidal melanoma", *Journal of Pathology*, 192(2), s. 174–181. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH677>3.0.CO;2-H.

Shan, K., Lincoff, A. M. a Young, J. B. (1996) „Anthracycline-Induced Cardiotoxicity", *Annals of Internal Medicine*, 125(1), s. 47–58. doi: 10.7326/0003-4819-125-1-199607010-00008.

Slatko, B. E. a Albright, L. M. (2001) „Denaturing gel electrophoresis for sequencing", *Current protocols in molecular biology*, Chapter 7(Unit 7.6). doi: 10.1002/0471142727.mb0706s16.

Solem, L. K., Henry, T. R. a Wallace, K. B. (1994) „Disruption of Mitochondrial Calcium Homeostasis Following Chronic Doxorubicin Administration", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129(2), s. 214–222. doi: 10.1006/taap.1994.1246.

Song, J. H. *et al.* (2012) „High TOP2B/TOP2A expression ratio at diagnosis correlates with favourable outcome for standard chemotherapy in acute myeloid leukaemia", *British Journal of Cancer*, 107(1), s. 108–115. doi: 10.1038/bjc.2012.206.

Speyer, J. L. *et al.* (1988) „Protective Effect of the Bispiperazinedione ICRF-187 against



Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Women with Advanced Breast Cancer", *New England Journal of Medicine*, 319(12), s. 745–752. doi: 10.1056/nejm198809223191203.

Speyer, J. L. *et al.* (1992) „ICRF-187 Permits Longer Treatment With Doxorubicin in Women With Breast Cancer", *Journal of Clinical Oncology*, 10(1), s. 117–127.

Štěřba, M. *et al.* (2013) „Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection", *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(8), s. 899–929. doi: 10.1089/ars.2012.4795.

Tewey, K. M. *et al.* (1984) „Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II", *Science*, 226(4673), s. 466–468. doi: 10.1126/science.6093249.

Tiwari, V. K. *et al.* (2012) „Target genes of Topoisomerase II $\beta$  regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), s. E934. doi: 10.1073/pnas.1119798109.

Tokarska-Schlattner, M. *et al.* (2006) „New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(3), s. 389–405. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.06.009.

*TOP2B DNA topoisomerase II beta [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI* [online]. [cit. 2021-05-05]. Dostupné z:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=7155>>.

*TOP2B protein expression summary - The Human Protein Atlas* [online]. [cit. 2021-05-05]. Dostupné z: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000077097-TOP2B>>.

Topcu, Z. (2001) „DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs", *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26(6), s. 405–416. doi: 10.1046/j.1365-2710.2001.00368.x.

Toyoda, E. *et al.* (2008) „NK314, a Topoisomerase II Inhibitor That Specifically Targets the  $\alpha$  Isoform", *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), s. 23711–23720. doi: 10.1074/jbc.M803936200.

Tsai-Pflugfelder, M. *et al.* (1988) „Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22",

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), s. 7177–7181. doi: 10.1073/pnas.85.19.7177.
- Vávrová, A. a Šimůnek, T. (2012) „DNA topoisomerase II $\beta$ : A player in regulation of gene expression and cell differentiation", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(6), s. 834–837. doi: 10.1016/j.biocel.2012.03.005.
- Van Vleet, J. F., Ferrans, V. J. a Weirich, W. E. (1980) „Cardiac Disease Induced by Chronic Adriamycin Administration in Dogs and an Evaluation of Vitamin E and Selenium as Cardioprotectants.", *American Journal of Pathology*, 99(1), s. 13–41.
- Wallace, K. B. (2003) „Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy", *Pharmacology and Toxicology*, 93(3), s. 105–115. doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.930301.x.
- Wang, J. C. (2002) „Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), s. 430–440. doi: 10.1038/nrm831.
- Watson, J. D. a Crick, F. H. C. (1953) „Molecular structure of nucleic acids: A structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature*, 171(4356), s. 737–738. doi: 10.1038/171737a0.
- Weiss, G., Loyevsky, M. a Gordeuk, V. R. (1999) „Dexrazoxane (ICRF-187)", *General Pharmacology*, 32(1), s. 155–158. doi: 10.1016/S0306-3623(98)00100-1.
- Woessner, R. D. *et al.* (1991) „Proliferation- and Cell Cycle-dependent Differences in Expression of the 170 Kilodalton and 180 Kilodalton Forms of Topoisomerase II in NIH-3T3 Cells", *Cell Growth & Differentiation*, 2(8), s. 209–214.
- Wouters, K. A. *et al.* (2005) „Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies", *British Journal of Haematology*, 131(5), s. 561–578. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05759.x.
- Yang, X. *et al.* (2000) „DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development", *Science*, 287(5450), s. 131–134. doi: 10.1126/science.287.5450.131.
- Ye, J. *et al.* (2012) „Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.", *BMC bioinformatics*, 13(June), s. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Zárybnický, T. *et al.* (2019) „The Selection and Validation of Reference Genes for mRNA

and microRNA Expression Studies in Human Liver Slices Using RT-qPCR", *Genes*, 10(10), s. 763–779. doi: 10.3390/genes10100763.

Zhang, S. *et al.* (2012) „Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity", *Nature Medicine*, 18(11), s. 1639–1642. doi: 10.1038/nm.2919.

Zhang, Y. L. *et al.* (2013) „TOP2 $\beta$  is essential for ovarian follicles that are hypersensitive to chemotherapeutic drugs", *Molecular Endocrinology*, 27(10), s. 1678–1691. doi: 10.1210/me.2013-1108.

Zuker, M. (2003) „Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction", *Nucleic Acids Research*, 31(13), s. 3406–3415. doi: 10.1093/nar/gkg595.