

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka



Neutrální Ribonukleázy *Triticum* sp. a jejich vliv na normální a nádorové tkáně

Diplomová práce

Petra Jedková

Praha, září 2007

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Škvor, CSc.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Škvora, CSc., s pomocí zdrojů uvedených v seznamu použité literatury.

V Praze dne 5. září 2007

Škvora
.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Jiřímu Škvorovi, CSc., za vedení, podporu a cenné rady v průběhu studia. Velký dík patří také RNDr. Patriku Mottlovi, Ph.D., a Bc. Marii Bílové za obětavou pomoc při zpracování mikroskopických preparátů. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům laboratoří Ústavu biofyziky a informatiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí nu/nu myší s transplantovanými lidskými nádorovými liniemi.

Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu a pochopení, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.

OBSAH

OBSAH	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÝ ÚVOD	10
2.1. Nádorová onemocnění	10
2.1.1. Karcinom prostaty	11
2.1.2. Karcinom pankreatu	13
2.2. Protinádorová aktivita živočišných ribonukleáz	14
2.2.1. Bovinní pankreatická ribonukleáza (RNáza A)	16
2.2.2. Bovinní seminální ribonukleáza (BS-RNáza)	16
2.2.3. Onkonasa	17
2.2.4. Angiogenin	18
2.2.5. Ribonukleázové imunotoxiny	18
2.2.6. Mechanismus protinádorového účinku ribonukleáz	18
2.3. Klasifikace rostlinných ribonukleáz	19
2.3.1. Biochemická klasifikace	19
2.3.2. Rostlinné ribonukleázy v T2 rodině	20
2.3.3. S patogenezi spřízněné proteiny skupiny PR-10	23
2.3.4. Skupina V alergenů	23
2.3.5. Rostlinné nukleázy	23
2.4. Regulace a funkce rostlinných ribonukleáz	24
2.4.1. Remobilizace fosfátu	24
2.4.2. Senescence	25
2.4.3. Programovaná buněčná smrt, obrana rostlin proti patogenům	26
2.4.4. Zamezení samoopylení u rostlin	27
2.4.5. Úprava a rozpad RNA	30
3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	33
4. MATERIÁL A METODIKA	34
4.1. Materiál	34
4.2. Použité chemikálie	34
4.3. Izolace neutrálních RNáz ze senescentních pšeničných listů	35
4.3.1. Příprava buněčného extraktu	35
4.3.2. Srážení síranem amonným	36
4.4. Purifikace neutrálních RNáz	37
4.4.1. Centrifugace	37
4.4.2. Chromatografie na iontoměničích	37
4.4.3. Gelová permeační chromatografie (GPC)	37
4.4.4. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)	38
4.5. Testování aktivity neutrálních RNáz <i>in vitro</i>	39
4.5.1. Test ribonukleázové aktivity	39
4.5.2. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS a kvasničné dsRNA	40
4.6. Konjugace neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem	40
4.7. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz <i>in vivo</i>	41
5. VÝSLEDKY	43
5.1. Izolace a purifikace neutrálních RNáz	43
5.2. Konjugace neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem	48
5.3. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz <i>in vivo</i>	49

5.3.1. Krev CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	49
5.3.2. Moč CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	50
5.3.3. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	51
5.3.4. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši	52
5.3.5. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	52
5.3.6. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši	52
5.3.7. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	52
5.3.8. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	53
5.3.9. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	53
5.3.10. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši	53
5.3.11. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši	53
5.3.12. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	53
5.3.13. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši.....	54
5.3.14. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši	54
6. DISKUZE	67
7. ZÁVĚR.....	71
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS	amoniumpersulfát
Bis	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
BS-Rnáza	bovinní seminální Rnáza
Cys	cystein
cdNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	double-strand RNA, dvouřetězcová ribonukleová kyselina
E	proud fotonů se stejnou energií
ECP	eosinophil cationic protein, npt RNáza 3
EDN	eosinophil-derived neurotoxin, npt RNáza 2
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
FITC	fluorescein-5-izothiokyanát
Fluor-SPA-PEG-5000	fluorescein-5-izothiokyanát-polyethylenglykol-N-succinimidyl propionát
GPC	gelová permeační chromatografie
GSI	gametofytický SI systém
His	histidin
i.v.	intravenózní
kDa	kilodalton
LNCaP	buněčná linie lidského prostatického karcinomu
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MWCO	molecular weight cut off, cut off molekulové hmotnosti
Na ₂ EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová ve formě dvojsodné soli, dále jen EDTA
npt	non-pankreatický typ RNáz
PaTu	buněčná linie duktálního pankreatického adenokarcinomu
PBS	Phosphate Buffer with Salt, fosfátový pufr s NaCl
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
poly(A)	poly-adenin
PR proteiny	pathogenesis-related proteins, s patogenezi spřízněné proteiny
PSA	prostate specific antigen, specifický prostatický antigen
PVP	(poly)vinylypyrrolidon
RFU	relative fluorescence unit, relativní fluorescenční jednotka
RI	ribonukleázový inhibitor

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

RISBASES	ribonucleases with special biological actions, specificky biologicky aktivní ribonukleázy
RNA	ribonukleová kyselina
RNáza	RNA depolymeráza, ribonukleáza
RNáza A	bovinní pankreatická ribonukleáza
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SI	self-incompability
ssDNA	single-strand DNA, jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
SSI	sporofytický SI systém
ssRNA	single-strand RNA, jednořetězcová ribonukleová kyselina
T	transmitace
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris-báze	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	tris-hydrochlorid
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
v	volume, objem
w	weight, váha

1. ÚVOD

Ribonukleové kyseliny (RNA), jako intermediární nositelé genů pro syntézu bílkovin, jsou ve své činnosti regulovány ribonukleázovými enzymy. Tyto enzymy na jedné straně ribonukleové kyseliny syntetizují, na straně druhé molekuly RNA degradují. Ribonukleázové enzymy, které katalyzují degradaci buněčné RNA, jsou nazývány ribonukleázy, nebo-li RNázy (Matoušek, 2001). Ribonukleázy jsou enzymy mikroorganismů, rostlin a zvířat, které svými vlastnosti ovlivňují množství a funkci RNA v buňkách. Zahrnují ty, které štěpí pouze jednořetězcové molekuly RNA (ssRNA), ty, které štěpí dvouřetězcové molekuly RNA (dsRNA) ale i enzymy štěpící deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). RNázy se díky jejich rozdílné substrátové specifitě podílejí jak na degradačních reakcích, tak i na úpravách RNA molekul a při na turnover reakcích. Vzhledem k jejich široké katalytické činnosti podléhá pravděpodobně každá molekula RNA reakci, do které jsou RNázy zapojeny (Deutscher, 1993).

Řada RNáz patří do specifické skupiny enzymů, které mají kromě katalytických vlastností i řadu specifických biologických aktivit. Tyto enzymy, nazývané RISBASES (ribonucleases with special biological actions), působí ve většině případů cytotoxicky a navozují tak odumírání buněk. Cytotoxické působení je u těchto RNáz způsobeno degradací molekul RNA v buňce a následnou inhibicí proteosyntézy. Mechanismus cytotoxického působení RNáz se uplatňuje např. při obraně proti parazitům, virové infekci a nádorových onemocněních, ale i v zamezení nežádoucího samoopylení u rostlin (Matoušek, 2001).

Podrobná zkoumání RNáz, které se účastní zamezení samoopylení u rostlin, napomohla k odhalení příbuzných RNáz, zapojených do jiných rostlinných procesů. Tyto RNázy, pojmenované S-like RNázy, se účastní odpovědi rostlin na řadu vnitřních i vnějších signálů, jako je senescence, obrana proti patogenům, odpověď na nedostatek anorganického fosfátu (P_i).

Jednou z prvních studií, která se zabývala biologickými účinky RNáz, byla práce na kořeni čínského ženšenu (*Panax notoginseng*). V této práci Lam (2001) *in vitro* prokázal fungicidní aktivitu izolované RNázy a její schopnost potlačit buněčnou proliferaci. Na základě této studie vrostl zájem o porovnání biologické aktivity rostlinných a živočišných RNáz, u kterých byla protinádorová aktivita prokázána v řadě studií (např. D'Alessio, 1997). Také z důvodu podobnosti relativní molekulové hmotnosti bovinní seminální ribonukleázy (BS-RNázy) a S-like RNáz byla Škvorem *et al.* (2006) provedena studie, která porovnála aktivitu BS-RNázy a některých jiných živočišných RNáz s aktivitou pšeničné neutrální

RNázy. Poznatky o protinádorové aktivitě této WLN-RNázy se staly základem pro moji diplomovou práci.

Použití RNáz je jednou z perspektivních možností systémové protinádorové terapie. Řada přirozených i geneticky modifikovaných RNáz je v současné době v různých fázích klinického výzkumu a některé se jeví jako nadějně protinádorové preparáty. Vzhledem k méně závažným nežádoucím účinkům, oproti používaným cytostatikům, by mohlo zařazení RNáz do chematerapeutických režimů přispět ke zvýšení účinku bez nárůstu toxicity (Eckschlager, 2005).

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších problémů současné medicíny. V rozvinutých zemích jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí ve všech věkových skupinách s výjimkou kojenců a jejich incidence každoročně vzrůstá (Eckchlager, 2004). Nárůst výskytu nádorových onemocnění je pravděpodobně způsoben nejen stárnutím populace, ale i životním stylem. Kouření, alkohol, skladba a úprava potravy, sexuální chování současně se zvyšujícím se výskytem látek s kancerogenním účinkem v životním prostředí přispívají k narušení buněčného genomu a posléze ke vzniku nádorového bujení.

Obecně lze nádorová onemocnění charakterizovat jako neregulovaný růst buněk o autonomní povaze buněčné proliferace spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciaci. Nekontrolovaný růst vede ke zvětšení takto postižené tkáně, která může stlačovat okolní struktury, nebo k postupné invazi do okolních struktur a k metastazování (Klener, 2002). Vznik buňky s maligními schopnostmi je výsledkem procesu, v jehož průběhu dochází k hromadění genetických změn. Nekontrolovaný buněčný růst je obvykle vyvolán mutací v tzv. onkogenech a antionkogenech.. Tyto geny kódují ve své nemutované podobě různé signalizační proteiny, transkripční faktory nebo proteiny regulující buněčnou adhezivitu či apoptózu. Mutací v těchto genech dochází k aktivaci onkogenů či inaktivaci antionkogenů, k následné expresi onkoproteinů a maligní transformaci buňky.

Poškození DNA může být způsobeno jak chybami při replikaci (10^{-6} na 1 buněčné dělení), tak působením vnějších faktorů tzv. kancerogenů, které vyvolávají maligní transformaci buňky. Rozeznáváme tři druhy kancerogenů: chemické, fyzikální a biologické. **Chemické kancerogeny** lze na základě chemické struktury rozdělit do několika skupin. Patří k nim zejména polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosaminy, nitrosamidy, aromatické aminy a azosloučeniny, těžké kovy, anorganické látky, z přírodních látek zejména aflatoxin a mnoho dalších. Chemické kancerogeny nejsou ve většině případů ve své přirozené formě účinné. K aktivaci těchto látek dochází až v organismu, kde vznikají působením oxidáz elektrofilní sloučeniny, které se váží na DNA a dávají vzniknout tzv. adduktům. K **fyzikálním kancerogenům** patří různé druhy záření. Nejúčinnější je záření ionizující (Roentgenovy paprsky, záření gamma), kancerogenní je však i záření ultrafialové (pásmo 290 – 320 nm).

K poškození DNA dochází buď přímým účinkem záření nebo prostřednictvím vysoce reaktivních radikálů, které vznikají ionizací. Z jiných fyzikálních faktorů byly prokázány kancerogenní účinky azbestových vláken, lokálních tepelných změn a chronického dráždění tkání a sliznice. Poškození DNA jak chemickými, tak fyzikálními faktory může mít různé formy. Nejčastější jsou bodové mutace, delece, dále inverze, inserce, translokace a amplifikace genů. K **biologickým kancerogenům** patří zejména viry, v omezeném měřítku některé bakteriální a parazitární infekce. Ačkoliv byla tumorigenní schopnost onkovirů experimentálně prokázána, zdá se, že sama virová infekce k vyvolání nádoru nestačí. Nicméně se odhaduje, že podíl onkovirů na vzniku nádorů je zhruba 15 % (Klener, 2002).

Na vzniku nádoru se mohou podílet i látky, které samy o sobě nemohou nádor indukovat, ale mohou vznik nádoru umocnit. Takové látky jsou nazývány **kokarcinogeny**. Jejich mechanismus není jednotný, nejčastěji je ale udáván jejich tlumivý vliv na metylaci DNA, což způsobuje genovou nestabilitu a zvyšuje citlivost ke kancerogenům. Ke kokarcinogenům patří některé steroidní hormony, především estrogeny a androgeny, které se podílejí na vzniku tzv. hormonálně závislých nádorů (Klener, 2002).

Při léčbě nádorových onemocnění se ve většině případů nevyužívá jen jediná léčebná metoda. Větší naději na úspěch má komplexní přístup, který kombinuje základní terapeutické metody, jakými jsou operační léčba, radioterapie, chemoterapie a hormonální léčba. Pro většinu nádorových onemocnění je možné použít v současné době platné léčebné postupy, které jsou vypracovány na základě mezinárodních studií. Takové postupy, označované jako léčebné protokoly, umožňují do jisté míry léčbu individualizovat (Koutecký, 2004).

Chemoterapie, jako jediná z uvedených metod, rovněž ovlivňuje diseminovaná onemocnění a systémové malignity. Její použití jako hlavní léčebné metody je však omezeno řadou faktorů. Proto je snaha o nalezení účinnějších léčebných postupů, které by mohly chemoterapii doplnit či zcela nahradit. K takovým metodám patří imunoterapie, genová a antiangiogenní terapie, inhibice růstových faktorů, telomerázy, aplikace inhibitorů signální transdukce, regulačních proteinů buněčného cyklu, transkripčních faktorů a indukce apoptózy. Jednou z možností systémové protinádorové terapie je i použití enzymů, které štěpí kyselinu ribonukleovou, tzv. RNáz (Eckschlager, 2005).

2.1.1. Karcinom prostaty

Karcinom prostaty patří v posledním letech k nejčastějším nádorovým onemocněním mužů v řadě vyspělých zemí. Zvyšující se výskyt tohoto onemocnění v Evropě kopíruje i

situace v České republice. Dle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR vzrostla od roku 1970 incidence tohoto nádorového onemocnění z 17,7 na 86,3/100 000 mužů v roce 2004. Současně s incidencí roste i mortalita, která řadí karcinom prostaty na druhé místo za karcinom průdušnice a plic. Vrchol incidence i mortality je kolem 70. roku (Klener a Abrahámová, 2002).

Nejčastější histopatologickou variantou je adenokarcinom (90 %) vznikající ze sekrečních buněk prostatických acinů. Ostatní varianty a nádory odlišné histogeneze jsou vzácné. Karcinom prostaty vzniká až v 70 % v periferní zóně žlázy, zvláště v zadním laloku. Odtud prorůstá do semenných váčků, na spodinu močového měchýře, později může vrústat až do rekta a pánevního dna. Lymfatickými cestami vnikají buňky karcinomu do mízních uzlin a vytvářejí zde metastázy. Hematogenní metastázy směřují většinou do kostí, nejčastěji osového skeletu, žeber, proximálního femuru a do pánevního dna. Vzácností nejsou ani orgánové metastázy do plic, jater, ledvin a nadledvin (Klener a Abrahámová, 2002).

Příčina onemocnění není známa. Prokazatelný význam mají faktory genetické. Odhaduje se, že u více než 40 % mužů jsou za vznik karcinomu odpovědné zárodečné mutace. Z dalších rizikových faktorů je uváděna obezita, časně zahájená a nadměrná sexuální aktivita spojená s promiskuitou, expozice radioaktivními materiály, rtutí, kadmíem, některými pesticidy a umělými hnojivy (Klener a Abrahámová, 2002).

Karcinom prostaty je zpočátku asymptomatický. Klinické příznaky jsou proto většinou projevem pokročilého onemocnění. K nejčastějším příznakům patří obtížný start močení, slabší a přerušovaný proud moči, řezavá bolest při močení a pocit nedokonalého vyprázdnění močového měchýře (Jarolím, 2002).

Při léčbě karcinomu prostaty je nutno vzít v úvahu především rozsah onemocnění, věk a celkový stav nemocného. V léčbě je využíváno všech základních modalit. U lokalizovaných forem je hlavní léčebnou metodou chirurgická léčba, tj. odstranění žlázy včetně jejího pouzdra. Alternativou operační léčby je radioterapie. U lokálně pokročilého onemocnění a při léčbě metastatického onemocnění je využíváno hormonální terapie. V případech ztráty citlivosti na hormonální léčbu je indikována chemoterapie. V posledních letech se začíná uplatňovat v léčbě karcinomu prostaty i imunoterapie.

Stanovení prognózy je u karcinomu prostaty značně obtížné. U nemocných s lokalizovaným onemocněním je 80-90% pravděpodobnost přežití pěti let, u lokálně pokročilého onemocnění zhruba 60 %. U metastazujícího onemocnění rezistentního na hormonální léčbu je doba přežití pouze 18 měsíců (Klener a Abrahámová, 2002).

Vzhledem k nenápadnosti onemocnění je u mužů nad 50 let doporučeno pravidelné vyšetření prostaty *per rectum* a stanovení specifického prostatického antigenu (PSA) z krve v jednoročních intervalech. V případě nejasného nálezu se doporučuje následné bioptické vyšetření (Klener a Abrahámová, 2002).

Buněčná linie LNCaP

LNCaP je androgen - senzitivní buněčná linie lidského prostatického karcinomu. Tato linie byla odvozena od metastáz v levém supraklavikulárním lymfatickém uzlíku 50letého muže v roce 1977 (Horszewicz, 1983).

Buněčná linie LNCaP má zachovány jak morfologické, tak funkční vlastnosti. LNCaP buňky jsou aneuploidní (76-91 chromozomů) s kompletní sadou lidských chromozomů, včetně Y chromozomu. Orgánově specifické glykoproteiny, jako lidská prostatická kyselá fosfatáza a prostatický antigen, jsou produkovány buněčnými kulturami i nádory transplantovanými imunodeficientním nu/nu myším. Zachovány jsou rovněž maligní vlastnosti buněk. Díky těmto vlastnostem je linie vhodným modelem pro laboratorní studium lidského prostatického karcinomu *in vitro* a *in vivo* (Horszewicz, 1983).

2.1.2. Karcinom pankreatu

Podobně jako karcinom prostaty, patří karcinom pankreatu k nádorovým onemocněním, jejichž výskyt v České republice v posledních desetiletích vzrůstá. V současné době je 7. nejčastějším nádorem u mužů a 8. nejčastějším nádorem u žen s vrcholem incidence mezi 65-75 lety. Alarmující je skutečnost, že pouze 40 % nádorů je histologicky potvrzeno a až 32 % případů je neléčeno a diagnostikováno až při úmrtí (Žaloudík a Klener, 2002).

Nádory pankreatu jsou obecně rozděleny na nádory z exokrinní části a nádory z části endokrinní. Nejčastějším nádorem je duktální adenokarcinom vycházející z pankreatických vývodů.

Karcinom pankreatu bývá lokalizován ve všech částech pankreatu, nicméně častěji se vyskytuje v oblasti hlavy pankreatu. V oblasti těla a kaudy je jeho výskyt méně častý. Karcinom hlavy prorůstá často do žlučového systému a do cév v blízkosti pankreatu. V případě karcinomu těla a ocasu může dojít k prorůstání až do žaludku, duodena a tenkého střeva. Karcinom metastazuje do blízkých mízních uzlin, jater, v dalších fázích do kostí a plic.

Příčina onemocnění není známa, nicméně z potenciálních rizikových faktorů lze zmínit kouření.

Karcinom pankreatu je v časných stádiích asymptomatický. K hlavním komplikacím onemocnění patří neprůchodnost duodena a útlak choledochu s hyperbilirubinemií až klinicky zjevným ikterem. Bolesti břicha, zad, anorexie, hubnutí, poruchy trávení, slabost, únava a pocit nevolnosti provázejí již pokročilejší a převážně neoperovatelné fáze onemocnění.

Z hlediska terapie je jedinou metodou, která dává šanci na vyléčení, chirurgická léčba. Jejím předpokladem je včasná diagnóza a dobrý celkový stav pacienta. Dalšími metodami terapie je radioterapie v synchronním podání s chemoterapií. V terapii je nutné zohlednit skutečnost, že karcinom pankreatu je spojen s exokrinní a endokrinní nedostatečností a proto je vhodná substituční léčba pankreatickými enzymy.

Prognóza karcinomu pankreatu je závažná. Při léčbě chemoterapií je průměrná doba přežití kolem 5 až 8 měsíců, což je o polovinu více, než v kontrolních skupinách bez chemoterapie (Žaloudík a Klener, 2002).

Buněčná linie PaTu 8902

Buněčná linie PaTu 8902 byla odvozena od primárního duktálního pankreatického adenokarcinomu, jehož tkáň byla odebrána 44leté ženě v průběhu paliativního chirurgického zákroku v roce 1985 (Elsässer, 1993).

Buněčná linie má obecně homogenní buněčné složení. Její předností je výrazný metastatický potenciál spojený se syntézou a sekrecí proteáz (urokináza, cathepsin B a D). Proteázy samotné přispívají k tvorbě metastáz, a to jak u buněčné linie PaTu 8902, tak u buněk pankreatického adenokarcinomu obecně. Díky těmto vlastnostem je linie vhodným modelovým systémem pro studium invazivního a metastazujícího lidského pankreatického adenokarcinomu (Elsässer, 1993).

2.2. Protinádorová aktivita živočišných ribonukleáz

Prvním izolovaným enzymem s ribonukleázovou aktivitou byla bovinní pankreatická ribonukleáza izolovaná v roce 1938 Rene Duboisem a purifikovaná do krystalické formy v roce 1939 Mosesem Kunitzem. Ačkoliv druhá světová válka přerušila výzkumné práce prováděné na tomto enzymu, v roce 1945 se studium enzymu opět obnovilo díky přípravě krystalické formy tohoto enzymu americkou firmou Armour Inc. RNáza A byla prvním enzymem studovaným ze všech strukturně-funkčních hledisek a rovněž prvním chemicky

syntetizovaným enzymem. Vzhledem k experimentům prokazujícím významný podíl ribonukleových kyselin na růstu tkání, byl v padesátých a šedesátých letech tento enzym rovněž studován z hlediska protinádorové aktivity. Ačkoliv se nejprve zdály výsledky slibné, objevily se následně práce s výsledky právě opačnými (Matoušek, 2001).

Jedním z dalších enzymů s RNázovou aktivitou, studovaných z hlediska protinádorové aktivity, byl α -sarcin izolovaný z plísně *Aspergillus giganteus* v šedesátých letech. α -sarcin, nazvaný podle aktivity v inhibici krysího sarkomu 180, se ovšem v klinickém výzkumu ukázal jako málo účinný a toxický. V sedmdesátých letech se stal opět významným při analýze struktury a funkce ribozomů a ribonukleoproteinových komplexů. Bylo prokázáno, že α -sarcin inaktivuje ribozomy rozštěpením α fragmentu RNA, velké podjednotky cytoplazmatických ribozomů. V devadesátých letech se výzkum α -sarcinu otočil k jeho klinickému využití v imunotoxinové terapii pomocí jeho vazby s protilátkami proti nádorovým antigenům. Efektivita léčby byla ovšem, nehledě k vedlejším účinkům, menší než se předpokládalo (Matoušek, 2001).

V sedmdesátých letech byla izolována z tekutiny semenných váčků dimerní bovinní seminální ribonukleáza a následně na tuto izolaci navázaly experimenty s RNázou izolovanou z vajíček a embryí skokanů *Rana catesbeiana*, *Rana japonica* a *Rana pipiens*. Zároveň s izolací těchto enzymů se otevřela cesta k dalšímu výzkumu protinádorových aktivit RNáz. RNáza izolovaná z vajíček a embryí skokanů, objevená při studiu lektinů a diferenciačních faktorů vajíček, byla nazvaná na základě sekvenční homologie s bovinní pankreatickou RNázou onkonasa a nyní je, navzdory značným vedlejším účinkům, ve třetí fázi klinického ověřování.

Další RNázou spojenou s růstem nebo inhibicí nádorů je angiogenin, který je za normálních podmínek přítomný v krevní plazmě lidí a zvířat. Angiogenin je homologní k bovinní i lidské pankreatické RNáze, nepůsobí cytotoxicky pro normální ani nádorové buňky, má však angiogenní aktivitu důležitou pro růst nádorových buněk a nádorů. Rovněž RNázy produkované lidskými eosinofilními leukocyty, EDN (Eosinophil-derived neurotoxin) a ECP (Eosinophil cationic protein), prokázaly protinádorové účinky. Kvůli jejich toxicitě na cerebrální a nervové buňky byly ovšem vyřazeny z dalšího protinádorového studia. Na konci devadesátých let byly pak používány jako experimentální protinádorové látky do RNázových imunotoxinů, jako látky zvyšující aktivitu klasických cytostatik a při studiu jejich protivirových účinků. (Matoušek, 2001)

2.2.1. Bovinní pankreatická ribonukleáza (RNáza A)

Jak bylo již zmíněno, vzhledem k obecné dostupnosti v hovězím pankreatu, snadné purifikaci a malé velikosti (14kDa), byla RNáza A v průběhu padesátých až sedmdesátých let intenzivně zkoumána. RNáza A byla také prvním osekvenovaným enzymem a třetím enzymem, jehož struktura byla zcela odhalena (Matoušek, 2001).

RNáza A je sekretována ve značném množství hovězím pankreatem, pravděpodobně z důvodu rozkladu velkého množství RNA produkovaného mikroorganismy bacheru. Stejně jako onkonasa katalyzuje RNáza A štěpení vazby P-O⁵ RNA na 3' straně pyrimidinového nukleosidu, což je jeden z nejvíce účinných katalytických procesů, které byly doposud identifikovány. Funkce RNázy A je inhibována cytosolickým proteinem sekretovaným z buňky. Tento RNázový inhibitor (RI) vytváří s RNázou A nekovalentní komplex v poměru 1:1 a je inhibitorem funkce i ostatních savčích RNáz pankreatického typu, jako je angiogenin a lidská pankreatická RNáza. Ke své funkci však RI potřebuje redukované prostředí, jako je cytosol, neboť jeho oxidace vede k neschopnosti vazby k RNáze A a k jeho degradaci. Vzhledem k tomu, že veškeré ligandy RI jsou RNázy, předpokládá se, že RI slouží jako ochrana buněčné RNA před nechtěným vstupem RNáz do buňky (Leland a Raines, 2001).

Zvýšení protirakovinné aktivity u RNázy A oligomerizací bylo potvrzeno Matouškem v roce 2003, který prokázal zvýšení protinádorové aktivity RNázy A v pořadí dimer, trimer a tetramer (Matoušek *et al.*, 2003).

2.2.2. Bovinní seminální ribonukleáza (BS-RNáza)

Izolaci, určení struktury a biologických aktivit tohoto enzymu v polovině šedesátých let předcházely experimentální studie mířící jinam než k hledání RNáz v tekutinách pohlavního aparátu býků. Poprvé byla RNázová aktivita BS-RNázy prokázána Matouškem v roce 1973. Zároveň s výsledky protinádorového působení BS-RNázy, byly v sedmdesátých letech prokázány vedlejší účinky tohoto enzymu, což ukazuje na nespecifické protinádorové působení a s tím související toxický vliv na normální buňky. Následné zjištění imunosupresivity BS-RNázy rovněž zkomplikovalo protinádorové studie tohoto enzymu. Obnovení zájmu o protinádorové působení BS-RNázy nastalo v devadesátých letech. Objevily se studie, v nichž se potvrdila protinádorová aktivita BS-RNázy a zároveň bylo popsáno působení enzymu jako cytotoxické, spíše než cytostatické (Matoušek, 2001)..

Vazba a inhibiční účinek RI na BS-RNázu je odlišný od inhibičního účinku RI v případě boviní pankreatické ribonukleázy. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben

monomerním uspořádáním RNázy A, která je dobře přístupná RI a v cytosolu podléhá rychlé inhibici a dimerním uspořádáním BS-RNázy, která díky svému uspořádání pravděpodobně vazbu s RI neumožňuje. Jestliže se však BS-RNáza rozštěpí na dvě monomerní podjednotky, ztrácí odolnost vůči RI. Další možností je, že BS-RNáza je aktivní pouze v buňce s nízkou hladinou RI nebo že enzym je v dimerním stavu k RI rezistentní. Cytotoxické působení BS-RNázy je způsobeno průnikem enzymu do buňky a degradací buněčné rRNA. (Matoušek, 2001)

2.2.3. Onkonasa

Studium onkonasy v sedmdesátých letech bylo na jedné straně spojeno se studiem lektinů z hlediska aglutinace buněk se specifickými cukernými zbytky na buněčné membráně, na druhé straně se studiem faktorů kontrolujících buněčný růst normálních a nádorových buněk. Při studiu aglutininů vajíček *Rana Japonica* bylo prokázáno, že aglutiny selektivně aglutinují nádorové buňky a tato pozorování vedla k přesvědčení, že diferenciaci membránových cukrů by mohla být použita v protinádorové terapii. Potvrzení o RNázové aktivitě onkonasy - proteinu izolovaného z vajíček a ranných embryí *Rana pipiens*, do té doby nazývaného Pannon (P-30), přišlo až na začátku devadesátých let. Následovalo prokázání poměrně vysokého protinádorového účinku a konjugace tohoto enzymu s jinými cytostatickými a chemoterapeutickými látkami, které napomáhají průniku onkonasy do cytosolu a narušují Golgiho aparát. První klinické výsledky použití enzymu podávaného intravenózně pacientům se solidními nádory na začátku devadesátých let prokázaly zpomalení růstu nádorů a prodloužení přežívání pacientů. Ačkoliv byly zaznamenány vedlejší účinky projevující se proteinurií a edémem ledvin, onkonasa je nyní v třetí fázi klinického ověřování se zaměřením na nádorové onemocnění pankreatu a plic (Matoušek, 2001).

Onkonasa je z 30% identická s RNázou A a stejně jako ona štěpí vazbu P-O⁵ RNA na 3' straně pyrimidinového nukleosidu. Navzdory značné podobnosti onkonasy a RNázy A je však účinnost onkonasy mnohem nižší. Na rozdíl od ostatních monomerních RNáz, je onkonasa rezistentní vůči RI. Její inhibiční konstanta K_i je mezi onkonasou a RI 10⁷ krát vyšší než mezi RNázou A a RI. Touto vlastností je RNáza podobná dimerní BS-RNáze. Vzhledem k cytostatickému působení onkonasy v G1 fázi buněčného cyklu, agens, které zvyšují rychlost buněčné proliferace rovněž zesilují i cytotoxicitu onkonasy. Z toho důvodu podléhají působení onkonasy proliferující buňky snadněji. Cytotoxické působení onkonasy je spojeno s degradací buněčné tRNA (Leland a Raines, 2001).

2.2.4. Angiogenin

Na počátku sedmdesátých let bylo prokázáno, že nádorové buňky uvolňují difuzibilní mediátor podporující tvorbu cévního zásobování nádoru. Ovšem až v polovině let devadesátých byl tento mediátor, nazvaný angiogenin, izolován z lidské krevní plazmy, ve které je, jak prokázaly následné studie, za normálních podmínek zastoupen v poměrně vysoké koncentraci. Současně byla prokázána účast angiogeninu a látek s angiogeninovými účinky v embryogenezi, při hojení ran a v patologických situacích. Angiogenin a látky s angiogeninovými účinky jsou funkčně důležité v navození neovaskularizace v řadě savčích tkání a orgánů a proto inhibice angiogeninu může být v budoucnu efektivním přístupem v boji proti nádorovému bujení (Matoušek, 2001).

RNázový angiogenin je jednořetězcový protein o molekulové hmotnosti 14 kDa, tedy podobné k RNáze A. Podobně jako RNáza A a BS-RNáza štepí 5S rRNA výhradně v pyrimidinových sekvencích. Tak, jako RNáza A, podléhá i angiogenin v cytosolu vazbě na RI, i když si zachovává v monomerní struktuře imunopresivní aktivitu (Matoušek, 2001).

2.2.5. Ribonukleázové imunotoxiny

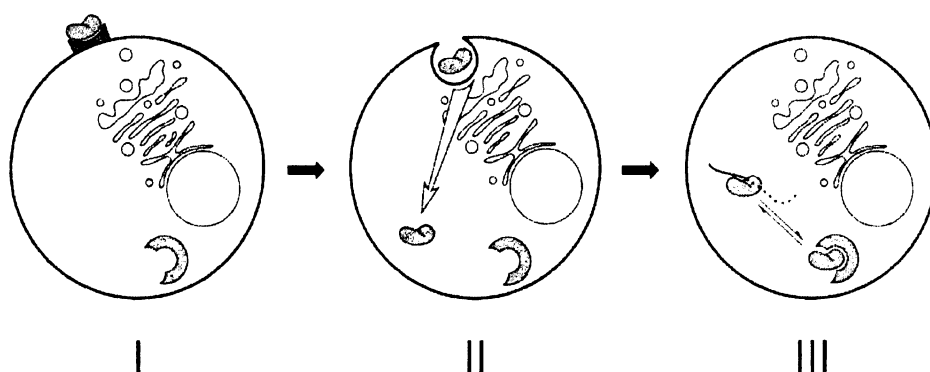
V posledním desetiletí se objevily studie, které se zabývají vazbou toxických proteinů s monoklonálními protilátkami a jejich imunoreaktivními fragmenty, růstovými faktory a cytokininy, jako látkami směřujícími toxický protein do nádorových buněk. Imunotoxiny ovšem v důsledku silných vedlejších účinků zklamaly v klinických podmínkách. Určité zlepšení nastalo při využití rekombinantních DNA technologií protilátkových fragmentů namířených proti nádorovým antigenům, ovšem ačkoliv se zlepšila imunitní odpověď organismu, v rekombinantní molekule byl stále přítomen cizorodý toxin. Proto byla snaha o náhradu toxických látek látkami živočišného původu, jako jsou živočišné RNázy. Na konci devadesátých let tak byla i pro protinádorovou a imunopresivní aktivitu místo toxinu použita BS-RNáza. Účinnost tohoto imunotoxinu byla nakonec mnohem vyšší, než u nativní BS-RNázy (Matoušek, 2001).

2.2.6. Mechanismus protinádorového účinku ribonukleáz

Mechanismus protinádorové aktivity RNáz je sice doposud nejasný, na druhou stranu je ovšem známo, že RNázy způsobují buněčnou smrt na základě degradace RNA. Prvním krokem cytotoxického působení RNáz je vazba enzymu k membráně rakovinných buněk (viz Obr.2.1 I). Vazba je pravděpodobně zprostředkována adsorpcí, neboť povrchový receptor pro

enzym nebyl nalezen. Do cytosolu pak enzym pravděpodobně proniká endocytózou, proniká lipidovou dvojvrstvou (viz Obr. 2.1 II), následuje vazba na molekulu RNA, zablokování syntézy proteinů a smrt buňky (viz Obr. 2.1 III) (Eckschlager, 2005).

RNázy citlivé k RI jsou v cytosolu zachyceny těmito inhibitory, ovšem ty, kterým se podaří RI uniknout, katalyzují štěpení RNA a následně způsobují smrt buňky (Matoušek, 2001; Leland a Raines, 2001).



Obr. 2.1. Cesta cytotoxických ribonukleáz pankreatického typu do buňky
(Leland *et al.*, 2001)

2.3. Klasifikace rostlinných ribonukleáz

2.3.1. Biochemická klasifikace

Klasifikace rostlinných RNáz byla před používáním nástrojů molekulární biologie a sekvenování bílkovin založena na biochemických vlastnostech (Bariola a Green, 1997). Rostlinné ribonukleázy lze na základě těchto vlastností rozdělit do čtyř hlavních skupin: RNázy I, RNázy II, nukleázy I a exonukleázy I (Farkas, 1982).

RNázy I, nebo také kyselé RNázy, jsou RNA specifické, rozpustné endonukleázy s molekulovou hmotností mezi 20 a 25 kDa a optimem pH mezi 5,0 a 6,0. Konečnými produkty enzymů jsou 3'-fosfo (3'-P) nukleotidy. RNázy I jsou necitlivé k EDTA.

RNázy II jsou s RNázami I v podstatě shodné. RNázy II jsou RNA specifické endonukleázy s molekulovou hmotností mezi 17 a 25 kDa produkující jako konečné produkty 3'-P nukleotidy. Na rozdíl od RNáz I je optimum jejich pH mezi 6,0 a 7,0 a jsou lokalizovány v mikrosomech. Jsou k EDTA necitlivé. Obě skupiny, RNázy I a RNázy II, preferují štěpení vazby sousedící s guaninem.

Do skupiny nukleáz I patří endonukleázy degradující jak RNA, tak i ssDNA. Enzymy preferují vazby sousedící s adeninem a koncovými produkty jejich štěpení jsou 5'-P nukleotidy. Nukleázy I mají molekulovou hmotnost mezi 31 a 39 kDa, optimum pH mezi 5,0 a 6,5 a jsou vysoce citlivé k EDTA.

Čtvrtou skupinou jsou exonukleázy I. Exonukleázy I jsou rozpustné enzymy o molekulové hmotnosti vyšší než 100 kDa, jejichž optimum pH se pohybuje mezi 7,0 a 9,0. Enzymy jsou schopné štěpit jak molekuly ssDNA, tak i molekuly RNA. Jsou vysoce citlivé k EDTA.

Zástupce těchto čtyř skupin lze najít v různých druzích rostlin, ovšem mnoho rostlinných enzymů, které degradují RNA nelze do jedné z těchto tříd jednoduše zařadit. Rovněž rozdíly mezi jednotlivými skupinami nejsou zcela jasné, částečně také díky odlišné purifikaci enzymů a způsobu práce v jednotlivých laboratořích (Green, 1994). Pro příklad, u Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), který obsahuje zástupce skupin RNáz I, RNáz II i nukleáz I, nelze do daných skupin některé RNázy zařadit. Většina RNázových aktivit, které byly u Huseníčku rolního identifikovány, měly vlastnosti odpovídající rozmezí skupin RNáz I a RNáz II - optimum pH 6,5, molekulovou hmotnost mezi 24 a 40 kDa a žádnou DNázovou aktivitu. Některé molekuly byly k EDTA citlivé, jiné nikoli. Na druhou stranu byly přítomny RNázy o molekulové hmotnosti 9 kDa, které jsou díky své malé velikosti, nejméně podobné s hlavními skupinami RNáz (Yen a Green, 1991).

2.3.2. Rostlinné ribonukleázy v T2 rodině

Jinou možností přístupu ke klasifikaci rostlinných RNáz je klasifikace sekvenací. Prvními osekvenovanými RNázami byly RNázy Tabáku křídlatého (*Nicotiana glauca*) a to v souvislosti se sekvenací glykoproteinů spojených se zamezením samoopylení (Self-incompatibility, SI) u čeledi *Solanaceae* (Anderson *et al.*, 1986). Srovnání jejich aminokyselinové sekvence vedlo k poznání, že tyto S-glykoproteiny jsou homologické k ribonukleázám hub, které patří do rodiny T2 RNáz. Následné enzymatické analýzy těchto S-glykoproteinů, nyní nazývaných S-RNázy, potvrdily jejich ribonukleázovou aktivitu (McClure *et al.*, 1989). Rovněž se potvrdil podíl enzymů na zastavení růstu pylové láčky se shodnou S-alelou, jako prevence inbreedingu a podpora křížení u rostlin (Kao a Huang, 1994). Později byly v samosprašných rostlinách objeveny RNázy, podílející se na senescenci a ochraně organismu před vyhladověním. Vzhledem k jejich strukturální podobnosti k S-

RNázám, podílejících se na zamezení samoopylení u rostlin, byly pojmenovány S-like RNázy (Green, 1994).

S-like RNázy jsou enzymy o molekulové hmotnosti mezi 21 a 29 kDa, obsahují dva konzervované histidinové zbytky nutné pro katalytickou aktivitu T2 RNáz a pět konzervovaných sekvencí (C1-C5), které jsou charakteristické pro S-RNázy (Bariola a Green, 1997). Ačkoliv mají S-RNázy a S-like RNázy mnoho podobných strukturálních znaků (Green, 1994), každá ze skupin obsahuje vysoce konzervované zbytky, které u druhé skupiny nenalezneme (Green, 1994; Taylor *et al.*, 1993). S-like RNázy tak tvoří samostatnou linii oddělenou od linie S-RNáz a ostatních T2 RNáz z virů, bakterií, hub a zvířat (Anderson *et al.*, 1986). Většina z S-like RNáz, stejně jako z S-RNáz, jsou pravděpodobně enzymy sekreční (Green, 1994). Odlišná role S-like RNáz napovídá, že v SI rostlinách se mohou vyskytovat, jak S-RNázy, tak i S-like RNázy.

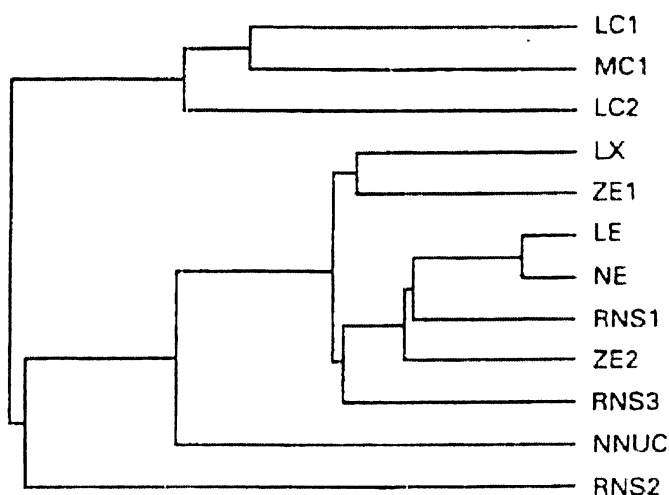
Prvními identifikovanými S-like RNázami byly RNS1, RNS2 a RNS3 z Huseníčku rolního. Tyto RNázy byly identifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na základě podobnosti s konzervovanou oblastí T2 RNázové rodiny. Připojení těchto aminokyselinových sekvencí k sekvencím ostatních rostlinných RNáz následně ukázalo na jejich vzájemné příbuzenské vztahy. RNázy RNS1 a RNS3 jsou blízce příbuzné k RNázám LE a LX ze samosprašné Rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum*), které se podílejí na odpovědi rostliny při nedostatku fosfátu (Nürnberger, 1990). Dalšími příbuznými enzymy, indukovanými v rostlině Rajčete jedlého při nedostatku fosfátu, jsou RNázy LV1, LV2 a LV3, které byly izolovány z vakuol. Zajímavostí je, že RNáza LV3 se zdá být identická s RNázou LE, která je extracelulárním enzymem a RNázy LV1 a LV2 jsou na základě porovnání sekvenovaných oblastí identické k extravakuolární RNáze LX. Na rozdíl od RNázy LV2 má ale RNáza LX C-terminální signál, díky němuž zůstává pravděpodobně lokalizována v endoplazmatickém retikulu (ER). Na základě biochemických vlastností lze RNázy LE, LX, LV1, LV2 a LV3 zařadit do skupiny RNáz I (Nürnberger, 1990). Molekulová hmotnost těchto RNáz se totiž pohybuje mezi 20 a 25 kDa, což je pro RNázy I specifické (Farkas, 1982). Dalšími S-like RNázami blízce příbuznými k RNázám Huseníčku rolního a Rajčete jedlého, popisovanými výše, jsou RNázy ZRN I a ZRN II z listů Ostálky sličné (*Zinnia elegans*), které se podílejí na vytváření xylému z mezofylových buněk. Na rozdíl od předchozích RNáz nejsou ovšem indukovány při nedostatku fosfátu (Ye a Droste, 1996).

S-like RNázy byly rovněž nalezeny v semenech některých druhů tykví. Prvním identifikovaným enzymem byla RNáza MC1 ze semen Hořkého melounu (*Momordica charantia*), následně byly identifikovány RNázy ze semen Meloun vodní (*Cucumis sativum*) a

Meloun cukrový (*Cucumis melo*). Oba enzymy, Cusativin i Melonin, byly na základě jejich sekvencí charakterizovány jako S-like RNázy. Dalšími RNázami, které byly izolovány ze semen Tivuku (*Luffa cylindrica*), jsou RNázy LC1 a LC2. Vzhledem k samosprašnosti těchto druhů rostlin se předpokládá, že RNázy hrají roli v ochraně semen proti patogenům. Právě RNázy MC1, LC1 a LC2 tvoří uvnitř S-like RNáz samostatnou linii. Jejich odlišnost od ostatních S-like RNáz vyjadřuje pravděpodobně jejich rozdílnost ve funkci, spíše než evoluční vzdálenost.

Proteiny strukturně podobné S-RNázám byly nalezeny i u samosprašných rostlin. RNázy S_x a S₀ byly identifikovány v odrůdě petunie *Petunia hybrida*, RNáza Sc v rajčeti *Lycopersicon peruvianum*. Ačkoliv byla RNáza Sc identifikována jako člen rodiny S RNáz, chybí jí RNázova aktivita. Ztráta aktivity a s tím související samosprašnost je pravděpodobně spojena s mutací jednoho z vysoce konzervovaných histidinových zbytků.

Několik T2 RNáz, kromě S-RNáz, bylo identifikováno i v SI rostlinách. S-like RNáza NE, jejíž sekvence je podobná sekvencím RNázy LE, z Rajčete jedlého a RNázy RNS1 z Huseníčku rolního byla nalezena v prašnicích Tabáku křídlatého (*Nicotiana alata*). Podobně byla v čnělkách Tabáku křídlatého identifikována RNáza MS1, která není rovněž zapojena do zamezení samoopylení u rostlin. U některých druhů SI rostlin lze najít i proteiny, které jsou blízké k S-RNázám, ovšem nezapojují se do procesů zamezení samoopylení. Tyto enzymy postrádají rovněž strukturální znaky spojené s S-like RNázami. Proto je pravděpodobné, že vznikly jako část linie S-RNáz poté, co se tato linie oddělila od S-like RNáz. K takovýmto RNázám lze zařadit RNázu X2 z odrůdy petunie *Petunia inflata*. (Bariola a Green, 1997)



Obr. 2.2. Genealogie skupiny S-like RNáz
(Taylor *et al.*, 1993).

2.3.3. S patogenezí spřízněné proteiny skupiny PR-10

S patogenezí spřízněné proteiny (Pathogenesis-related proteins, PR proteiny) jsou enzymy indukované rostlinou po napadení patogenem nebo s tím související situací. PR proteiny hrají pravděpodobně roli v obraně rostliny proti patogenům. Poprvé byly tyto proteiny spojeny s ribonukleázovou aktivitou RNázy ze ženšenu (*Panax ginseng*), jejíž sekvence byla shodná se sekvencemi dvou proteinů z petržele. Zmíněné proteiny patří do PR-10 rodiny proteinů, pro které je charakteristická molekulární hmotnost mezi 17 a 18 kDa a jsou považovány za intracelulární. Vedle RNázy ze ženšenu byla prokázána ribonukleázová aktivita pouze u RNázy Bet v 1. Tyto proteiny patří do příbuzné rodiny hlavních pylových alergenů Bet v 1 u bříz, které jsou zastoupeny ve velkých množstvích v pylových zrnech. U ostatních členů této skupiny nebyla RNázová aktivita prozatím prokázána, z toho důvodu je předčasné označit tuto rodinu jako jednu z hlavních skupin rostlinných RNáz. (Bariola a Green, 1997)

2.3.4. Skupina V alergenů

Ribonukleázová aktivita je rovněž spojena s proteinem Phl p Vb z Bojínek luční (*Phleum pratense*) z čeledi Lipnicovité (*Gramineae*), který je členem skupiny trávových pylových alergenů, molekulárně odlišných od těch v Bet v 1 rodině. Skupina V alergenů se vyznačuje molekulovou hmotností mezi 32 a 38 kDa a ačkoliv je RNáza Phl p Vb inhibována lidským placentálním inhibitorem RNáz, který inhibuje zvířecí RNázy typu A, sekvence skupiny V alergenů nejeví jasnou podobnost s proteiny rodiny RNáz A. Prozatím není jasné, zda skupina V alergenů tvoří samostatnou skupinu rostlinných RNáz. (Bariola a Green, 1997)

2.3.5. Rostlinné nukleázy

Ačkoliv je mnoho rostlinných enzymů klasifikováno jako nukleázy I, je málo informací o sekvencích, které by souvislost těchto enzymů potvrdily. Jedním z enzymů, který náleží do skupiny nukleáz I, je nukleáza z aleuronových vrstev ječmene o molekulové hmotnosti 39 kDa, jejíž sekrece je indukována kyselinou giberilinovou, rostlinným hormonem, který mobilizuje živiny endospermu semen ke klíčení (Bariola a Green, 1997). Sekvence této nukleázy byla porovnána se sekvencí nukleázy z Ostálky sličné (*Zinnia elegans*), která je indukována při diferenciaci xylému (Ye a Droste, 1996). Ačkoliv není tato nukleáza klasifikována jako nukleáza I, vzhledem k molekulové hmotnosti 43 kDa, je její N-terminální sekvence shodná se sekvencí nukleasy z ječmene, což napovídá, že jsou tyto dvě

nukleázy příbuzné. Nukleáza z aleuronových vrstev ječmene je částí svojí sekvence rovněž podobná amino konci S1 nukleázy z *Aspergillus oryzae* a nukleázy P1 z *Penicillium citrum*, které patří do skupiny bifunkčních houbových nukleas specifických na jednořetězcové nukleové kyseliny. Z toho vyplývá, že nukleázy I mohou být zařazeny jako část této rodiny nukleáz. (Bariola a Green, 1997)

2.4. Regulace a funkce rostlinných ribonukleáz

2.4.1. Remobilizace fosfátu

Jedním z významných procesů probíhajících v rostlinách je enzymatický rozklad molekul RNA za účelem uvolnění anorganického fosfátu (P_i). Dostupnost volného rozpustného P_i je totiž významným limitujícím faktorem pro růst rostlin. Vzhledem k jeho malému množství v prostředí se proto u rostlin vyvinula řada mechanismů pro sbírání a uchování tohoto vzácného prvku. RNázy, současně s fosfatázami a fosfodiesterázami, uvolňují P_i , který je následně použit jako zdroj při jeho nedostatku. RNázy tak mohou u rostlin zvyšovat efektivitu hromadění P_i (Bariola a Green, 1997). Zdroji molekul RNA pro růst a reprodukci rostlin mohou být senescentní buňky, které byly zničeny nebo lyzovány, popřípadě molekuly RNA přítomné v rhizosféře (Green, 1994). To platí v případě extracelulárních RNáz. RNázy mohou rovněž usnadnit rozklad RNA ve vakuolách nebo v případě jejich lyze, degradaci cytoplazmatické RNA (Matile, 1975). Tímto způsobem se RNázy podílejí na recyklaci složek RNA v rostlinné buňce. RNázy, podílející se na degradaci RNA uvnitř buňky, jsou proto označovány jako intracelulární RNázy.

V době nedostatku fosfátu dochází v rostlinách k indukci S-like RNáz a jejich genů, což naznačuje, že remobilizace anorganického fosfátu je jednou z rolí S-like RNáz ve vyšších rostlinách (Green, 1994). Existence mechanismů způsobených nedostatkem P_i ve vyšších rostlinách byla navržena Goldsteinem *et al.* (1989) na základě studií kyselých fosfatáz sekretovaných rostlinami Rajčete jedlého. Tento záchranný systém, indukovaný jako odpověď na nedostatek P_i , je obdobný se systémy u mikroorganismů a kvasinek, které enzymaticky spouštějí uvolňování fosfátu z organických zdrojů a rozpuštěný fosfát poté transportují dovnitř buňky (Parry *et al.*, 1997). Tímto jsou zajištěny jak dostupnost P_i degradací extracelulárních organických zdrojů, tak ulehčení jeho absorpce (Nürnbergger, 1990).

Jednou z prvních izolovaných RNáz, které jsou sekretovány jako odpověď na nedostatek P_i , byla RNáza LE z Rajčete jedlého (Nürnbergger, 1990). RNáza LE byla

syntetizována v kultuře buněk rajčete jako odpověď na nedostatek P_i , zatímco při nedostatku dusičnanů, vystavení kultury solím nebo osmotickým stresům k akumulaci RNÁzy LE nedocházelo. Z toho vyplývá, že exprese RNÁzy LE není obecnou odpovědí na nepříznivé podmínky růstu kultury (Glund a Goldstein, 1993). V následujících letech byly z rajčete izolovány další S-like RNÁzy - RNÁzy LV1, LV2, LV3 a LX, které se jako intracelulární enzymy rovněž podílejí na odpovědi na nedostatek P_i v organismu. Studie prokázaly přítomnost RNáz LV1-3 v rostlinných vakuolách. RNÁza LX byla nalezena rovněž uvnitř buněk, ovšem nikoliv ve vakuolách. Kinetika indukce těchto RNáz napovídá, že tyto čtyři RNÁzy jsou regulovány společně s RNázou LE (Löffler *et al.*, 1992). S-like RNÁzy podobné RNázám izolovaných v rajčeti byly také nalezeny u Huseníčku rolního. RNÁzy RNS1, RNS2 a RNS3 se různou měrou podílejí na odpovědi na nedostatek P_i a senescenci. S tím souvisí i jejich výskyt v rostlinných tkáních. RNS2 a RNS3 jsou přítomny zejména v květním pletivu, v menších množstvích ovšem i v ostatních tkáních. Na druhou stranu RNÁza RNS1 je přítomna pouze v nepatrném množství v kořenech, v listech a ve stoncích květenství (Parry *et al.*, 1997). RNÁzy RNS rodiny jsou i odlišně exprimovány na signál nedostatku P_i . Zatímco hladina RNS1 mRNA se zvyšuje značně, hladina RNS2 mRNA stoupá jen mírně. Na rozdíl od hladin transkriptů RNS1 a RNS2 se však hladina RNS3 mRNA v podstatě nemění. Rozdíly v odlišné reakci na podněty způsobené na jedné straně nedostatkem P_i a na straně druhé senescencí, mohou být způsobeny indukcí pomocí dvou impulsů (Glund a Goldstein, 1993).

2.4.2. Senescence

Senescenci lze charakterizovat jako řadu událostí probíhajících v tkáních po jejich maturaci. V jejím průběhu dochází k rozbití buněčných struktur, degradaci makromolekul a k transportu volných živin ven z umírajících tkání (Parry *et al.*, 1997). Tento proces existuje k zachování živin a minerálů pro opětné použití. Rozbití a redistribuce živin probíhá během vegetativního i generativního růstu rostlin. V době vegetativního růstu v podobě uchování minerálů ze senescentních děloh, během reprodukčního růstu u rostlin, u kterých dochází k senescenci všech vegetativních orgánů, které poté slouží jako zdroj živin pro orgány generativní (Bariola a Green, 1997). Biochemické procesy, které jsou pro senescenci charakteristické, se podobají těm, které probíhají při reakci na nedostatek P_i . Proto není překvapivé, že některé hydrolytické enzymy jsou pro tyto procesy společné (Parry *et al.*, 1997). Senescence patří mezi procesy, které jsou závislé na obsahu RNáz (Green, 1994).

RNázy jsou během senescence pravděpodobně indukovány společně s ostatními hydrolytickými enzymy a ulehčují rozpad rostlinných komponent (Bariola a Green, 1997). Ribonukleázová aktivita se během senescence zvyšuje, ovšem v různých systémech je načasování a míra zvýšení odlišná. Mnoho z těchto odchylek je pravděpodobně způsobeno rozdíly v podmínkách experimentu (např. studium na listech odtržených a neodtržených od stonku) a v použitém vzorku (Farkas, 1982).

Jedním z prvních důkazů zapojení ribonukleázové aktivity v průběhu senescence byl pokus Blanka a McKeona (1989) na listech pšenice (*Triticum aestivum*), v nichž nastalo zvýšení aktivity ssRNA specifické nukleázy v průběhu ochabování listů. Později byli identifikovány tři pšeničné RNázy, které se pravděpodobně na senescenci listů pšenice podílejí. RNázy WL_A , WL_B a WL_C jsou přítomny jak v rostlinách senescentních, tak i v nesenescentních. V průběhu senescence jsou však exprimovány ve vyšším množství, a to na různých hladinách (Blank a McKeon, 1991). Zvýšená RNázová aktivita byla obdobně pozorována i v listech Huseníčku rolního. S-like RNázy RNS1, RNS2 a RNS3 jsou v různé míře indukovány v listech v průběhu senescence. Zatímco RNS1 je exprimována v malém množství, RNS2 a RNS3 mRNA jsou přítomny v množství značném. RNS2 je v průběhu senescence rovněž exprimována v korunních lístcích. Vzhledem k tomu, že je RNS2 exprimována i během odpovědi na nedostatek P_i , je pravděpodobné, že jednou z rolí RNS2 v Huseníčku rolním je remobilizace P_i , částečně při senescenci buněk a částečně při odpovědi na jeho nedostatek (Taylor *et al.*, 1993).

2.4.3. Programovaná buněčná smrt, obrana rostlin proti patogenům

Jednou ze základních schopností rostlin je rozeznat patogeny a aktivovat tak odpověď, která má za následek zamezení růstu patogenu v místě infekce. Tato reakce je nazývána rezistentní odpovědí a jejím charakteristickým znakem je indukce programované buněčné smrti (Programmed cell death, PCD) v místě infekce. Tento proces je označován jako hypersenzitivní odpověď (Hypersensitive response, HR) rostlinného organismu a je pravděpodobně limitujícím faktorem dodávky živin pro patogen do doby, než dojde k dehydrataci tkáně. Zdá se, že hypersenzitivní odpověď je jednou z forem programované buněčné smrti, která se jako aktivní proces podílí na odpovědi rostlin na podněty z okolí (Greenberg, 1996).

Programovaná buněčná smrt je spojena jak s hypersenzitivní odpovědí rostlin na patogeny, tak se senescencí, možností opylení, určením pohlaví a dalšími vývojovými

pochody (Greenberg, 1996). Jednou z prací zabývajících se studiem tohoto jevu v rostlinách je práce o diferenciaci xylému, hlavní části rostlinného cévního systému. Ve své studii na Ostálce sličné potvrdili Ye a Droste (1996) přítomnost S-like ZRNázy I v průběhu diferenciaci kultury mezofylových buněk v části xylému (Ye a Droste, 1996). Je možné, že RNázy, stejně jako ostatní hydrolytické enzymy, jsou zapojeny buď v ničení buněk přímo nebo v degradaci cytoplazmatických komponent buněk po lyzi. Důvodem je pravděpodobně vyčištění kanálků xylému a ulehčení druhotného využití živin.

Zvýšení hladiny RNáz v nemocných rostlinách bylo dokumentováno již Farkasem (1982). Jak bylo zmíněno mohou hrát RNázy při napadení patogenem roli v procesech programované buněčné smrti, jako je hypersenzitivní reakce, na straně druhé mohou působit jako obrané proteiny v tkáních potencionálně podléhajících napadení v průběhu patogeneze.

RNázami působícími jako obrané proteiny jsou RNázy T2 produkované v pestících. Pestík, který je v průběhu oplození penetrován pylovou láčkou, je bohatý na zásobní látky, které mohou podlehnout invazi patogenu. Obrana proti patogenu je zajištěna extracelulárními RNázami, které jsou v pestíku produkovány. K T2 RNázám produkovaným v pestíku lze zařadit RNázy RNS2 z Huseníčku rolního, X2 z odrůdy petunie *Petunia inflata* a RNázu NE z Tabáku křídlatého. Extracelulární RNázy mohou hrát rovněž roli v obraně proti RNA virům (Bariola a Green, 1997). Jak bylo již zmíněno, RNázy se mohou akumulovat i ve vakuolách. Při napadení patogenem se tak spolu s ostatními hydrolytickými enzymy podílejí na obraně rostlinného organismu uvolněním z vakuol při buněčné lyzi. Rychlým zvýšením aktivity RNáz rostliny reagují i na poranění (Farkas, 1982), jako žvýkání tkání hmyzem a herbivory. Žvýkání, totiž stejně jako infekce, vede k poranění tkání a indukci exprese genů podílejících se na obraně rostlin. Jednou z RNáz, u které byla prokázána indukce na základě mechanického poranění, je S-like RNáza ZRN II ze Ostálky sličné (Ye a Droste, 1996).

2.4.4. Zamezení samoopylení u rostlin

Většina kvetoucích rostlin má bisexuálně se množící květy obsahující jak samčí, tak samičí reprodukční orgány. Takové rostliny výrazně zvyšují svojí schopnost opylení díky hmyzu, protože ukládání cizích pylových zrn na pestík a zároveň přemístění vlastních pylových zrn z prašníku je účinné i v průběhu jedné návštěvy hmyzem. Na jedné straně zvyšuje bisexuální rozmnožování riziko samoopylení a jeho nepříznivý následek inbreední křížení. Na straně druhé však existuje mnoho bisexuálně se množících rostlin, které jsou schopné samoopylení zabránit. Pro takovéto rostliny je zaveden anglický termín self-

incompatible (SI). SI je geneticky determinovaná prezygotická bariéra, která zabraňuje oplození vlastními nebo příbuznými pylovými zrny (Hiscock a McInnis, 2003). SI je zapojena do výměny informací mezi pylovým zrnem nebo láčkou a pestíkem. Odpovědi vedou na jedné straně k růstu pylové láčky, což lze označit jako kompatibilní odpověď a na straně druhé k zastavení vývoje pylové láčky, tedy k odpovědi inkompatibilní (Parry *et al.*, 1997). SI rostliny lze na molekulárně genetickém základě rozdělit do dvou skupin, na skupinu s gametofytickým SI systémem (GSI) a na skupinu se sporofytickým SI systémem (SSI) (Matton *et al.*, 1994).

Gametofytický SI systém

Gametofytický SI (GSI) systém je dobře charakterizován u rostlin z čeledí Lilkovitých (*Solanaceae*), Makovitých (*Papaveraceae*), Růžovitých (*Rosaceae*) a Krtičníkovitých (*Scrophulariaceae*). V každé z těchto čeledí je SI kontrolována pomocí jediného genetického lokusu (S lokusu) s mnoha alelami. Odmítnutí pylového zrna nastává v případě, když jediná S alela přítomná v haploidním pylovém zrně odpovídá S alele přítomné v diploidní tkáni pestíku.

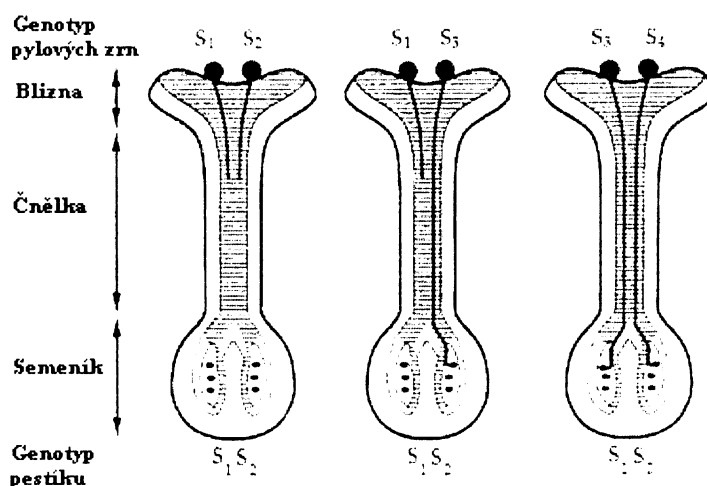
S lokus kóduje extracelulární glykoprotein, který je hojně zastoupen v pestíku a prokazuje ribonukleázovou aktivitu (Matton *et al.*, 1994). Na základě sekvenace cDNA glykoproteinů asociovaných s S lokusem bylo identifikováno pět konzervovaných oblastí (C1-C5), z nichž dvě oblasti (C2 a C3) v rozmezí pozic 38 a 112 jsou shodné se sekvencí extracelulárních T2 RNáz některých hub. V pozicích 42 a 108 jsou přítomné i oba His zbytky, nutné pro katalytickou aktivitu T2 RNáz. Z toho vyplývá, že RNázová aktivita glykoproteinů asociovaných s S lokusem je srovnatelná s tou u T2 RNáz (McClure *et al.*, 1989). RNázy, které se na SI u rostlin podílejí, jsou nazývány S-RNázy.

První studie SI u rostlin, která byla v roce 1925 provedena Easten a Mangelsdorffem na Tabáku křídlatém, prokázala, že SI je pod kontrolou jediného lokusu, ovšem produkt S-lokusu nebyl znám. Až studie Bredemeijera a Blaase (1981) identifikovala v pestíku jako produkt bazický protein. V pozdější studii provedené Andersonem *et al.* (1986, 1989) u Tabáku křídlatého byla cDNA bazických proteinů asociovaných s S₂, S₃ a S₆-alelami klonována a porovnána na základě aminokyselinové sekvence. Shodnost aminokyselinové sekvence proteinů byla překvapivě poměrně nízká. Anderson *et al.* (1989) navrhnul, že k interakci mezi S-RNázami a pylovými zrny pravděpodobně dochází na povrchu S-RNáz. S-RNázy jsou exprimovány v reprodukčních orgánech květů podél dráhy růstu pylové láčky k semeníku a jsou rovněž syntetizovány v čase, kdy je zamezeno samooplození. Ovšem jasný důkaz zapojení S-RNáz v SI reakci podal až Lee *et al.* (1994) na transformovaných SI rostlinách

petunie *Petunia inflata*. Prokázal, že S-RNázy jsou potřebné a dostačující pro odmítnutí pylového zrna v pestíku (Lee *et al.*, 1994).

Účinek S-RNáz v SI není doposud zcela objasněna. V současné době se předpokládá, že S-RNázy působí při vstupu inkompatibilní pylové láčky cytotoxicky a degradují molekuly RNA, včetně rRNA nutné pro translaci proteinů (Matton *et al.*, 1994). V takovém případě dochází k zastavení růstu pylové láčky (McClure *et al.*, 1989). Pylová láčka není schopná doručit samčí pohlavní buňky do semeníku a proto nemůže dojít k oplození (Parry *et al.*, 1997).

Podobně jako čeled' Lilkovitých, i čeled' Růžovitých zahrnuje mnoho druhů GSI rostlin. Porovnání sekvencí cDNA se sekvencemi S-RNáz z čeledi Lilkovitých ukázalo, že pět konzervovaných oblastí (C1-C5) charakteristických pro tuto skupinu je rovněž přítomno v RNázách čeledi Růžovitých. To napovídá, že stejný SI mechanismus existuje i ve vzdáleně příbuzných skupinách (Parry *et al.*, 1997).



Obr. 2.3. Chování pylového zrna při GSI

Pylová zrna pochází z rostlin s alelami S₁S₂, S₁S₃ a S₃S₄. Na obrázku je znázorněno chování pylových zrn na pestíku s alelami S₁S₂.

(Parry *et al.*, 1997).

Sporofytický SI systém

Sporofytický SI (SSI) systém je studován zejména u zástupců čeledi Brukvovitých (*Brassicaceae*). SSI je stejně jako GSI kontrolována pomocí jediného, mutlialelického S

lokusu. Odmítnutí pylového zrna je kontrolováno pomocí interakce SI genotypu pestíku s rodičovským genotypem pylu, nikoliv haploidním genotypem pylového zrna. Proto každé pylové zrno v rostlinách s SSI představuje produkt dvou S alel a k odmítnutí dochází v případě, když jedna z těchto alel odpovídá jedné z S alel exprimovaných v pestíku.

S lokus obsahuje nejméně dva mutlialelické geny, zbývající část alelických genů je nazývána haplotyp. Jeden z genů uvnitř S haplotypu kóduje extracelulární glykoprotein nazývaný S-lokus glykoprotein (SLG), druhým významným genem v S-lokusu je gen, který kóduje S-lokus receptorovou kinázu (SRK), membránový protein schopný fosforylovat serinové a treoninové zbytky. Geny pro SLG a SRK jsou exprimovány v reprodukčních orgánech květů, SLG gen je rovněž exprimován v bliznových papilách, buňkách blizny, které přijímají pylová zrna. Oba proteiny jsou produkovány jak v pestíku, tak v i v pylových zrnech a prašnicích. Ke specifické SI reakci dochází mezi peptidem derivovaným pláštěm pylového zrna a SLG pestíku. Následně dochází k interakci SLG a produktu pylového zrna s SRK. Výsledná fosforylační reakce nakonec vede k inhibici klíčení pylového zrna (Matton *et al.*, 1994).

2.4.5. Úprava a rozpad RNA

Reakce RNA metabolismu, na nichž se RNázy nezbytně podílejí. Lze rozdělit do tří skupin - reakce spojené s úpravou RNA, turnover reakce a reakce degradační (Deutscher, 1993).

V reakcích spojených s úpravou RNA dochází k přeměně jedné molekuly RNA na jinou, funkční molekulu RNA nebo její intermediát. Skupina zahrnuje reakce maturující 5' a 3' konce prekurzorů molekuly RNA, reakce vedoucí k odstranění intronů a reakce odštěpující jednotlivé RNA z polycistronního transkriptu.

Turnover reakce zahrnují reakce, při kterých se funkcí RNázy struktura molekuly RNA mění, ovšem následně je syntetickými procesy obnovena do původní nebo skoro původní funkční podoby. Do skupiny turnover reakcí patří reakce, při kterých dochází ke změně délky poly(A) mRNA, rozbití a znovupřipojení antikodónové smyčky tRNA a reakce end turnoveru -CCA sekvence tRNA.

V průběhu degradačních reakcí, kterým podléhají různé skupiny RNA molekul, dochází v buňkách k eliminaci molekuly RNA z buňky nebo k vytváření nutričních látek potřebných za určitých fyziologických podmínek. Významnou skupinou molekul RNA, na jejímž konstantním turnoveru se degradativní reakce zásadně podílejí, je skupina mRNA

molekul. Právě konstantním turnoverm buňka totiž reaguje na měnící se potřeby. Další skupinou jsou vedlejší produkty reakcí upravující molekuly RNA, stejně tak denaturované, poškozené nebo nesprávně syntetizované RNA molekuly. V buňkách rovněž existuje specifický mechanismus degradace stabilních RNA molekul jako odpověď na fyziologický stres. Na vyhladovění například buňka reaguje degradací molekul RNA na nukleotidy, čímž si zajišťuje přežití. Shodně, rozpadem molekuly RNA, odpovídá buňka na vystavení Hg^{2+} nebo zvýšení teploty. (Deutscher, 1993)

Úprava a rozpad RNA probíhají jak v prostorách jádra a v oblasti organel, tak i v oblasti cytosolu.

Do mnoha procesů, které se odehrávají v jádru, jsou RNázy pravděpodobně zapojeny, ovšem prozatím bylo identifikováno jen malé množství těchto enzymatických aktivit. Nejvýznamnější degradační procesy jsou zřejmě spojeny s rozpadem intronů a dalších sekvencí, které jsou odlišné od prekurzorů molekul mRNA, rRNA a tRNA. Jedním z důkazů lokalizace RNáz v jádře je přítomnost 7-2/MRP RNA, která je součástí RNázy MRP, enzymu zapojeného v úpravě RNA primerů během replikace DNA v živočišných buňkách. 7-2/MRP RNA je rovněž přítomna v jádru rostlinných buněk a je pravděpodobně zapojena do úpravy rRNA.

Většina RNáz přítomných v chloroplastech a mitochondriích se podílí na maturaci 5' a 3' konce transkriptů. Jedním z těchto enzymů je RNáza P, zodpovědná za úpravu 5' konce pre-tRNA, která je přítomna jak v chloroplastech, tak v mitochondriích. Do úprav 3' konce pre-tRNA je, na rozdíl od Prokaryota, zapojeno endonukleolitické štěpení. RNázy podílející se na úpravě 3' konce pre-tRNA tak zahrnují na jedné straně jednu nebo více 3'-5' exoRNáz a na straně druhé endoRNázu.

Jedním z nejvýznamnějších procesů, na kterých se RNázy podílejí, je degradace rostlinné cytoplazmatické mRNA. O RNázových aktivitách zapojených v těchto procesech ovšem není mnoho známo, vzhledem k tomu, že většina z nich degraduje mRNA bez vzniku jednoduše identifikovatelných meziproductů. Vyjímkou jsou transkripty rbcS ze Sójí luštěnaté (*Glycine max*), u které byly při rozpadu RNA pozorovány oddělené fragmenty. Struktura těchto fragmentů napověděla, že jsou produkovány na základě náhodného endonukleolytického štěpení, které následuje po štěpení exonukleázovým v obou směrech (Green, 1994).

Ačkoliv je mnoho rostlinných RNáz zapojeno do procesů spojených s metabolismem molekul RNA, jako jsou úpravy molekul RNA a turnover reakce, řada z nich je lokalizována

uvnitř vakuol nebo extracelulárně a pravděpodobně se na procesech RNA metabolismu nepodílejí (Deutscher, 1993).

3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Snaha o využití RNáz v protinádorové terapii obrací pozornost i na pšenici, která se v posledních letech stala zajímavým objektem pro studium protinádorového účinku rostlinných RNáz. Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření dosavadních poznatků o neutrálních RNázách izolovaných ze senescentních listů pšenice (*Triticum* sp.) a účincích jejich stabilizovaných forem na normální a nádorové tkáně. V diplomové práci byly vytyčeny následující cíle:

1. Izolace a purifikace neutrálních RNáz

Prvním z cílů byla izolace neutrálních RNáz ze senescentních pšeničných listů, jejich purifikace, kvantifikace a určení relativní molekulové hmotnosti.

2. Testování aktivity neutrálních RNáz *in vitro*

Úkolem v této části práce bylo otestovat aktivitu izolovaných neutrálních RNáz pomocí testu ribonukleázové aktivity a polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) a kvasničné dsRNA.

3. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz *in vivo*

Cílem studie bylo pozorovat distribuci stabilizovaných RNáz v tkáních a orgánech atmymických nu/nu myší s transplantovaným lidským prostatickým karcinomem (buněčná linie LNCaP) a duktálním pankreatickým adenokarcinomem (buněčná linie PaTu 8902) v různých časových intervalech od aplikace. Studována byla také rychlost metabolizace preparátu v krvi a exkrece v moči.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

K izolaci RNáz byly použity senescentní listy pšenice (*Triticum* sp.) přibližně 30 dní *post anthesis*.

Buněčná linie lidského prostatického karcinomu LNCaP a duktálního pankreatického adenokarcinomu PaTu 8902 byla získána z German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig, Německo.

Samci CD-1 imunodeficientních nu/nu myši o hmotnosti 28-36 g byly získány od společnosti AnLab s.r.o., Praha, Česká republika.

4.2. Použité chemikálie

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue R-250, kat. č. 161-0400

Carl Roth (Německo): kyselina trichloroctová, kat. č. 8789

tris-hydrochlorid (Tris-HCl), kat. č. 9090

Fluka (Švýcarsko): tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-báze), kat. č. 93352

Lach-Ner (ČR): fosforečnan sodný sekundární dodekahydrát, kat. č. 30307

glycerin bezvodý, kat. č. 30270

hydroxid sodný, kat. č. 30341

chlorid draselný, kat. č. 30383

chlorid sodný, kat. č. 30423

chlorid zinečnatý bezvodý, kat. č. 30436

isopropylalkohol, kat. č. 30470

kyselina chlorovodíková 35%, kat. č. 30565

modř bromfenolová, kat.č. 331013

octan sodný trihydrát, kat. č. 30695

síran amonný, kat. č. 30785

Linde Gas (ČR): dusík stlačený

dusík kapalný

oxid uhličitý potravinářský

MP Biomedicals (USA): kyselina ribonukleová ve formě sodné soli (RNA), kat. č. 102927

bovinní pankreatická ribonukleáza A (RNáza A) (70 Kunitz units/mg) , kat. č. 193980
P-lab (ČR): dihydrogen fosforečnan draselný, kat. č. D02101
ethylalkohol, kat. č. E02301
Penta (ČR): kyselina octová, kat. č. 100495
Serva (Německo): akrylamid, kat. č. 10674
amoniumpersulfát (APS), kat. č. 13375
dimethylsulfoxid (DMSO), kat. č. 20385
dodecylsulfát sodný (SDS), kat. č. 20763
hovězí sérový albumin (BSA), kat. č. 01094
kyselina ethylendiamintetraoctová ve formě dvojsodné soli (Na₂EDTA), kat. č. 11280.02
modř toluidinová, kat. č. 36693.02
N, N'-methylenbisakrylamid (Bis), kat. č. 29195
N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), kat. č. 5923
Shearwater (USA): fluorescein-5-izothiokyanát-polyethylenglykol-N-succinimidyl propionát,
kat. č. 1K4M0H02
Sigma (USA): 2-merkptoethanol, kat. č. M6250
Dalton Mark VII-L (M.W. 14 000 – 66 000), kat. č. SDS7-1VL
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), kat. č. P7626
glycin, kat. č. G7126
močovina, kat. č. U-5128
pepstatin A, kat. č. P-4265
(poly)vinylnpyrrolidon (PVP), kat. č. P6755

4.3. Izolace neutrálních RNáz ze senescentních pšeničných listů

4.3.1. Příprava buněčného extraktu

Senescentní pšeničné listy, uchované při – 80 °C, byly nejprve rozstříhány na kousky o velikosti zhruba 1 x 1 cm. Poté byl k rostlinné tkáni přidán (poly)vinylnpyrrolidon v množství 15 g na 100 g rostlinné tkáně. Tkáň byla za stálého ochlazování tekutým dusíkem homogenizována v pufru A (10 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA a 1 mM PMSF) pomocí dispergenčního zařízení T18 Basic Ultra – Turrax firmy IKA. Na každých 50 g rostlinné tkáně bylo použito 300 ml pufru A. Výsledná směs byla přefiltrována přes syntetické mlynářské

hedvábí (velikost pórů 100 μm) (Chang a Gallie, 1997). Nerozpustné nečistoty byly odstraněny centrifugací při 3960 g a 2 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.

4.3.2. Srážení síranem amonným

Proteinová frakce byla z hrubého extraktu vysrážena 40% síranem amonným a odstraněna centrifugací při 3960 g a 2 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Kyselý RNázy byly získány ve sraženině při srážení 60 % saturace síranu amonného. Sraženina byla od extraktu oddělena centrifugací při 3960 g a 2 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Poté byla promyta saturačním roztokem síranu amonného, zahuštěna centrifugací za stejných podmínek a zamražena při -20 $^{\circ}\text{C}$. Po srážení 80 % saturace síranu amonného a centrifugací při 3960 g a 2 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut byla získána sraženina obsahující neutrální RNázy (Chang a Gallie, 1997). Sraženina byla rozpuštěna v pufru A a zbavena nerozpustných nečistot centrifugací ve dvou cyklech při 3960 g a 2 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.

Tab. 4.1. Množství síranu amonného potřebné pro přípravu roztoků
(Káš *et al.*, 2006)

Výsledná koncentrace síranu amonného (% saturace při 0 $^{\circ}\text{C}$)

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
g pevného síranu amonného na 100 ml roztoku																		
	0	10,6	13,4	16,4	19,4	22,6	25,8	29,1	32,6	36,1	39,8	43,6	47,6	51,6	55,9	60,3	65,0	69,7
	5	7,9	10,8	13,7	16,6	19,7	22,9	26,2	29,6	33,1	36,8	40,5	44,4	48,4	52,6	57,0	61,5	66,2
	10	5,3	8,1	10,9	13,9	16,9	20,0	23,3	26,6	30,1	33,7	37,4	41,2	45,2	49,3	53,6	58,1	62,7
	15	2,6	5,4	8,2	11,1	14,1	17,2	20,4	23,7	27,1	30,6	34,3	38,1	42,0	46,0	50,3	54,7	59,2
	20	0	2,7	5,5	8,3	11,3	14,3	17,5	20,7	24,1	27,6	31,2	34,9	38,7	42,7	46,9	51,2	55,7
Výchozí koncentrace síranu amonného	25		0	2,7	5,6	8,4	11,3	14,6	17,9	21,1	24,5	28,0	31,7	35,5	39,5	43,6	47,8	52,2
	30			0	2,8	5,6	8,6	11,7	14,8	18,1	21,4	24,9	28,5	32,3	36,2	40,2	44,5	48,8
	35				0	2,8	5,7	8,7	11,8	15,1	18,4	21,8	25,4	29,1	32,9	36,9	41,0	45,3
	40					0	2,9	5,8	8,9	12,0	15,3	18,7	22,2	25,8	29,6	33,5	37,6	41,8
	45						0	2,9	5,9	9,0	12,3	15,6	19,0	22,6	26,3	30,2	34,2	38,3
50							0	3,0	6,0	9,2	12,5	15,9	19,4	23,0	26,8	30,8	34,8	
55								0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,5	27,3	31,3	
60									0	3,1	6,2	9,5	12,9	16,4	20,1	23,9	27,9	
65										0	3,1	6,3	9,7	13,2	16,8	20,5	24,4	
70											0	3,2	6,5	9,9	13,4	17,1	20,9	

4.4. Purifikace neutrálních RNáz

4.4.1. Centrifugace

Extrakt neutrálních RNáz byl promyt a zahuštěn filtrací přes jednoúčelový ultrafiltr Millipore, model Centriplus YM – 3 s membránou 3000 MWCO. Filtrace probíhala centrifugačně v šesti cyklech po 5 – 9 hodinách při 3 000 g a 2 °C. Extrakt byl promýván pufrům A s 2 mM PMSF.

4.4.2. Chromatografie na iontoměničích

Analýza extraktu neutrálních RNáz probíhala na přístroji Econo-Syst firmy Bio-Rad (USA) za laboratorní teploty. Před aplikací vzorku byl chromatografický sloupec promyt pufrům A s 1,5 mM PMSF (Chang a Gallie, 1997). Jednotlivé frakce byly jímány v objemu 50 ml. Do doby než, byly dále charakterizovány, byly uchovány při –20 °C.

Podmínky:

stacionární fáze	DEAE-Sepharose Fast Flow
mobilní fáze	1. pufr A 2. 0,5 M KCl + pufru A s 1,5 mM PMSF (nejprve 150 ml 1. mobilní fáze, poté 700 ml gradientu a pak 150 ml 2. mobilní fáze)
nástřík	32 ml
průtok	2 ml/min
citlivost	0,5
detekce	při vlnové délce 280 nm

4.4.3. Gelová permeační chromatografie (GPC)

Vzorek pro analýzu na GPC byl vybrán po elektroforetickém rozdělení frakcí z předchozí chromatografie a po otestování jejich RNázové aktivity *in vitro*.

Těsně před analýzou na GPC byl vzorek zahuštěn pomocí ultrafiltrační membrány Millipore 5 000 MWCO. Ultrafiltrace probíhala za chladu v přítomnosti stlačeného dusíku pod tlakem 0,2 MPa. 43 ml frakce 9 bylo zahuštěno na 6 ml. Chromatografický sloupec byl před aplikací vzorku promyt 0,05 M Tris s 2 mM PMSF, 1 μM pepstatinem A a 2 mM 2-merkptoethanolem. Jednotlivé frakce byly jímány v objemu 10 - 45 ml. Analýza probíhala při laboratorní teplotě. Do doby než byly dále charakterizovány, byly uchovány při –20 °C.

Podmínky:

stacionární fáze	Sephacryl S-100
mobilitní fáze	0,05 M Tris + 2 mM PMSF + 1 μM pepstatinem A + 2 mM 2-merkaptoethanol
nástřik	5 ml
průtok	1,56 ml/min
citlivost	0,2
detekce	při vlnové délce 280 nm

Absorbance jednotlivých frakcí byla proměřena na spektrofotometru Cecil CE2021 (Anglie) při 280 nm. Z naměřených hodnot byla poté stanovena koncentrace bílkovin podle vzorce (4.1).

$$c = \frac{(A - A_0)}{1,4} \quad [\text{mg} / \text{ml}] \quad (4.1)$$

4.4.4. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Elektroforéza v přítomnosti SDS byla prováděna na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 15% separačního a 5% zaostřovacího gelu. Pro elektroforézu byla použita aparatura Mini-Protean firmy Bio-Rad (USA). Elektromigrace probíhala za chladu ve vertikálním uspořádání při pH=8,3 a konstantním napětí 200 V po dobu 60-130 minut.

Do kádinky bylo nejprve odpipetováno příslušné množství prvních čtyř složek separačního gelu (viz níže). Po promíchání bylo přidáno dané množství dalších dvou složek, roztok byl opět promíchán a nalit mezi skla elektroforetické aparatury. Ve vrchní části byl ponechán prostor pro zaostřovací gel. Separační gel byl překryt vrstvou destilované vody a ponechán 30-60 minut polymerovat. Po polymeraci byla vrstva vody odsáta. Zaostřovací gel byl připraven postupem popsáním výše a nalit přímo na gel separační. Do gelu byla ihned po nalití zasunuta polymerační hřebenová šablona. Zaostřovací gel polymeroval 30-60 minut. Poté byl hřebínek opatrně vyjmut. Před aplikací vzorků byl gel v aparatuře přelit elektrodovým roztokem. Vzorky byly nejprve smíchány s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrům v poměru 1:1, zahřáty na 60 °C po dobu 3 - 4 minut a centrifugovány při 9 300 g a laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Poté bylo požadované množství vzorku aplikováno pod hladinu elektrodového roztoku. Současně se vzorky byl aplikován velikostní marker Dalton Mark VII-L v množství 5 μl na důlek. Velikostní marker byl před aplikací do důlku zahřát na 100 °C po dobu 1 minuty a centrifugován za podmínek uvedených výše.

Po skončení elektroforézy byl gel promyt ve 20% (w/v) kyselině trichloroctové po dobu 20 minut. Poté byl několikrát propláchnut v destilované vodě a obarven barvicím roztokem (0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 25 ml kyseliny octové, 475 ml destilované vody). Po obarvení byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku (25 ml kyseliny octové a 475 ml destilované vody). Odbarvené gely byly naskenovány na přístroji Astra 4000U a zpracovány programem Elfo Man 2.5.

Chemické složení roztoků:

15% separační gel:

destilovaná voda	2,3 ml
30% akrylamidový mix	5,0 ml
1,5 M Tris-báze (pH 8,8)	2,5 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml
10% (w/v) APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

5% zaostřovací gel:

destilovaná voda	3,4 ml
30% akrylamidový mix	0,83 ml
1,5 M Tris-báze (pH 8,8)	0,63 ml
10% (w/v) SDS	0,05 ml
10% (w/v) APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

elektrodový roztok, pH 8,3:

25 mM Tris-báze
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

2x koncentrovaný vzorkový pufr:

126 mM Tris-HCl, pH 6,8
20% (v/v) glycerin
4% (w/v) SDS
0,005% (w/v) bromfenolová modř

4.5. Testování aktivity neutrálních RNáz *in vitro*

4.5.1. Test ribonukleázové aktivity

Do zkumavek bylo napipetováno 25 μ l extraktu RNáz a 250 μ l 50 mM TRIS – HCl pH 7,4 s 0,4 mg/ml kvasničné RNA a 0,1 mg/ml BSA. U negativní kontroly bylo napipetováno 275 μ l roztoku TRIS – HCl, u kontroly pozitivní byla místo extraktu RNáz použita RNáza A. Směs byla poté promíchána a inkubována v inkubátoru Robbins Scientific

2000 (USA) při 30 °C po dobu 1 hodiny. Po vyjmutí z inkubátoru bylo ke směsi napipetováno 25 µl 3 M octanu sodného pH 5,5 a 688 µl chladného 96% (v/v) ethanolu. Směs byla opět promíchána a inkubována při –20 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla směs centrifugována při 9 300 g a 4 °C po dobu 10 minut. Ze zkumavek byl vylit supernatant a sraženina nezreagované RNA byla promyta 1 ml 75% (v/v) ethanolu. Sraženina byla promyta centrifugačně při 9 300 g a 4 °C po dobu 10 minut. Poté byla sedimentační roztavena v 1 ml 0.5% (w/v) SDS a promíchána. Absorbance vzorku byla proměřena na spektrofotometru Cecil CE2021 při 260 nm.

4.5.2. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS a kvasničné dsRNA

Elektroforéza s 1 mg kvasničné dsRNA na 1 ml separačního gelu probíhala za podmínek a ve složení popsaném v kapitole 4.4.4.

Po skončení elektroforézy byl z gelu odkrojen velikostní marker, který byl poté obarven postupem popsaným v kapitole 4.4.4. Gel byl promyt ve 25% (v/v) isopropylalkoholu v 10 mM Tris-HCl pH 7,0 po dobu 30 minut. Poté byl několikrát propláchnut v 2 µM ZnCl₂ v 10mM Tris-HCl pH 7,0 a inkubován ve 100mM Tris-HCl pH 7,0 při 50 °C po dobu 2 hodin. Inkubace probíhala v inkubátoru Robbins Scientific 2000. Obarven byl v 0,2% (w/v) toluidinové modři v 10 mM Tris-HCl pH 7,0 po dobu minimálně 10 minut (Liao, 1995). Po obarvení byl gel odbarven v destilované vodě. Odbarvené gely byly naskenovány na přístroji Astra 4000U a zpracovány programem Elfo Man 2.5.

4.6. Konjugace neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaných preparátem

Extrakt neutrálních RNáz byl nejprve převeden do fosfátového pufru (50 mM KH₂PO₄, pH 7,5) a zahuštěn pomocí ultrafiltrační membrány Millipore 5 000 MWCO. Ultrafiltrace probíhala za chladu v přítomnosti stlačeného dusíku pod tlakem 0,2 MPa. 34 ml frakce 4 z analýzy na GPC bylo zahuštěno na 2,7 ml. Poté byl v dusíkové atmosféře ke vzorku přidán PEG – fluoresceinovaný preparát (Fluor-SPA-PEG-5000). Na 1 ml roztoku bylo použito 8,7 mg PEG – fluoresceinovaného preparátu. Poté byla směs intenzivně míchána po dobu 70 minut. Reakční směs byla přepipetována do filtru Millipore, model Centriplus YM – 10 s membránou 10 000 MWCO. Směs byla poté centrifugačně promyta v devíti cyklech po 1 – 3 hodinách při 3 000 g a 4 °C. Každý 1 ml reakční směsi byl promyt 15,8 ml PBS pH 7,4. V průběhu promytí došlo k oddělení RNáz konjugovaných s PEG – fluoresceinovaným

preparátem, které zůstaly nad filtrem, a nekonjugovaných složek, které filtrem prošly (Škvor, 2006). Po každém cyklu byla proměřena absorbance nekonjugované složky na spektrofotometru Cecil CE2021 při 280 a 495 nm. Pro kontrolu stupně promytí bylo z naměřených hodnot spočítáno procentuální zastoupení bílkovin v roztoku podle vzorce (4.2) a poměr PEG – fluoresceinovaného preparátu a bílkovin z rovnice (4.3).

$$\% \text{ bílkovin} = \frac{T_{280} - 0,35 \cdot E_{495}}{14} \quad (4.2)$$

$$\frac{\text{PEG} - \text{FITC}}{\text{bílkovina}} = \frac{2,87 \cdot E_{495}}{E_{280} - 0,35 \cdot E_{495}} \quad [\text{mol}] \quad (4.3)$$

4.7. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz in vivo

Lidský prostatický karcinom LNCaP a duktální pankreatický adenokarcinom PaTu 8902 byly myším transplantovány subkutánně na pravý bok. Preparát RNáz byl aplikován 5 imunodeficientním nu/nu myším i. v. v dávce 100 μl , jakmile velikost nádoru dosáhla přibližně 3 x 3 mm. Myši s duktálním pankreatickým adenokarcinomem byly usmrceny v intervalech 2, 6, 24 a 120 hodin. Myš s lidským prostatickým karcinomem byla usmrcena 72 hodin od aplikace preparátu. Kontrolnímu jedinci preparát injikován nebyl.

Orgány byly nejprve zamrazeny v kapalném dusíku a uchovány v mrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly postupně připraveny kryorezy na mikrotonu Leica CM3050. Krájení probíhalo při teplotě vzorku $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotě komory $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Řezy o tloušťce 6-18 μm (podle typu tkáně) byly samovolně přichyceny na podložní sklo a poté byla v preparátech zjišťována přítomnost FITC konjugátů pomocí fluorescenčního mikroskopu. K pozorování preparátů byl použit mikroskop Jenalumar SH 250 s excitačním filtrem 360-370 nm, emisním filtrem 420-460 nm a dichromatickým filtrem 400 nm. Pro zvětšení byl použit objektiv se zvětšením 25x. Preparáty byly fotografovány fotoaparátem Leica DC 150 s použitím digitálního zoomu. Snímky byly upraveny v programu ZoomBrowser EX 5.5.

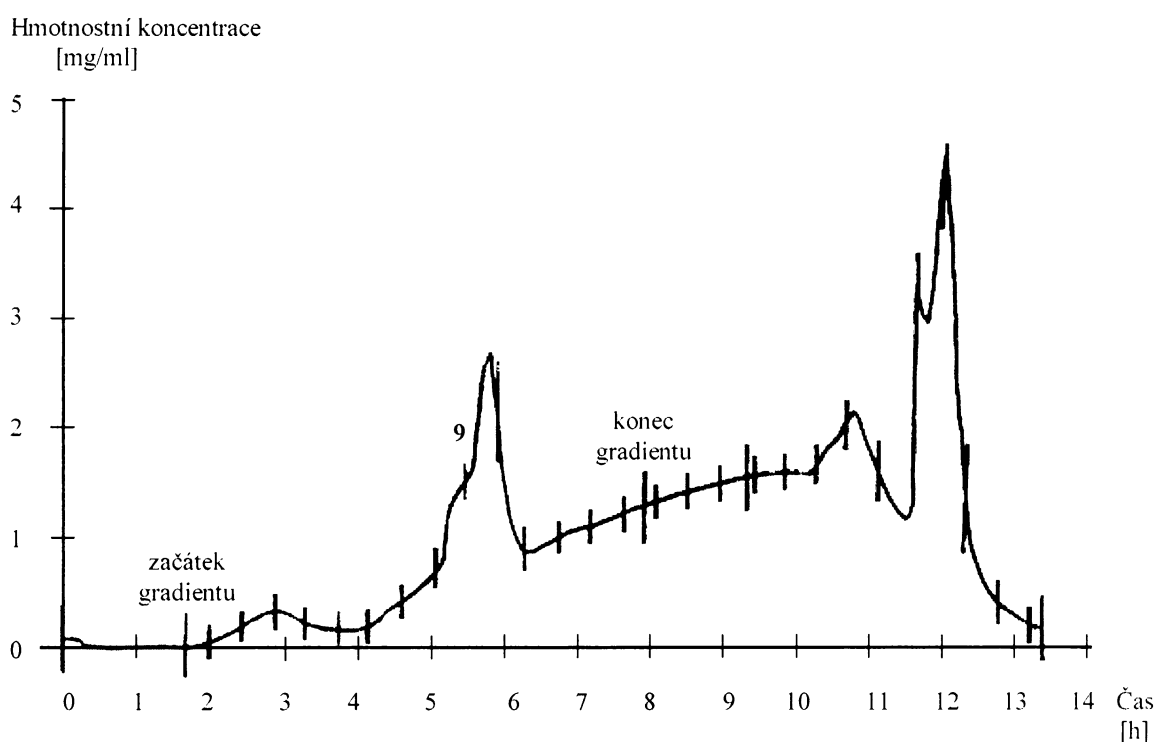
Krev a moč byly po odběru krátkodobě uchovány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly naředěny s PBS (3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,3 g KCl, 8 g NaCl doplněné do 1 l destilovanou vodou) pH 7,4 v poměru 1:1, 1:3, 1:4, 1:9 a 1:19. Vzorky byly proměřeny

fluorometrem Tecan Infinite 200 a zpracovány softwarem Magellan Standard verze 6.1 na Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace a purifikace neutrálních RNáz

K izolaci a purifikaci neutrálních RNáz z rostlinného extraktu byla použita chromatografie na iontoměničích za podmínek uvedených v kapitole 4.4.2. Frakce, která byla později dále charakterizována, byla eluována v elučním objemu 660 ml (průtoková rychlost: 2 ml/min) (viz Obr. 5.1). Tato frakce, označená číslem 9, byla jímána v objemu 50 ml.



Obr. 5.1. Chromatogram analýzy extraktu neutrálních RNáz

Vyznačená frakce byla použita pro další purifikaci neutrálních RNáz.

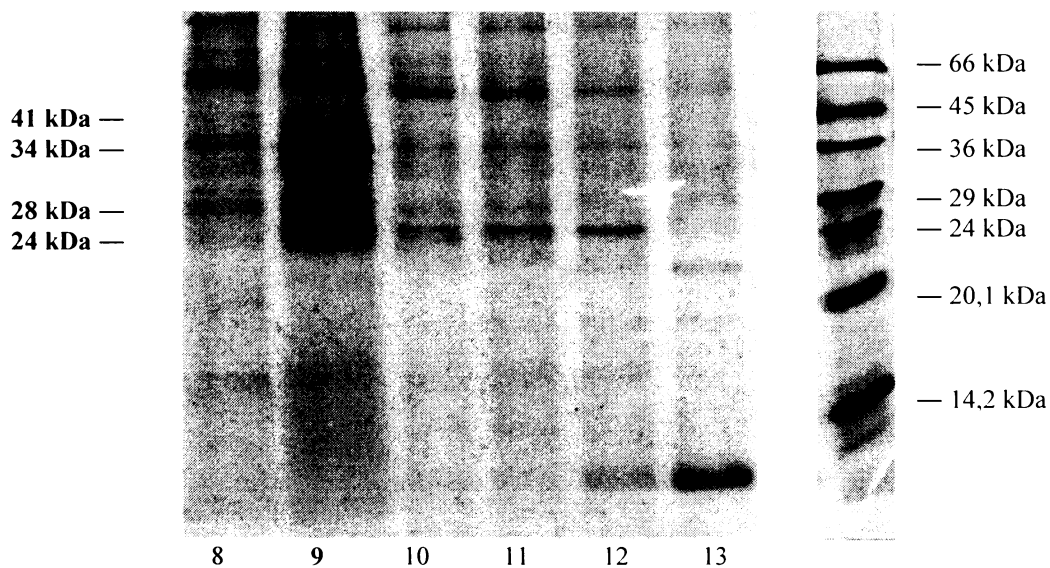
U jednotlivých frakcí byla otestována RNázová aktivita pomocí testu ribonukleázové aktivity (viz kapitola 4.5.1.). Hodnoty absorbancí jednotlivých frakcí při 260 nm jsou uvedeny v Tab. 5.1 současně s hodnotami pro pozitivní a negativní kontrolu. RNázová aktivita jednotlivých frakcí byla tímto způsobem porovnána s bovinní pankreatickou ribonukleázou A, jakožto pozitivní kontrolou, a negativní kontrolou, ve které RNáza přítomna nebyla. Na základě těchto dat byly vybrány frakce, které byly dále charakterizovány, a to pomocí SDS-PAGE a SDS-PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA.

Tab. 5.1. Hodnoty absorbancí jednotlivých frakcí při 260 nm
 Vyznačená frakce byla použita pro další purifikaci neutrálních RNáz.

Číslo frakce	Absorbance při 260 nm
1	1,366
2	1,090
3	0,999
4	1,050
5	1,043
6	0,834
7	0,545
8	0,260
9	0,096
10	0,088
11	0,075
12	0,082
13	0,092
14	0,145
15	0,212
16	0,324
17	0,472
18	0,587
19	0,745
20	0,731
21	0,857
22	1,099
23	0,813
24	1,028
25	1,419
26	1,202
Pozitivní kontrola	0,462
Negativní kontrola	1,610

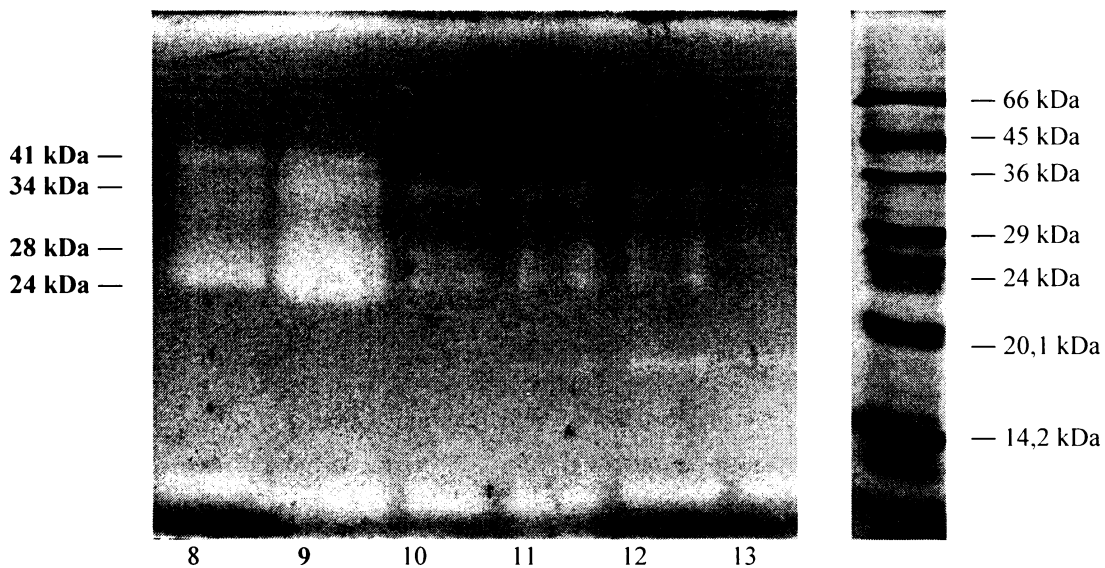
SDS-PAGE probíhala za podmínek a ve složení uvedeném v kapitole 4.4.4. . Na gel byly aplikovány vzorky vybraných frakcí v množství 30 μ l na důlek. Za podmínek a ve složení uvedeném v kapitole 4.5.2. probíhala současně SDS-PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA. Pro účel testování aktivity neutrálních RNáz *in vitro* bylo na gel aplikováno 15 μ l vzorku. Elektromigrace probíhala po dobu 70 minut.

Na základě elektroforetického rozdělení frakcí (viz Obr. 5.2) a po otestování jejich ribonukleázové aktivity pomocí SDS-PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA (viz Obr. 5.3) byla identifikována relativní molekulová hmotnost separovaných neutrálních RNáz. Pomocí programu Elfo Man 2.5. byly nalezeny 4 neutrální RNázy o relativní molekulové hmotnosti 24, 28, 34 a 41 kDa (viz Obr. 5.2 a 5.3).



Obr. 5.2. Elektroforetické rozdělení vybraných frakcí pomocí SDS-PAGE

Vyznačená frakce byla použita pro další purifikaci neutrálních RNáz.



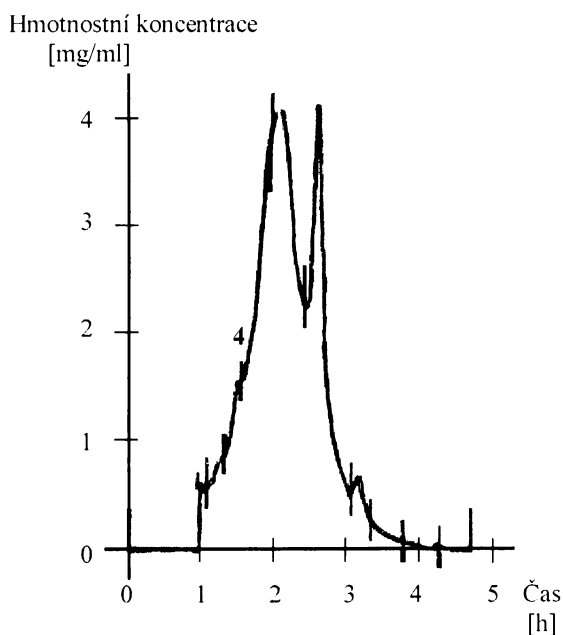
Obr. 5.3. Elektroforetické rozdělení vybraných frakcí pomocí SDS-PAGE v přítomnosti dsRNA

Vyznačená frakce byla použita pro další purifikaci neutrálních RNáz.

Po zhodnocení předchozích analýz byla pro další purifikaci neutrálních RNáz vybrána frakce 9. Jak ukazují Obr. 5.1 a 5.2 je v této frakci v porovnání s ostatními vysoká koncentrace separovaných enzymů. Z dat uvedených v Tab. 5.1 lze usuzovat i na vysokou ribonukleázovou aktivitu. Vysoká ribonukleázová aktivita byla také potvrzena pomocí SDS-

PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA (viz Obr. 5.3). Enzymy s ribonukleázovou aktivitou o relativní molekulové hmotnosti nižší než 20,1 kDa byly identifikovány jako fragmenty neutrálních RNáz (viz Obr. 5.3).

K purifikaci frakce 9 byla použita GPC za podmínek uvedených v kapitole 4.4.3. Frakce, která byla později konjugována s PEG-fluoresceinovaným preparátem, byla eluována v elučním objemu 150 ml (průtoková rychlost: 150 ml/min) (viz Obr. 5.4). Hodnoty absorbance jednotlivých frakcí při 280 nm jsou uvedeny v Tab. 5.2. Z těchto hodnot byla podle vzorce 4.1 vypočtena koncentrace bílkovin (viz Tab. 5.2). Jako slepé stanovení byl použit 0,05 M Tris s 2 mM PMSF, 1 μ M pepstatinem A a 2 mM 2-merkaptoethanolem.



Obr. 5.1. Chromatogram purifikace frakce 9

Vyznačená frakce byla použita pro konjugaci neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem.

Tab. 5.2. Stanovení koncentrace bílkovin v jednotlivých frakcích

Vyznačená frakce byla použita pro konjugaci neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem.

Číslo frakce	Absorbance při 280 nm	c bílkovin [mg/ml]
1	0,165	0,092
2	0,193	0,112
3	0,298	0,187
4	0,481	0,318
5	0,628	0,423
6	0,569	0,381
7	0,281	0,175
8	0,158	0,087
9	0,106	0,050
10	0,089	0,038
Slepé stanovení	0,036	

U jednotlivých frakcí byla testována RNázová aktivita pomocí testu ribonukleázové aktivity (viz kapitola 4.5.1.). Před provedením testu byly vzorky vybraných frakcí zahuštěny filtrem Microcon Ultracel YM-3 s membránou 3000 MWCO od firmy Millipore. Filtrace probíhala při 4 °C a 12 000 g. 750 µl frakce 4 bylo zahuštěno na 100 µl.

Hodnoty absorbancí jednotlivých frakcí při 260 nm jsou uvedeny v Tab. 5.3 současně s hodnotami pro pozitivní a negativní kontrolu. RNázová aktivita jednotlivých frakcí byla porovnána s oběma kontrolami stejným způsobem jako v případě předchozí chromatografie na iontoměničích. Na základě těchto dat byly vybrány frakce, které byly dále charakterizovány pomocí SDS-PAGE.

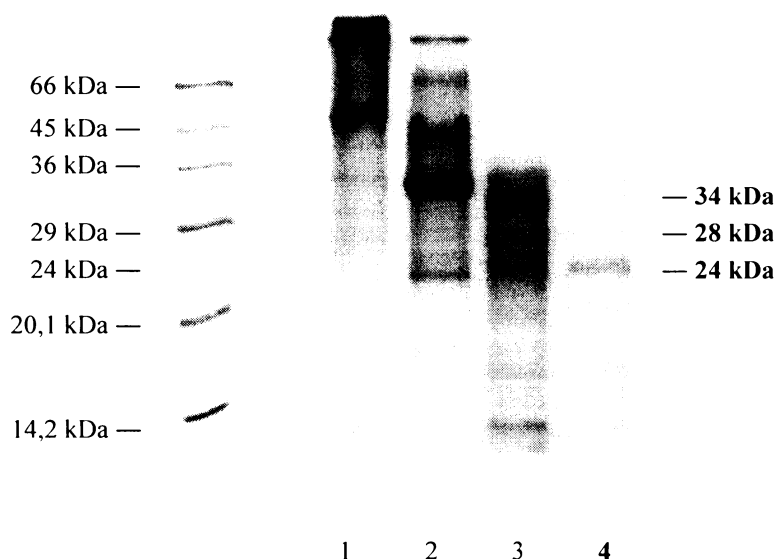
Tab. 5.3. Hodnoty absorbancí jednotlivých frakcí při 260 nm

Vyznačená frakce byla použita pro konjugaci neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem.

Číslo frakce	Absorbance při 260 nm
1	1,069
2	0,137
3	0,071
4	0,075
5	0,557
6	1,229
7	1,304
8	1,310
9	1,309
10	1,299
Pozitivní kontrola	0,324
Negativní kontrola	1,367

SDS-PAGE probíhala za podmínek a ve složení uvedeném v kapitole 4.4.4. . Před aplikací na gel byly vzorky vybraných frakcí zahuštěny stejným způsobem jako pro testování

ribonukleázové aktivity. Na gel byly aplikovány vzorky v množství 25 μ l na důlek (vzorek: 2x koncentrovaný vzorkový pufr v poměru 3:2). Elektromigrace probíhala po dobu 130 minut. Elektroforetické rozdělení vybraných frakcí je zobrazeno na Obr. 5.5.



Obr. 5.5. Elektroforetické rozdělení vybraných frakcí pomocí SDS-PAGE

Vyznačená frakce byla použita pro konjugaci neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem.

Na základě uvedených analýz byla pro konjugaci neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem vybrána frakce 4. Jak je patrné z Obr. 5.5, obsahuje tato frakce neutrální RNázy o relativní molekulové hmotnosti 24, 28 a 34 kDa. Enzymy o relativní molekulové hmotnosti nižší než 20,1 kDa, které jsou v malém množství ve frakci přítomny, byly identifikovány jako fragmenty neutrálních RNáz (viz Obr. 5.5). Zachována zůstala i ribonukleázová aktivita (viz Tab. 5.3).

5.2 Konjugace neutrálních RNáz s PEG-fluoresceinovaným preparátem

Vzorek neutrálních RNáz byl před konjugací s PEG-fluoresceinovaným preparátem zahuštěn za podmínek uvedených v kapitole 4.6. Koncentrace vzorku byla podle vzorce 4.1 stanovena na 0,964 mg/ml. Po každém cyklu promytí byla proměřena absorbance nekonjugovaných složek při 260 a 495 nm (viz Tab. 5.4). Z uvedených hodnot bylo pro kontrolu stupně promytí vypočteno procentuální zastoupení bílkovin (viz Tab. 5.5). Pro porovnání jsou v Tab. 5.4 a 5.5 rovněž uvedeny hodnoty RNáz konjugovaných s PEG-fluoresceinovaným preparátem (retentát).

Tab. 5.4. Hodnoty absorbancí po jednotlivých cyklech promytí při 260 nm a 495 nm

Vzorek	Absorbance při 280 nm	Absorbance při 495 nm
Filtrát 1	1,460	1,240
Filtrát 2	1,398	1,198
Filtrát 3	1,094	1,116
Filtrát 4	1,078	1,168
Filtrát 5	0,781	1,164
Filtrát 6	0,617	1,134
Filtrát 7	0,984	1,218
Filtrát 8	1,096	1,196
Filtrát 9	0,612	1,132
Retentát	1,400	1,184

Tab. 5.5. Procentuální zastoupení bílkovin jako kontrola promytí

Vzorek	% bílkovin
Filtrát 1	0,073
Filtrát 2	0,070
Filtrát 3	0,050
Filtrát 4	0,048
Filtrát 5	0,027
Filtrát 6	0,016
Filtrát 7	0,040
Filtrát 8	0,048
Filtrát 9	0,015
Retentát	0,070

Pro kontrolu aktivity stabilizovaných forem RNáz byl proveden test ribonukleázové aktivity. Hodnoty absorbancí při 260 nm jsou uvedeny v Tab. 5.6. RNázová aktivita vzorku byla porovnána s oběma kontrolami stejným způsobem jako v předchozím případěch. Z hodnot uvedených v tab. 5.6 je patrné, že aktivita stabilizovaných forem RNáz zůstala zachována.

Tab. 5.6. Hodnoty absorbancí jednotlivých frakcí při 260 nm

Číslo frakce	Absorbance při 260 nm
Retentát	0,780
Pozitivní kontrola	0,377
Negativní kontrola	1,383

5.3. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz *in vivo*

5.3.1. Krev CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

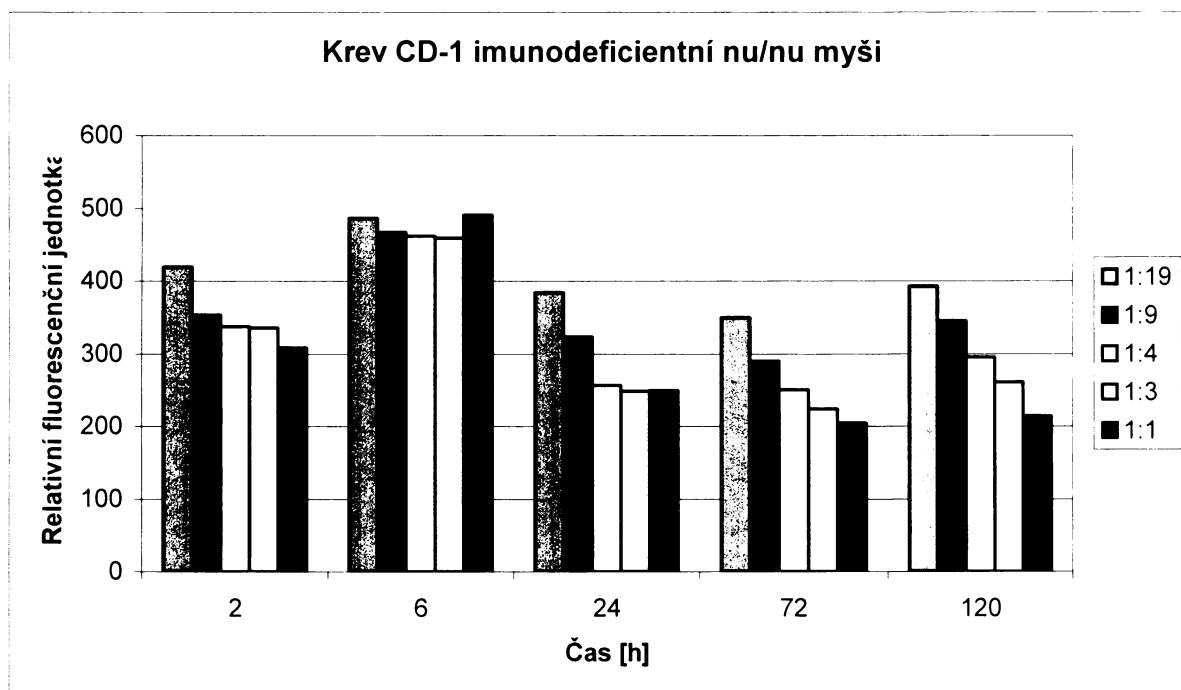
Krev CD-1 imunodeficientní nu/nu myši byla zpracována způsobem uvedeným v kapitole 4.7. Hodnoty uvedené v Tab. 5.7 a na Obr. 5.6 srovnávají intenzitu

fluorescence v intervalech 2, 6, 24, 72 a 120 hodin po i.v. aplikaci preparátu stabilizovaných RNáz. Pro porovnání jsou v Tab. 5.7 uvedeny hodnoty fluorescence krve u kontrolního jedince. Vznik intenzity fluorescence byl pozorován již v intervalu 2 hodin po i.v. aplikaci preparátu (viz Tab. 5.7). Vrcholu intenzity fluorescence bylo dosaženo v intervalu 6 hodin. V následujících intervalech intenzita fluorescence pozvolna klesala (viz Obr.5.6), až dosáhla hodnot srovnatelných s hodnotami kontrolního jedince (viz Tab. 5.7). Jak je patrné z Obr. 5.6, k mírnému zvýšení intenzity fluorescence došlo opět v posledním sledovaném intervalu.

Tab. 5.7. Hodnoty fluorescence krve po i.v. aplikaci 100 μ l preparátu stabilizovaných RNáz

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v relativních fluorescenčních jednotkách.

Poměr vzorek:PBS	Kontrolní jedinec	Čas [h]				
		2	6	24	72	120
1:19	306,00	419,75	486,50	384,25	349,50	392,75
1:9	240,50	353,00	467,00	323,75	290,00	345,50
1:4	285,00	337,50	461,75	256,75	250,25	294,75
1:2	271,75	335,75	459,25	248,50	223,75	261,00
1:1	225,00	308,75	491,00	249,75	204,75	214,25



Obr. 5.6. Porovnání intenzity fluorescence krve po i.v. aplikaci 100 μ l preparátu stabilizovaných RNáz

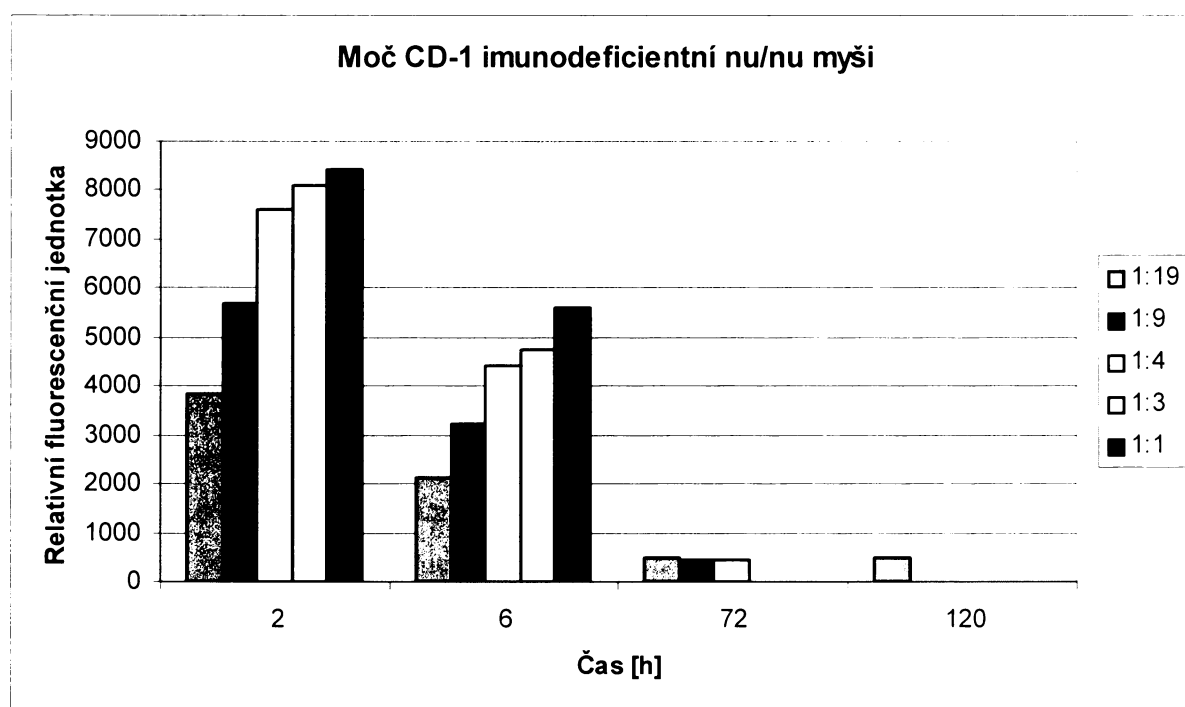
5.3.2. Moč CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

Moč CD-1 imunodeficientní nu/nu myši byla zpracována způsobem uvedeným v kapitole 4.7. Hodnoty uvedené v Tab. 5.8 a na Obr. 5.7 srovnávají intenzitu

fluorescence v intervalech 2, 6, 24, 72 a 120 hodin po i.v. aplikaci preparátu stabilizovaných RNáz. Pro porovnání jsou v Tab. 5.8 uvedeny hodnoty fluorescence moči u kontrolního jedince. Vrchol intenzity fluorescence byl pozorován již v prvním sledovaném intervalu (viz Tab. 5.8). V následujících intervalech intenzita fluorescence strmě klesala, mírný vzrůst intenzity byl pozorován v intervalu 120 hodin (viz Obr. 5.7). Ve všech sledovaných intervalech byly hodnoty fluorescence oproti hodnotám kontrolního jedince zvýšené (viz tab. 5.8).

Tab. 5.8. Hodnoty fluorescence moči po i.v. aplikaci 100 μ l preparátu stabilizovaných RNáz
Naměřené hodnoty jsou uvedeny v relativních fluorescenčních jednotkách.

Poměr vzorek:PBS	Kontrolní jedinec	Čas [h]			
		2	6	72	120
1:19	356,75	3861,00	2135,00	476,75	480,25
1:9	417,00	5704,80	3221,50	432,00	
1:4	428,50	7590,50	4410,00	432,75	
1:2		8087,50	4762,80		
1:1		8429,00	5595,80		



Obr. 5.7. Porovnání intenzity fluorescence moči po i.v. aplikaci 100 μ l preparátu stabilizovaných RNáz

5.3.3. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, stejně jako tkáň ostatních orgánů, byla zpracována způsobem uvedeným v kapitole 4.7. Rozdíly v intenzitě fluorescence

mikroskopických preparátů v jednotlivých časových intervalech jsou vyobrazeny na Obr. 5.8 až 5.13. V jaterní tkáni byl nárůst intenzity fluorescence zaznamenán již v prvním časovém intervalu po i.v. aplikaci preparátu stabilizovaných RNáz (viz Obr. 5.9). Vrcholu intenzity fluorescence bylo dosaženo v intervalu 24 hodin (viz Obr. 5.11). V následujících časových intervalech intenzita fluorescence strmě poklesla (viz Obr. 5.12 a 5.13).

5.3.4. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

Z důvodu značné autofluorescence kontrolní tkáně (viz Obr. 5.14) nebylo možné mikroskopické preparáty tkáně kosterního svalu v jednotlivých časových intervalech (viz Obr. 5.15 až 5.19) zhodnotit.

5.3.5. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V tkáni kůže bylo zvýšení intenzity fluorescence pozorováno již v prvním intervalu po i.v. aplikaci stabilizovaných RNáz (viz Obr. 5.21). V následujícím časovém intervalu zvýšená fluorescence přetrvávala (viz Obr. 5.22). Vrcholu intenzity fluorescence bylo dosaženo v intervalu 24 hodin od i.v. aplikace preparátu (viz Obr. 5.23). V posledních dvou časových intervalech byl zaznamenán mírný pokles (viz Obr. 5.24 a 5.25), ovšem míra fluorescence byla v porovnání s tkání kontrolního jedince (viz Obr. 5.20) zvýšená. Z Obr. 5.21 až 5.25 je patrné zvýšení intenzity fluorescence zejména v epidermis kůže, a to pravděpodobně v oblasti *stratum corneum* a *stratum basale*.

5.3.6. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V porovnání s tkání kontrolního jedince (viz Obr. 5.26) nedošlo v prvním časovém intervalu u tkáně ledvin k žádné změně (viz Obr. 5.27). Zvýšená míra fluorescence byla zaznamenána až v druhém a třetím intervalu (viz Obr. 5.28 až 5.29) po i.v. aplikaci preparátu. V posledních dvou intervalech nebylo zaznamenáno žádné zvýšení fluorescence (viz Obr. 5.30 a 5.31).

5.3.7. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V tkáni mozku bylo mírné zvýšení fluorescence zaznamenáno již v prvním časovém intervalu (viz Obr. 5.33). Mírně zvýšená fluorescence přetrvávala až do intervalu 72 hodin po i.v. aplikaci stabilizovaných RNáz (viz Obr. 5.34 až 5.26). V posledním sledovaném intervalu nebyla v porovnání s kontrolním jedincem zaznamenána žádná změna (viz Obr. 5.32 a 5.37).

5.3.8. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V nádorové tkáni byl vrchol intenzity fluorescence pozorován již v prvním sledovaném intervalu (viz Obr. 5.39). V následujících intervalech nebyla v porovnání s kontrolní tkání žádná fluorescence pozorována (viz Obr. 5.38 a Obr. 5.40 a 5.41). K mírnému zvýšení intenzity fluorescence došlo opět v posledních dvou časových intervalech (viz Obr. 5.42 a 5.43).

5.3.9. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

Vrcholu intenzity fluorescence bylo u plicní tkáně dosaženo již v prvním sledovaném intervalu (viz Obr. 5.45). V následujících třech časových intervalech bylo pozorováno značné snížení fluorescence (viz Obr. 5.46 až 5.48), ovšem v porovnání s tkání kontrolního jedince byla intenzita fluorescence větší (viz Obr. 5.44). V intervalu 120 hodin od i.v. aplikace preparátu došlo opět k mírnému zvýšení fluorescence (viz Obr. 5.49).

5.3.10. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V tkáni sleziny byla nejvyšší intenzita fluorescence zaznamenána v intervalu 2 hodin od i.v. aplikace preparátu (viz Obr. 5.51). V dalších časových intervalech došlo k pozvolnému snížení fluorescence (viz Obr. 5.52 až 5.54). V posledním sledovaném intervalu byla míra fluorescence (viz Obr. 5.55) srovnatelná s intenzitou fluorescence tkání kontrolního jedince (viz Obr. 5.50).

5.3.11. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

Z důvodu značné autofluorescence kontrolní tkáně (viz Obr. 5.56) nebylo možné mikroskopické preparáty srdeční tkáně v jednotlivých časových intervalech (viz Obr. 5.56 až 5.61) zhodnotit.

5.3.12. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

V tkáni tenkého střeva bylo výrazné zvýšení intenzity fluorescence pozorováno pouze v prvním sledovaném intervalu (viz Obr. 5.63). V intervalech následujících odpovídala míra fluorescence jednotlivých mikroskopických preparátů (viz Obr. 5.64 až 5.67) fluorescenci kontrolní tkáně (viz Obr. 5.62).

5.3.13. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

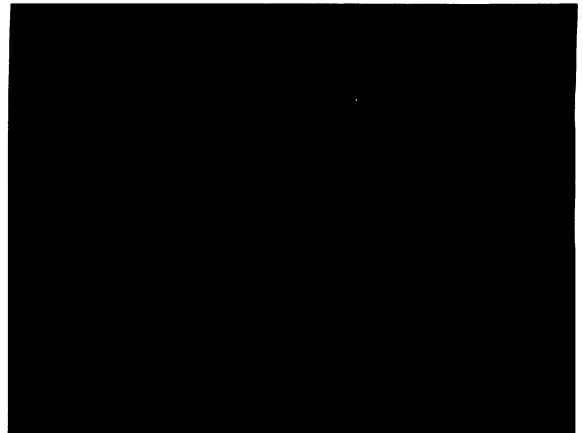
K výraznému zvýšení intenzity fluorescence došlo v tkáni tlustého střeva již v prvním časovém intervalu (viz Obr. 5.69). V následujících intervalech bylo sice pozorováno mírné snížení fluorescence (viz Obr. 5.70 až 5.73), ovšem v porovnání s kontrolní tkání (viz Obr. 5.68) byla intenzita fluorescence ve všech mikroskopických preparátech značně zvýšená.

5.3.14. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

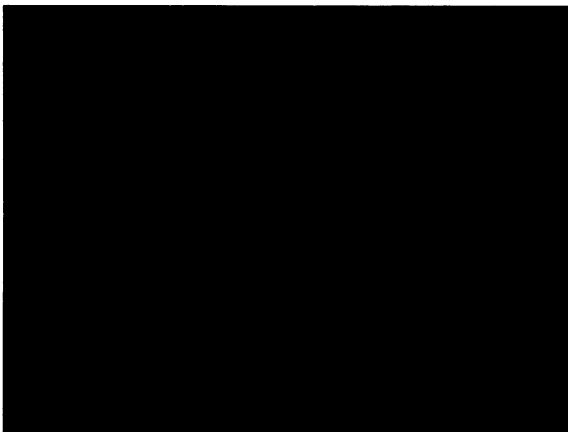
V tkáni varlete bylo mírné zvýšení fluorescence pozorováno pouze v prvním sledovaném intervalu (viz Obr. 5.75). V následujících časových intervalech byla míra intenzity fluorescence (viz Obr. 5.76 až 5.79) srovnatelná s kontrolní tkání (viz Obr. 5.74).

Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

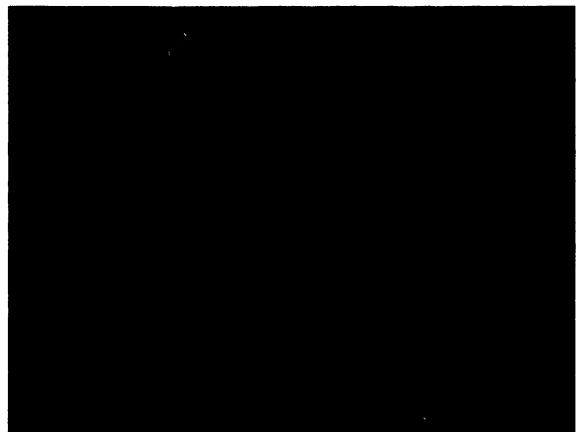
Obr. 5.8. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



Obr. 5.9. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



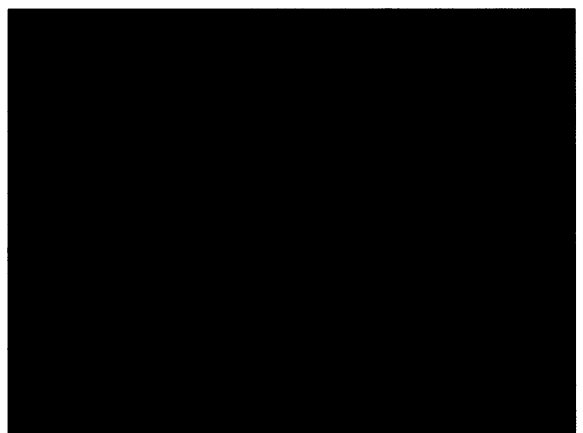
Obr. 5.10. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



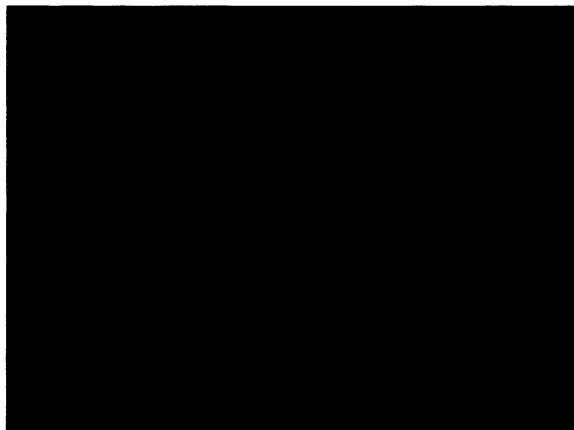
Obr. 5.11. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



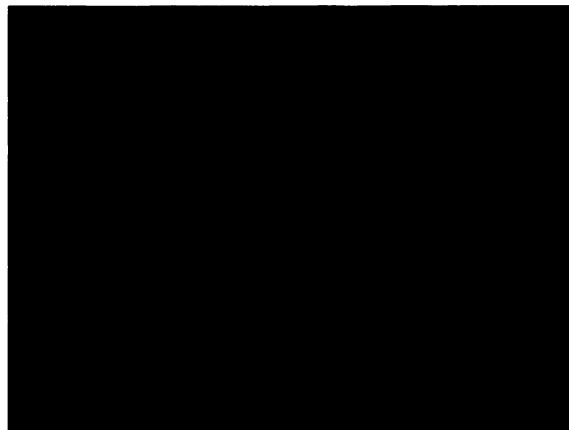
Obr. 5.12. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



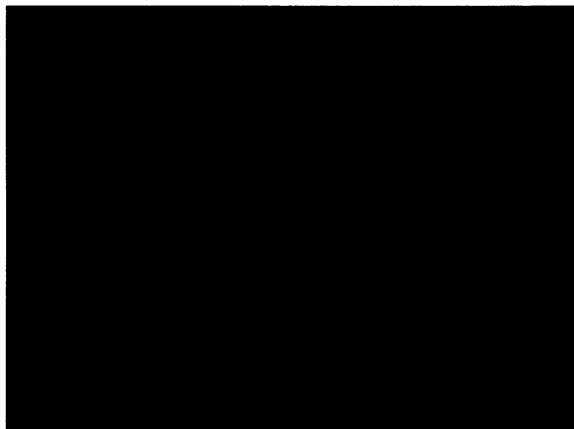
Obr. 5.13. Jaterní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

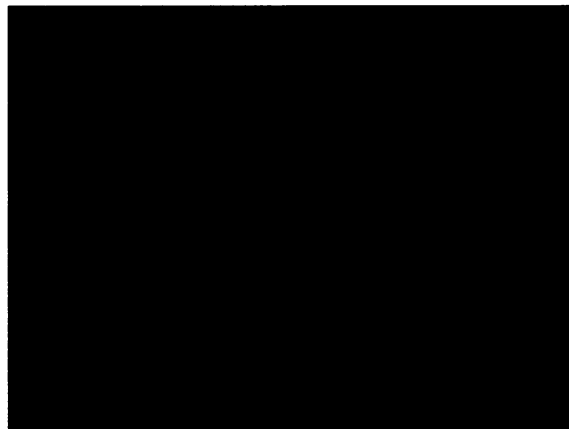
Obr. 5.14. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



Obr. 5.15. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



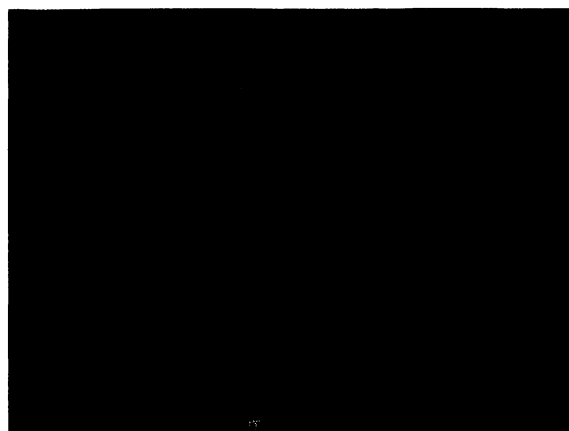
Obr. 5.16. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.17. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

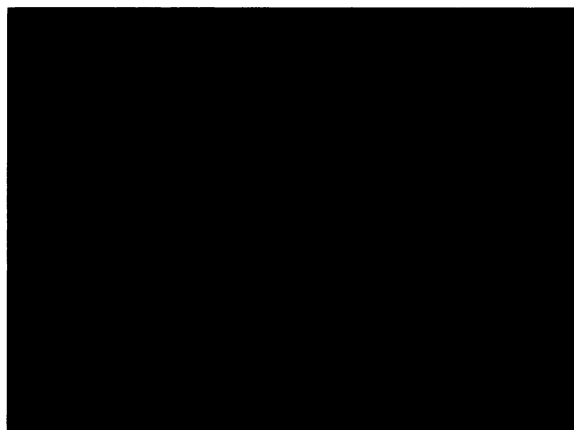


Obr. 5.18. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

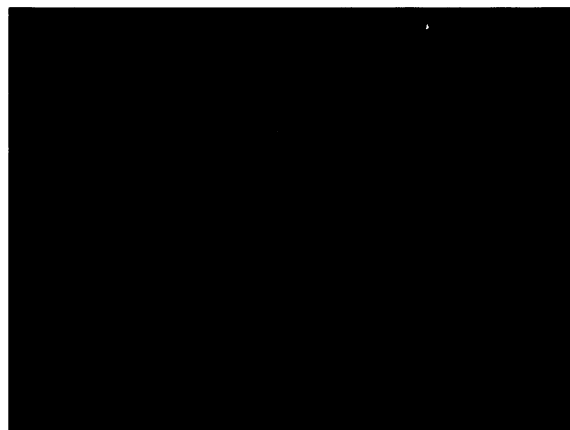


Obr. 5.19. Tkáň kosterního svalu CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



Obr. 5.20. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



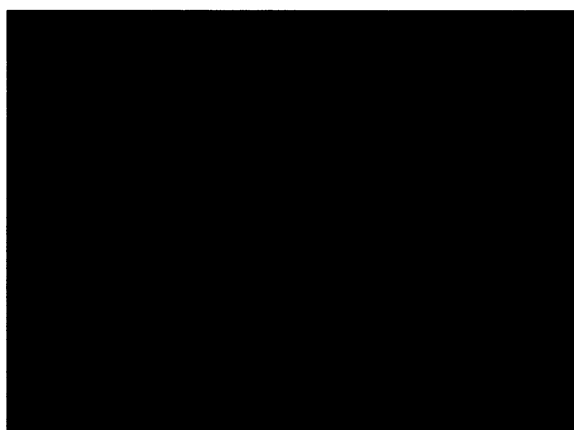
Obr. 5.21. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



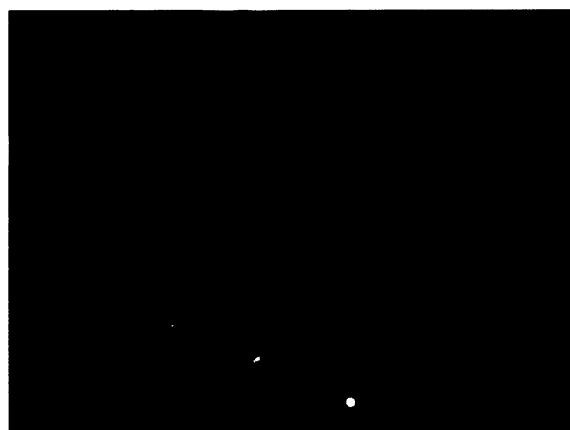
Obr. 5.22. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.23. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

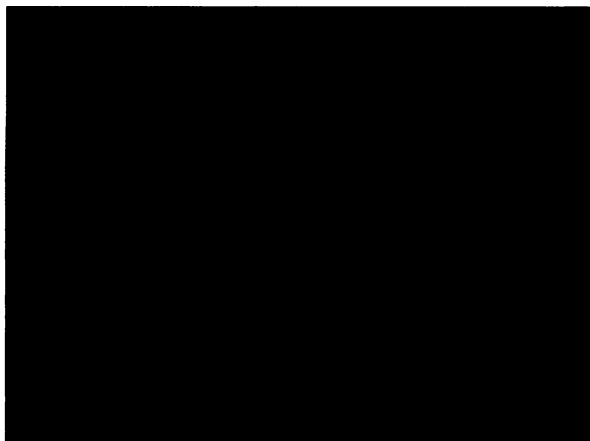


Obr. 5.24. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

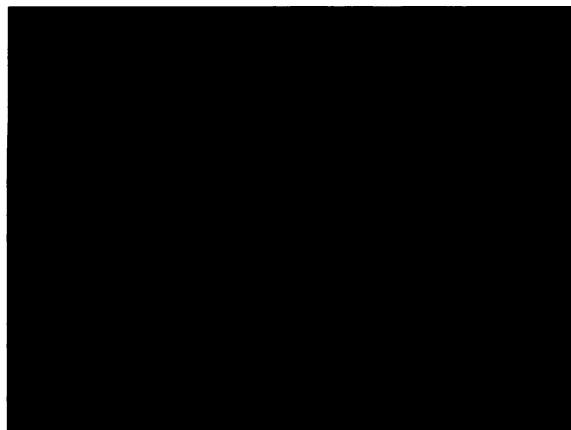


Obr. 5.25. Tkáň kůže CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

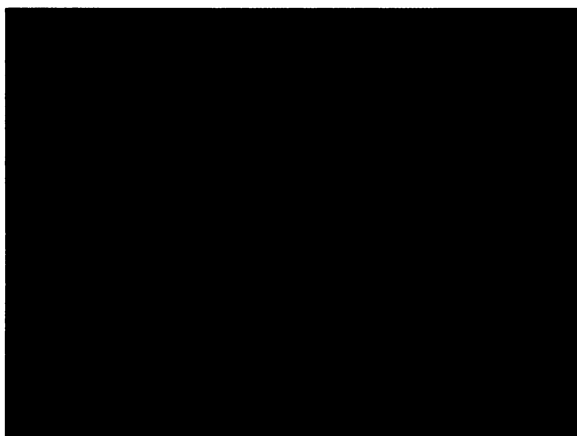
Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



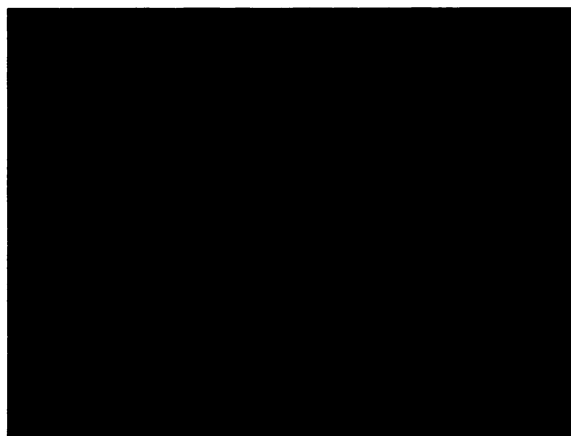
Obr. 5.26. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



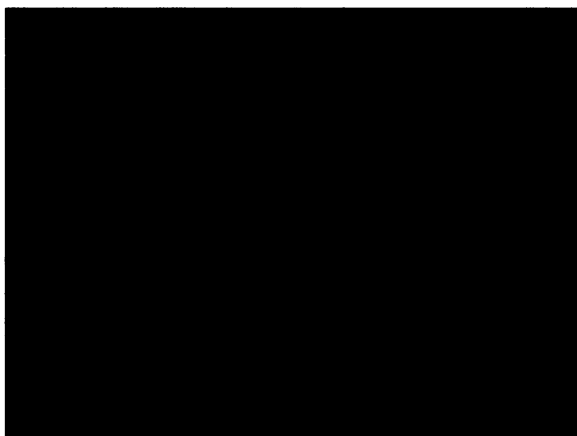
Obr. 5.27. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



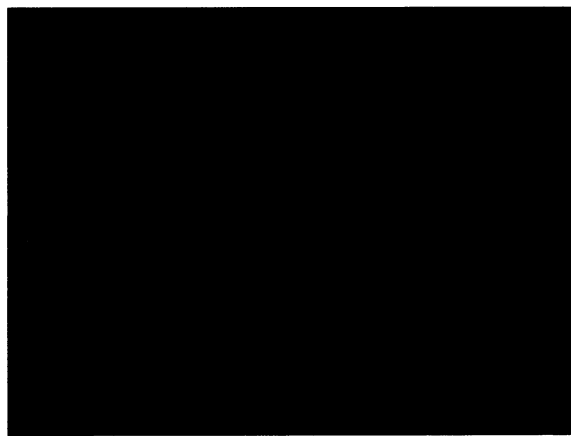
Obr. 5.28. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



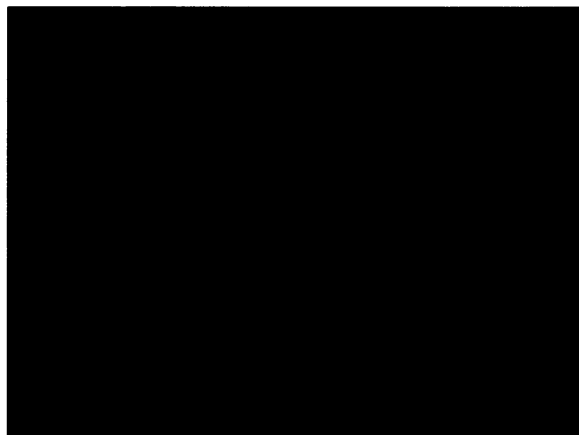
Obr. 5.29. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



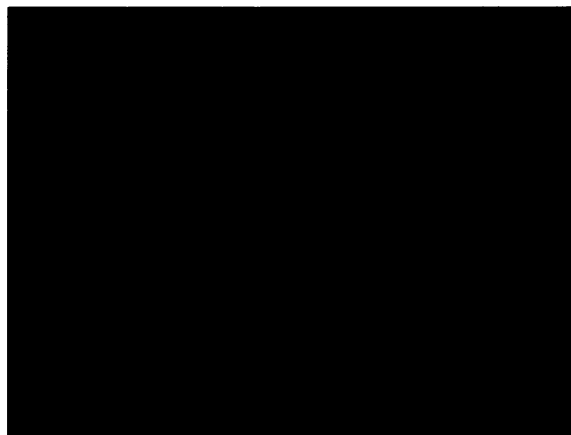
Obr. 5.30. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



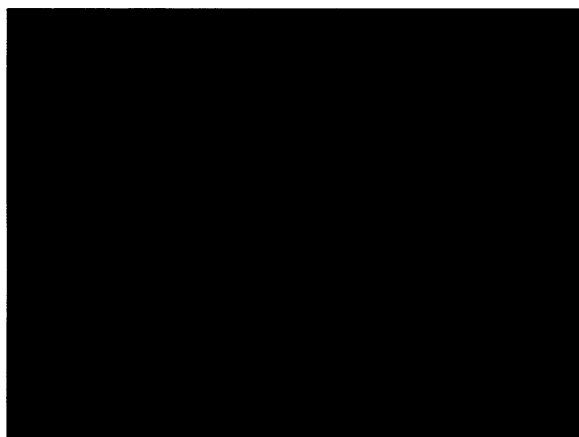
Obr. 5.31. Tkáň ledvin CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**

Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

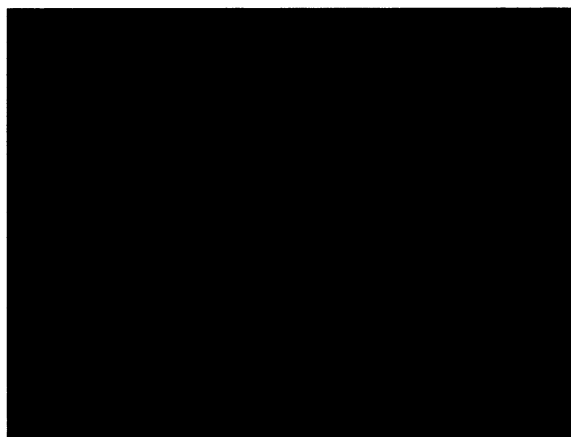
Obr. 5.32. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



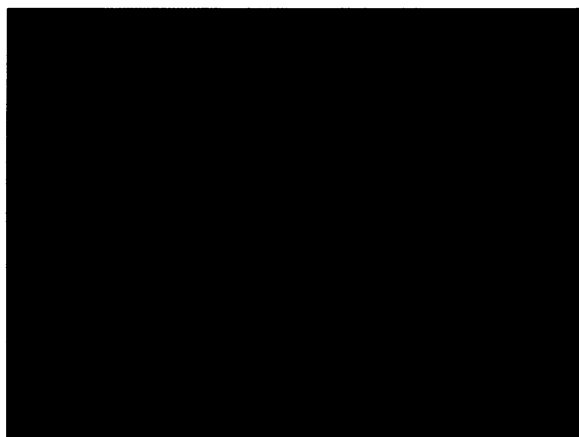
Obr. 5.33. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



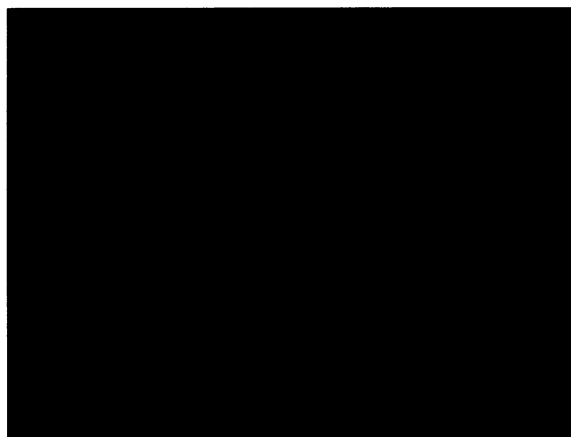
Obr. 5.34. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.35. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



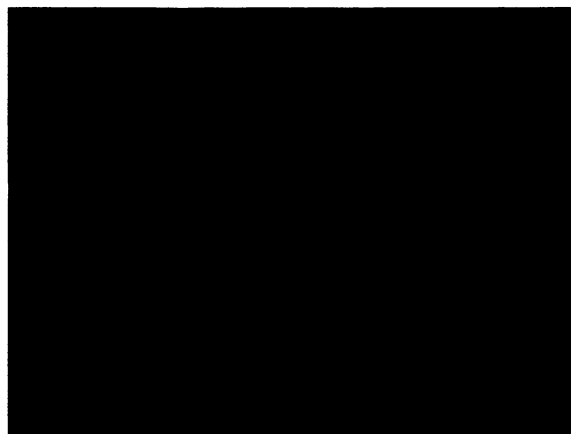
Obr. 5.36. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.37. Mozková tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

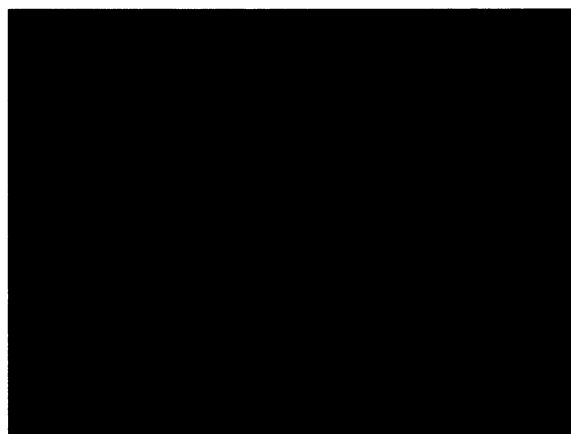
Obr. 5.38. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



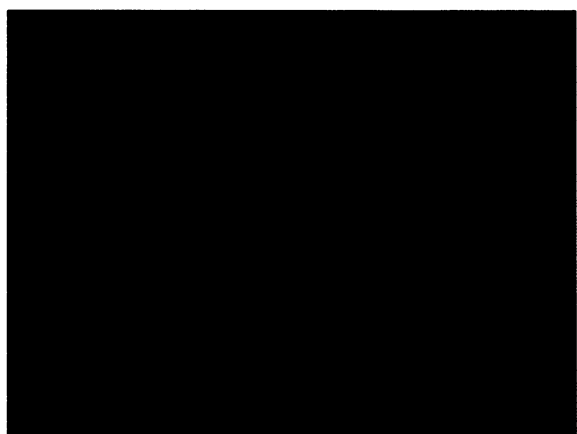
Obr. 5.39. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



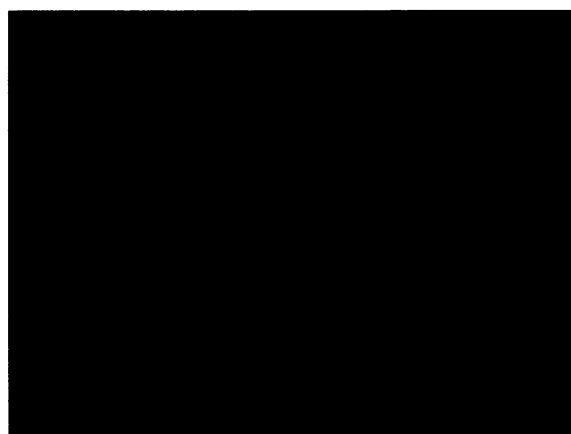
Obr. 5.40. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



Obr. 5.41. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



Obr. 5.42. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



Obr. 5.43. Nádorová tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**

Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



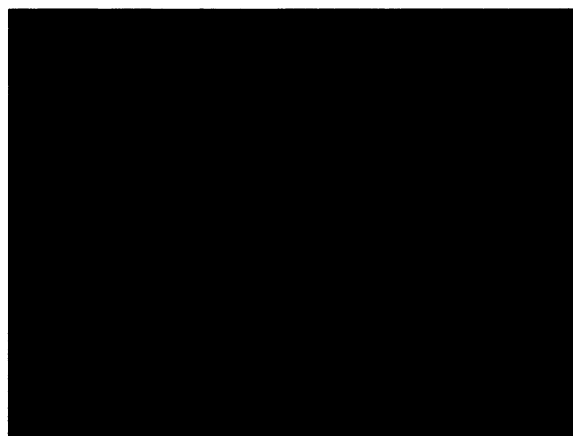
Obr. 5.44. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, kontrolní jedinec, zvětšeno 160x



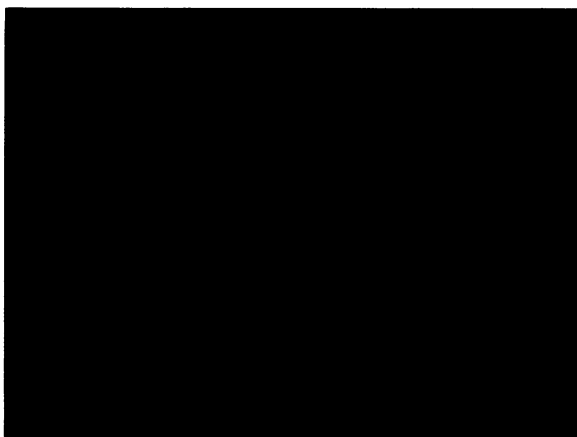
Obr. 5.45. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši 2 hodiny po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.46. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši 6 hodin po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.47. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši 24 hodin po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.48. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši 72 hodin po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.49. Plicní tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši 120 hodin po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x

Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



Obr. 5.50. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



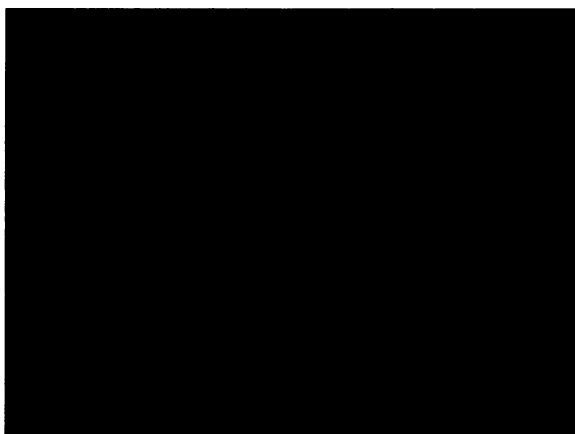
Obr. 5.51. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



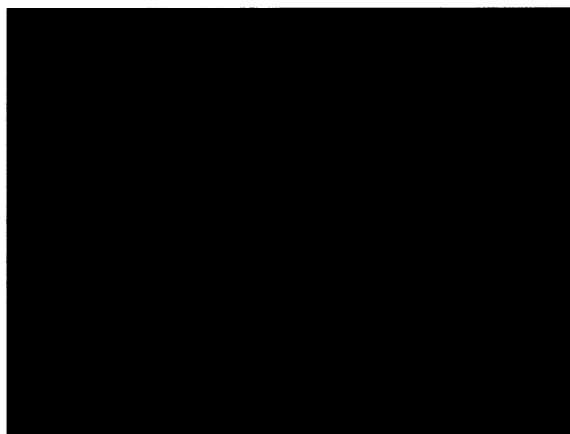
Obr. 5.52. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.53. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

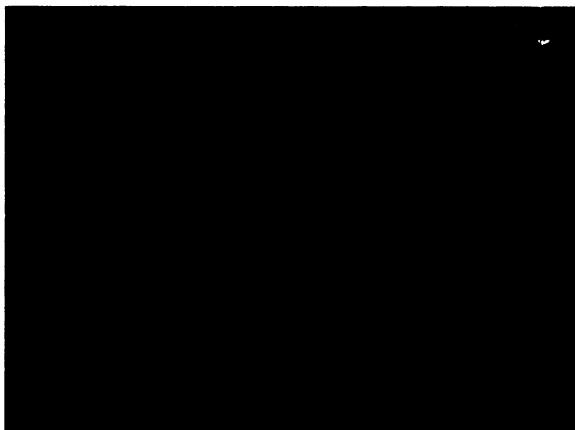


Obr. 5.54. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

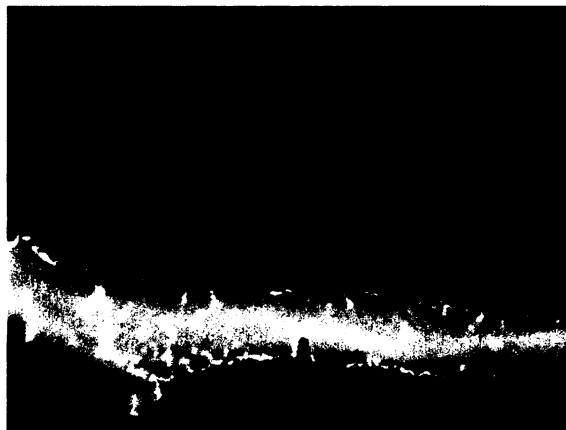


Obr. 5.55. Tkáň sleziny CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

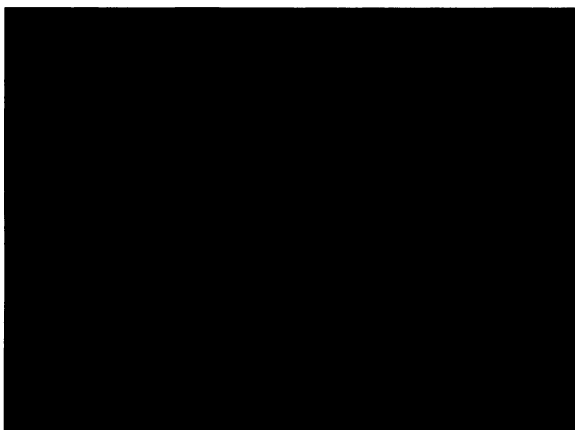
Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



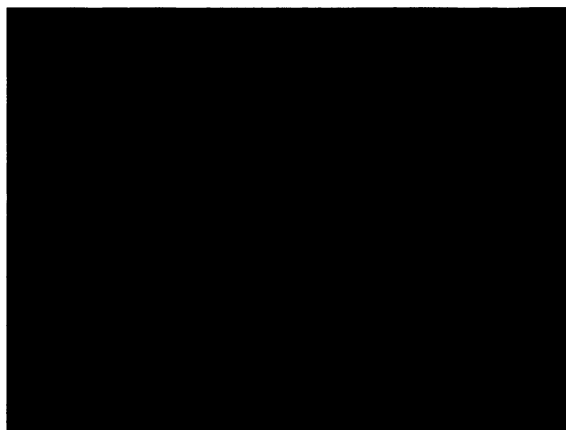
Obr. 5.56. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



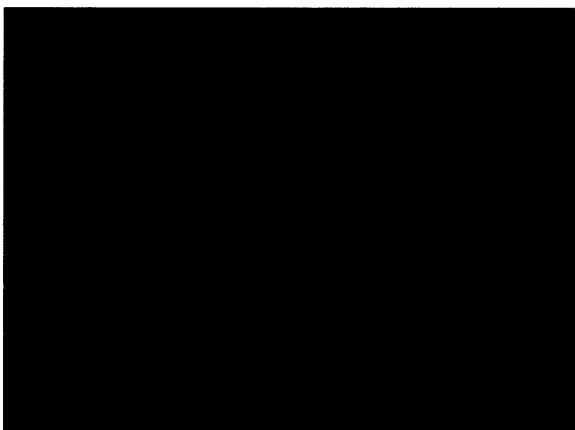
Obr. 5.57. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



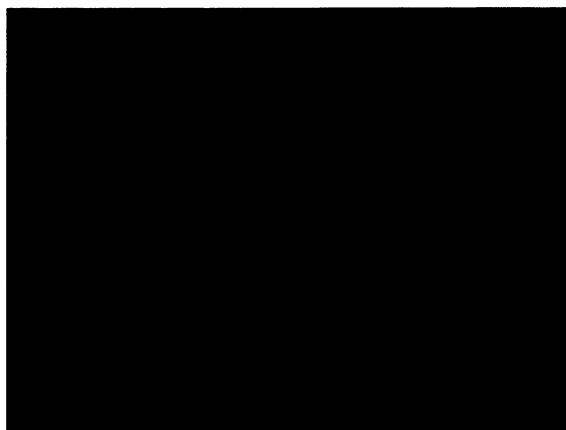
Obr. 5.58. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



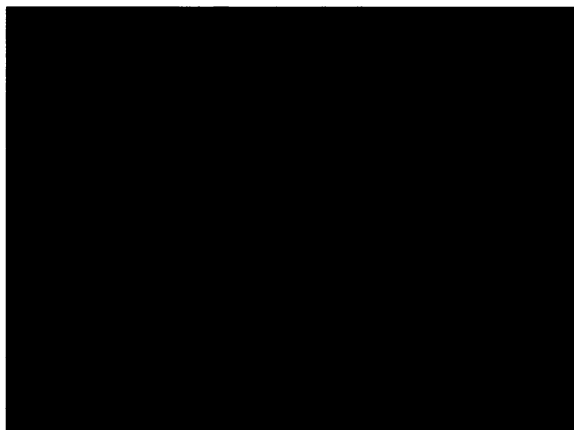
Obr. 5.59. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



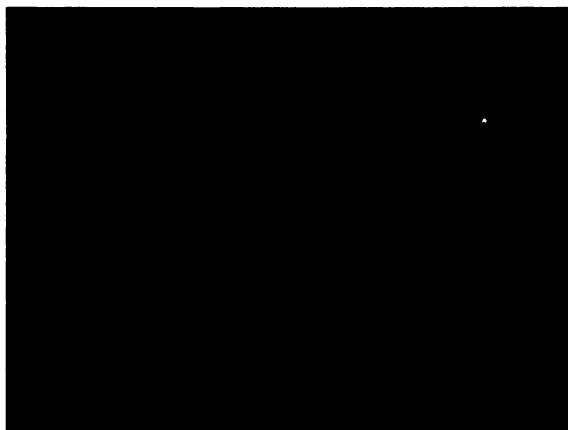
Obr. 5.60. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**



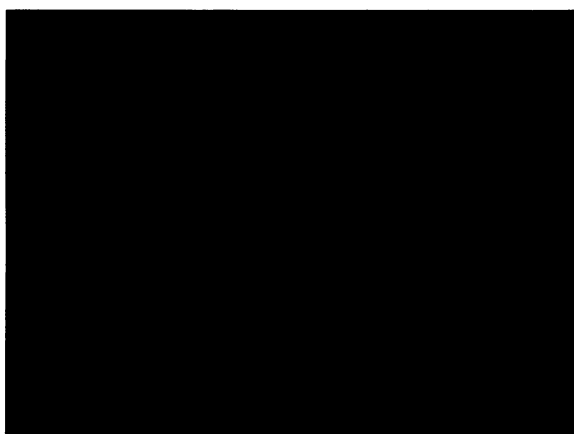
Obr. 5.61. Srdeční tkáň CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100μl, zvětšeno **160x**

Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

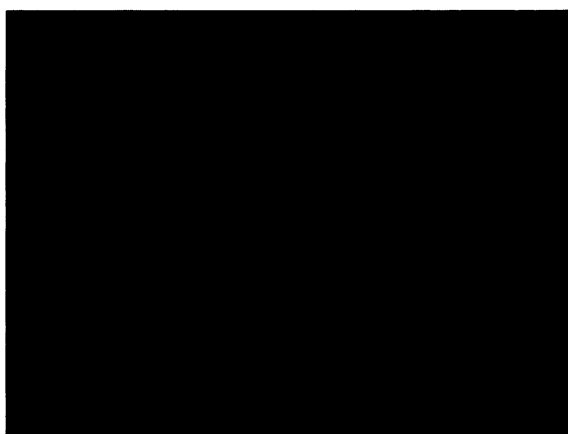
Obr. 5.62. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



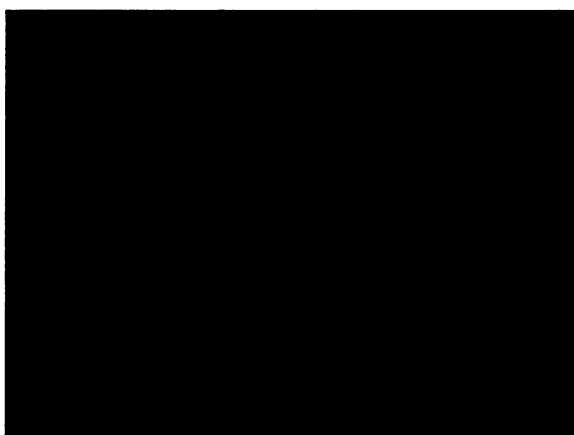
Obr. 5.63. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



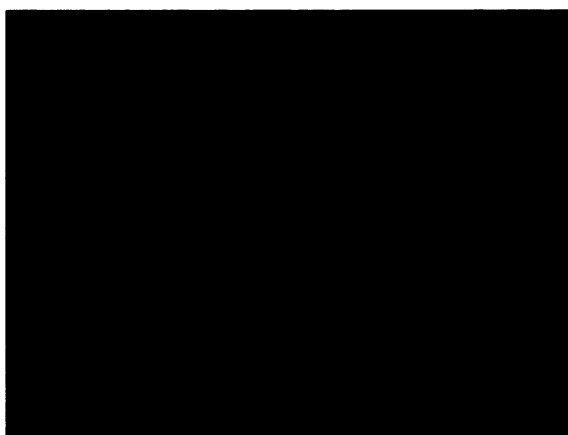
Obr. 5.64. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.65. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

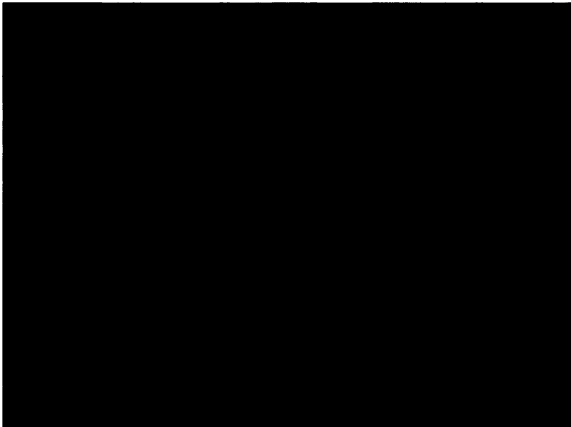


Obr. 5.66. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.67. Tkáň tenkého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

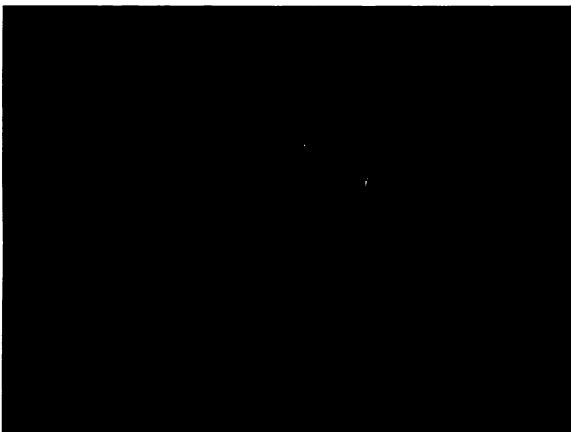
Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši



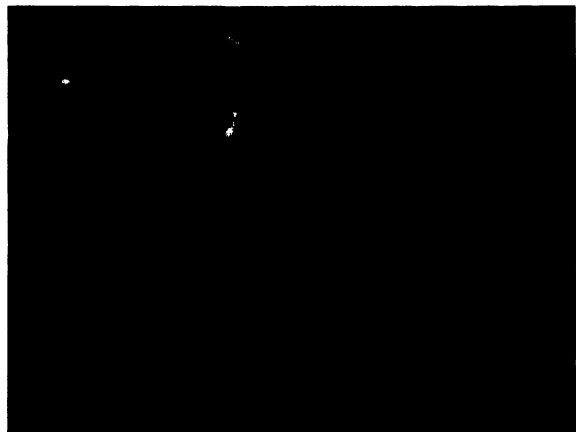
Obr. 5.68. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, **kontrolní jedinec**, zvětšeno **160x**



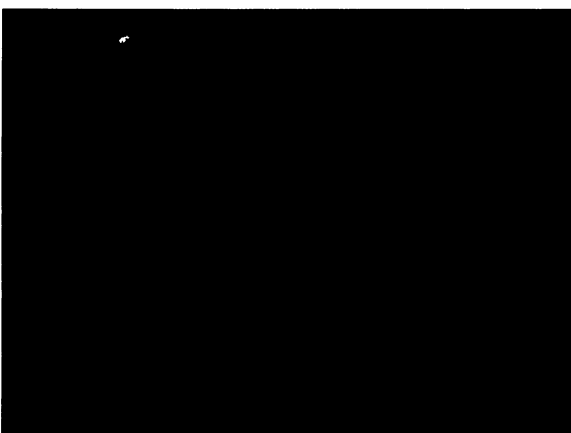
Obr. 5.69. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



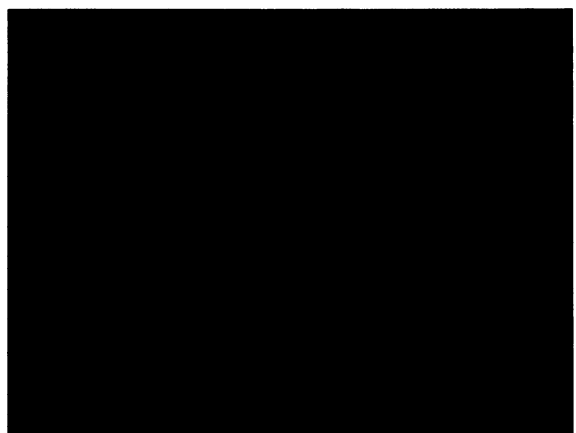
Obr. 5.70. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.71. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



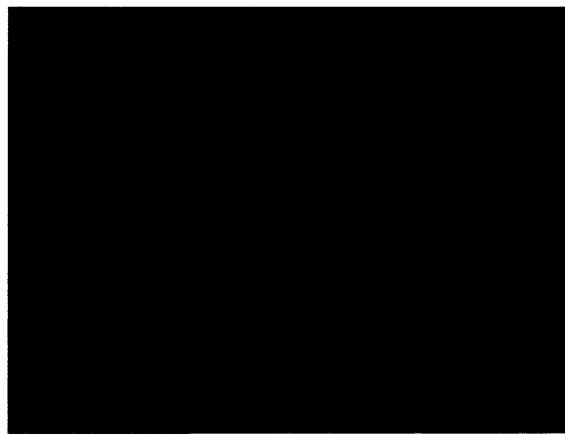
Obr. 5.72. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**



Obr. 5.73. Tkáň tlustého střeva CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno **160x**

Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši

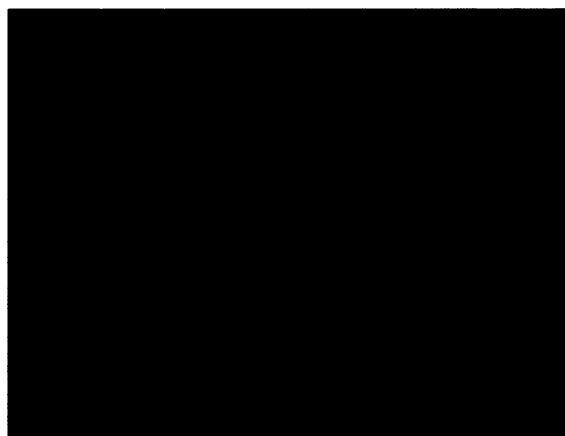
Obr. 5.74. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši, kontrolní jedinec, zvětšeno 160x



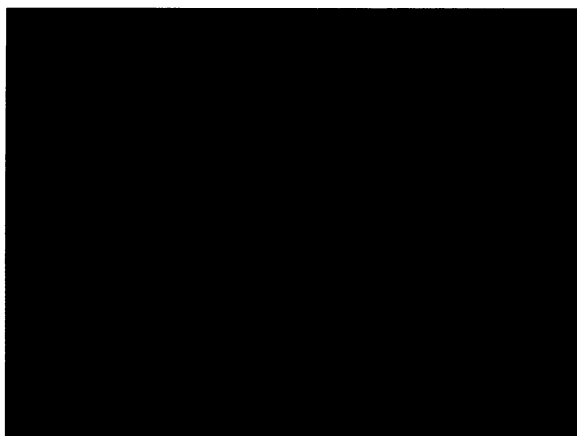
Obr. 5.75. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **2 hodiny** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



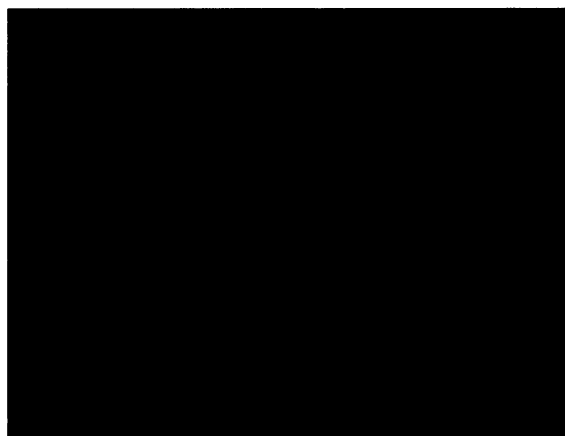
Obr. 5.76. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **6 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.77. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **24 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.78. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **72 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x



Obr. 5.79. Tkáň varlete CD-1 imunodeficientní nu/nu myši **120 hodin** po i.v. aplikaci stabilizovaných neutrálních RNáz v dávce 100 μ l, zvětšeno 160x

6. DISKUZE

Izolace neutrálních RNáz z rostlinného materiálu, stejně jako jejich purifikace, se ukázala jako časově náročná. Největším úskalím bylo nalezení metodik, kterými by bylo možné jednotlivé neutrální RNázy oddělit. RNázy přítomné v senescentních listech pšenice jsou totiž, co se týče jejich relativní molekulové hmotnosti, obdobné a pomocí standardních laboratorních metod obtížně separovatelné. Izolaci pravděpodobně znesnadnila i přítomnost proteináz, které v senescentním rostlinném materiálu prokázali např. Qi a LangLai (2003). Proto byly v průběhu izolace k extraktu neutrálních RNáz přidávány inhibitory proteináz. I přesto docházelo k částečné degradaci izolovaných RNáz a k poklesu ribonukleázové aktivity. Dalším faktorem, který ztížil identifikaci jednotlivých neutrálních RNáz, byla přítomnost neidentifikovaných proteinů, o kterých se na základě jejich relativní molekulové hmotnosti domnívám, že jsou izoenzymy izolovaných RNáz.

Pomocí SDS-PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA byla identifikována ribonukleázová aktivita pouze v pruzích s vyšší koncentrací enzymu, aktivita případných izoenzymů pozorována nebyla. Důvodem může být jak nízká koncentrace izoenzymu, tak i malá citlivost použité metody. Navzdory tomu má tato metoda své uplatnění. Její použití umožňuje detekovat ribonukleázovou aktivitu přímo v gelu a enzymu, tak rovnou přiřadit relativní molekulovou hmotnost (Liao, 1995). I přes všechny výše uvedené obtíže byly ze senescentních listů pšenice (*Triticum* sp.) izolovány neutrální RNázy o relativní molekulové hmotnosti 24, 28 a 34 kDa.

Jednou z prvních studií, která se zabývala izolací neutrálních RNáz z pšenice, byla práce Blanka a McKeona (1991a). Autoři popsali 3 druhy RNáz z listů pšenice (*Triticum aestivum* L.) s odlišnými elektroforetickými a katalytickými vlastnostmi. Kyselá RNáza WL_A a 2 skupiny neutrálních RNáz označované jako WL_B a WL_C. Relativní molekulová hmotnost kyselá RNáza WL_A byla stanovena na 20 kDa, neutrální RNáza WL_C byla charakterizována relativní molekulovou hmotností 27 kDa. Druhá ze skupiny neutrálních RNáz, RNáza WL_B, byla identifikována jako skupina RNáz s hlavní zónou o velikosti 26 kDa a se dvěma vedlejšími zónami s relativní molekulovou hmotností 24 a 28 kDa. Popsané RNázy jsou přítomny jak v normálních listech pšenice, tak i v listech senescentních. V průběhu senescence ovšem dochází k zvýšení jejich hladiny, a to především u skupiny neutrálních RNáz WL_B. Aktivita těchto enzymů vzrůstá lineárně od 7 dne před obdobím kvetení až po 20. den *post anthesis*, kdy dochází k intenzivnímu nárůstu jejich aktivity (Blank a McKeon, 1991b). Neutrální RNáza o velikosti 26 kDa byla popsána také Škvorem *et al.* (2006). Podobnost

relativní molekulové hmotnosti této WLN-RNÁzy s BS-RNázou, u které byla prokázána protinádorová aktivita v řadě studií (např. Matoušek, 2001), vedla autory ke srovnání aktivity BS-RNÁzy a některých jiných živočišných RNáz s touto pšeničnou neutrální RNázou.

Poznatky o značné protinádorové aktivitě WLN-RNÁzy konjugované s polyethylenglykolem jsem využila pro studium celotělové distribuce a metabolizace mnou izolovaných RNáz. Vazba mezi amino skupinami enzymu a molekulou polyethylenglykolu totiž vytváří stabilní konjugát, který je relativně odolný vůči hydrolytickému štěpení (Harris *et al.*, 1997). Stabilizované preparáty jsou tak chráněny před enzymatickou degradací, snižená je také pravděpodobnost jejich rozpoznání v organismu a s tím související prodloužení poločasu života (Zalipsky, 1995). Polyethylenglykol, jako modifikátor biologicky aktivních molekul s výbornými fyzikálními, chemickými i biologickými vlastnostmi je používán také pro jeho strukturní jednoduchost a komerční dostupnost (Zalipsky, 1995).

Pro studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných forem RNáz jsem v mojí práci využila PEG-fluoresceinovaný preparát. Díky molekule fluorochromu fluorescein-5-izothiokyanátu je možné zviditelnit stabilizovanou RNÁzu přímo v organismu a pozorovat tak její distribuci a metabolizaci přímo v těle. Na rozdíl od značení pomocí izotopů jde o metodu nenáročnou, a to jak časově, finančně, tak i na potřebné laboratorní vybavení. Komplikací při pozorování PEG-fluoresceinovaných preparátů v živočišných tkáních je jev označovaný jako autofluorescence.

Autofluorescence je vlastní fluorescenční schopnost buněk, která vychází z tzv. vnitřních fluoroforů. Přítomnost těchto vnitřních fluoroforů je viditelná zejména v extracelulární matrix, která svítí v porovnání s buněčnými organelami mnohem více, a to díky přítomnosti kolagenu a elastinu (Monici, 2005). Rozdíly v autofluorescenci jsou také patrné mezi buňkami a tkáněmi v průběhu fyziologických a/nebo patologických procesů, při kterých dochází ke změnám v množství a distribuci vnitřních fluoroforů (Monici, 2005). Srovnání normální a nádorové tkáně je obtížné i z jiného důvodu. V řadě studií bylo totiž prokázáno snížení autofluorescence u nádorových tkání (např. Palmer *et al.*, 2003).

Použití fluorescenční mikroskopie pro účely mé práce bych ohodnotila jako dostačující. Klasická fluorescenční mikroskopie je metodou vysoce citlivou a neinvazivní. Nevýhodou je ovšem získání obrazu, který obsahuje část světelného signálu i z rovin, na které není zaostřeno. Pro přesnější lokalizaci stabilizovaných forem RNáz v jednotlivých tkáních a buňkách by byla proto vhodnější konfokální mikroskopie.

Jako modelový organismus pro studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz *in vivo* byla vybrána CD-1 imunodeficientní nu/nu myš. Tento

organismus je vhodným modelem pro využití v experimentální onkologii zejména pro jeho athymii. Athymie, nebo-li chybění brzlíku, je doprovázena deficitem T-lymfocytů a tím způsobenou ztrátou schopnosti organismu rozeznat cizorodou tkáň. Díky této vlastnosti nedochází k odhojení transplantované tkáně v takové míře, jako u jiných laboratorních modelů. Naopak nevýhodou při použití CD-1 imunodeficientních nu/nu myši při podávání protinádorových léků je možnost, že budou metabolizovány odlišným způsobem než u lidí (Poučková a Pospíšil, 1982). Nicméně v současné době je možné rozdíly v metabolismu testovaných látek u člověka a myši rozeznat a na základě toho k nim přistupovat. Práci s tímto modelovým organismem komplikuje také značná náročnost chovu. Optimální je chov ve speciálních boxech s konstantní teplotou okolo 30 °C a za aseptických podmínek.

Pro studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných forem RNáz bylo využito metody kryorezání. Příprava nativních mikroskopických preparátů ze zamražených orgánů je výhodná jak z časových důvodů, tak díky citlivé manipulaci s hodnoceným materiálem.

Při studiu byla pozorována značná rozdílnost v přítomnosti stabilizovaných forem RNáz v jednotlivých tkáních, rozdílná byla také schopnost autofluorescence. Nevhodnými tkáněmi pro studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných forem RNáz byly tkáň kosterního svalu a srdce. Míra autofluorescence těchto orgánů je natolik vysoká, že není možné v připravených kryorezech množství PEG-fluoresceinovaného preparátu hodnotit.

Zvýšení intenzity fluorescence bylo zaznamenáno v tkáni jater, kůže, mozku, nádoru, plic, sleziny, tenkého a tlustého střeva a varlete již po 2 hodinách po i.v. aplikaci preparátu. Tato pozorování ukazují na rychlé rozšíření preparátu krevní cestou v celém organismu. V tkáni ledvin byl vrchol intenzity fluorescence pozorován až v intervalu 6 hodin po injikaci, což je pravděpodobně způsobeno opožděným odbouráváním preparátu stabilizovaných RNáz z krve. U tkání plic, tenkého střeva a varlete intenzita fluorescence po prvním intervalu rychle poklesla, což pravděpodobně souvisí s postupným odbouráním preparátu z krve. U orgánů s bohatým krevním zásobením, jakými jsou játra a slezina, a také u tlustého střeva došlo k poklesu fluorescence postupně. Vysoká intenzita fluorescence byla ve všech časových intervalech pozorována také u tkáně kůže, a to konkrétně v oblasti epidermis. U mozkové tkáně byla mírná fluorescence pozorována od prvního až do čtvrtého časové intervalu. Na základě toho lze prokázat vstup stabilizovaných forem RNáz i do tkáně mozku. Ačkoliv bylo intenzivní zvýšení fluorescence pozorováno u tkáně nádoru pouze v intervalu 2 hodin od i.v. aplikace preparátu, mírně zvýšenou fluorescenci lze pozorovat i v intervalech 72 a 120 hodin. Na základě těchto pozorování lze prokázat vstup stabilizovaných forem RNáz do

nádorové tkáně, ovšem nelze říci, jak dlouho preparát v tkáni přetrvává. Aby bylo možné prokázat terapeutické účinky stabilizovaných forem RNáz, musel by být preparát aplikován vícekrát a v dostatečném množství. Cílem diplomové práce však bylo studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz a pro tyto účely bylo aplikované množství dostačující.

Na základě získaných dat byl pozorován nárůst intenzity fluorescence u obou tělních tekutin již v prvním časovém intervalu. U moči, na rozdíl od krve, byl zaznamenán vrchol intenzity již v prvním časovém intervalu. Možným vysvětlením je zvýšený metabolismus CD-1 imunodeficientní nu/nu myši v prvním časovém intervalu, což by způsobilo rychlejší odbourání preparátu oproti následujícím časovým intervalům. Pozorované zvýšení intenzity fluorescence v posledním sledovaném intervalu u obou tělních tekutin je pravděpodobně způsobeno retencí stabilizovaných forem RNáz v některých orgánech a nádoru.

7. ZÁVĚR

1. Izolace a purifikace neutrálních RNáz

Metodou chromatografie na iontoměničích a gelové permeační chromatografie byly ze senescentních pšeničných listů (*Triticum* sp.) izolovány neutrální RNázy o relativní molekulové hmotnosti 24, 28 a 34 kDa.

2. Testování aktivity neutrálních RNáz *in vitro*

Pomocí testu ribonukleázové aktivity a SDS-PAGE v přítomnosti kvasničné dsRNA byla u nalezených neutrálních RNáz prokázána ribonukleázová aktivita.

3. Studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných RNáz *in vivo*

- a. Pro stabilizaci a vizualizaci v živočišných tkáních byly izolované neutrálních RNázy konjugovány s PEG-fluoresceinovaným preparátem.
- b. Celotělová distribuce a metabolizace stabilizovaných forem RNáz byla studována na CD-1 imunodeficientních nu/nu myších po jednorázové i.v. aplikaci 100 μ l konjugátu. Pro studium byly použiti jedinci se subkutánně transplantovaným lidským prostatickým karcinomem (buněčná linie LNCaP) a duktálním pankreatickým adenokarcinomem (buněčná linie PaTu 8902).
- c. Mikroskopické preparáty byly připraveny metodou kryorezání z hluboce zamrazených orgánů a nádorů. Vzoroký tělních tekutin byly po naředění s PBS v poměru 1:1, 1:3, 1:4, 1:9 a 1:19 hodnoceny fluorimetrií.
- d. Zvýšení intenzity fluorescence bylo zaznamenáno v tkáni jater, kůže, mozku, nádoru, plic, sleziny, tenkého a tlustého střeva a varlete již po 2 hodinách od i.v. aplikace preparátu. U tkáně ledvin byl vrchol intenzity fluorescence posunut do druhého časového intervalu. U tkáni plic, tenkého střeva a varlete intenzita fluorescence po prvním intervalu rychle poklesla. U orgánů s bohatým krevním zásobením, jakými jsou játra a slezina, a také u tlustého střeva, došlo k poklesu fluorescence postupně. Vysoká intenzita fluorescence byla ve všech časových intervalech pozorována v oblasti epidermis kůže. U mozkové tkáně byla mírná fluorescence pozorována od prvního až do čtvrtého časové intervalu. Vysoká intenzita fluorescence byla pozorována u nádorové tkáně pouze v prvním časovém intervalu, mírná fluorescence pak v čase 72 a 120 hodin po i.v. aplikaci konjugátu.

- e. Tkání nevhodnou pro studium celotělové distribuce a metabolizace stabilizovaných forem RNáz byla z důvodu výrazné autofluorescence tkáň kosterního svalu a srdce.
- f. V tělních tekutinách byla zvýšená fluorescence pozorována již v prvním časovém intervalu, oproti moči byl vrchol intenzity fluorescence krve posunut o jeden interval. V časových intervalech 24 a 72 hodin byl v obou tělních tekutinách zaznamenán výrazný pokles fluorescence V posledním sledovaném čase byla fluorescence oproti kontrolnímu jedinci opět zvýšená.
- g. Má pozorování podporují předpoklad, že aplikovaná dávka RNázy konjugované s polyethylenglykolem by mohla být použita jako terapeutická, neboť preparát přetrvává v nádorové tkáni po dostatečně prodlouženou dobu..

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anderson, M.A., E.C. Cornish, S.L. Mau, E.G. Williams, R. Hoggart *et al.* (1986). Cloning of cDna for stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, vol. 321, s. 38-44.
- Anderson, M.A., G.I. McFadden, R. Bernatzky, A. Atkinson, T. Orpin, H. Dedman, G. Tregear, R. Fernley, A.E. Clarke (1989). Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell*, vol. 1, s. 483-491.
- Bariola, P.A., P.J. Green (1997). Plant ribonucleases. In: G. D'Alessio, J.F. Riordan (eds.) *Ribonuclease : Structures and Functions*, Academic Press, New York, s. 163-183.
- Blank, A., T.A. McKeon (1989). Single-strand preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, s. 3169-3173.
- Blank, A., T.A. McKeon (1991a). Three RNázes in senescent and nonsenescent wheat leaves. *Plant Physiology*, vol. 97, s. 1402-1408.
- Blank, A., T.A. McKeon (1991b). Expression of Three RNáze Activities during Natural and Dark-Induced Senescence of Wheat Leaves. *Plant Physiology*, vol. 97, s. 1409-1413.
- Bredemeijer, G.M.M., J. Blaas (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 59, s. 185-190.
- D'Alessio, G., J.F. Riordan (eds.) (1997). *Ribonuclease : Structures and Functions*, Academic Press, New York, 670 s.
- Deutscher, M.P. (1993). Ribonuclease multiplicity, diversity and complexity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, s. 13011-13014.
- East, E.M., A.J. Mangelsdorf (1925). A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile and self-fertile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 11, s. 166-171.
- Eckschlager, T. (2004). Epidemiologie. In: J. Koutecký (ed.), *Klinická onkologie*. Riopress, Přešov, s. 11-14.
- Eckschlager, T., P. Poučková, J. Matoušek (2005). Ribonucleases (RNázes) In *Anti-Cancer Treatment*. *Klinická onkologie*, vol. 18, s. 207-209.
- Elsässer, H.-P., U. Lehr, B. Agricola, H.F. Kern (1993). Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, vol.64, s. 201-207.
- Farkas, G.L. (1982). Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verlag, vol. 14B, s. 224-262.

- Glund, K., A.H. Goldstein (1993). Regulation, synthesis, and excretion of phosphate starvation inducible RNáze by plant cells. In: Control of Plant Gene Expression. CRP Press, Boca Raton, s. 311-323.
- Goldstein, A.H., D.A. Baertlein, A. Danon (1989). Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 7, s. 7-16.
- Green, P.J. (1994). The ribonucleases of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 45, s. 421-445.
- Greenberg, J.T. (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, s. 12094-12097.
- Harris, J.M., S. Zalipsky (1997). In: J. Škvor, P. Lipovová, P. Poučková, J. Souček, T. Slavík, J. Matoušek (2006). Effect of wheat leaf ribonuclease on tumor cells and tissues. *Preclinical Reports*, vol. 17, s. 815-823.
- Hiscock, S.J., S.M. McInnis (2003). The diversity of self-incompatibility systems in flowering plants. *Plant biology*, vol. 5, s. 23-32.
- Horoszewicz, J.S., S.S. Leong, E. Kawinski, J.P.Karr, H. Rosenthal, T. Ming Chu, E.A. Mirand, G.P. Murphy (1983). LNACaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*, vol. 43, s. 1809-1818
- Chang, S.-Ch, D.R. Gallie (1997). RNase activity decrease following a heat shock in wheat leaves and correlates with its postranslational modification. *Plant Physiology*, vol. 113, s. 1253-1263.
- Jarolím, L. (2000). *Karcinom prostaty*, Triton, Praha, 42 s.
- Káš J., M. Kodíček, O. Valentová (2006). Přílohy. In: J. Káš, M. Kodíček, O. Valentová. *Laboratorní techniky biochemie*, Vydavatelství VŠCHT, Praha, s. 249.
- Kao, T.-H., S. Huang (1994). Gametophytic self-incompability: A mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiology*, vol. 105, s. 461-466.
- Klener, P. (2002). Etiologie a patogeneze nádorového procesu. In: P. Klener (ed.). *Klinická onkologie*, Galén, Semily, s. 39-78.
- Klener, P., J. Abrahámová (2002). Nádory mužských pohlavních orgánů. In: P. Klener (ed.). *Klinická onkologie*, Galén, Semily, s. 451-469.
- Kosuge T., M. Isemura, Y. Takahashi, S. Odani, S. Odani (2003). Ribonuclease inhibitors in *Malus x domestica* (Common apple): Isolation and partial characterization. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 67, s. 698-703.

- Koutecký, J. (2004). Terapie nádorů. In: J. Koutecký (ed.), *Klinická onkologie*. Riopress, Přerov, s. 157-159.
- Lam, S.K., T.B. Ng (2001). Isolation of novel thermolabile heterodimeric ribonuclease with antifungal and antiproliferative activities from roots of the Sanchi ginseng *Panax notoginseng*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 285, s. 419-425.
- Lee, H.-S., S. Huang, T.-H. Kao (2001). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 1994, vol. 367, s. 560-563.
- Leland, P.A., R. T. Raines (2001). Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue. *Chemistry & Biology*, vol. 8, s. 405-413.
- Liao, Y.-D. (1995). Determination of base specificity of multiple ribonucleases from crude samples. *Molecular Biology Reports*, vol. 20, s. 149-154.
- Löffler, A., S. Abel, W. Jost, K. Glund (1992). Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiology*, vol. 98, s. 1472-1478.
- Matile, P. (1975). *The Lytic Compartment of Plant Cells*, Springer Verlag, Vienna.
- Matoušek, J. (2001). Antitumor activity of ribonucleases and their recombinant molecules. *Comparative Biochemistry and Physiology : Part C*, vol. 21, s. 175-191.
- Matoušek, J., G. Gotte, P. Poučková, J. Souček, T. Slavík, F. Vottariello, M. Libonati (2003). Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, s. 23817-23822.
- Matton, D.P., N. Nass, A.E. Clarke, E. Newbigin (1994). Self-incompability: How plants avoid illegitimate offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, s. 1992-1997.
- McClure, B.A., V. Haring, P.R. Ebert, M.A. Anderson, R.J. Simpson, F. Sakiyama, and A.E. Clarke (1989). Style self-incompability gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, vol. 342, s. 955-958.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, vol. 11, s. 227-256.
- Nürnbergger, T., S. Abel, K. Glund (1990). Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiology*, vol. 92, s. 970-976.
- Qi, R., X. LangLai (2003). Characterization of endopeptidases in wheat leaves during dark-induced senescence. *Acta Botanica Sinica*, vol. 45, s. 1049-1054.

- Palmer, G.M., P.J. Keely, T.M. Breslin, N. Ramanujam (2003). Autofluorescence Spectroscopy of Normal and Malignant Human Breast Cell Lines. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 78, s. 462-469.
- Parry, S.K., Y.-H. Liu, A.E. Clarke, E. Newbiggin (1997). S-RNázes and other plant extracellular ribonucleases. In: G. D'Alessio, J.F. Riordan (eds.). *Ribonuclease: Structures and Functions*, Academic Press, New York, s. 191-211.
- Poučková, P., J. Pospíšil (1982). Transplantace lidské nádorové tkáně na laboratorní zvířata, Ústav veterinární osvěty, Pardubice, 79 s.
- Škvor, J., P. Lipovová, P. Poučková, J. Souček, T. Slavík, J. Matoušek (2006). Effect of wheat leaf ribonuclease on tumor cells and tissues. *Preclinical Reports*, vol. 17, s. 815-823.
- Taylor, C.B., P.A. Bariola, S.B. DelCardayré, R.T. Raines, P.J.Green (1993). RNS2: A senescence-associated RNáze of Arabidopsis that diverged from S-RNázes before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, s. 5118-5122.
- Ye, Z.-H., D.L. Droste (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*, vol. 30, s. 697-709.
- Yen, Y., P.J. Green (1991). Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, vol. 97, s. 1487-1493.
- Zalipsky, S. (1995). Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 16, s. 157-182.
- Žaloudík, J., P. Klener (2002). Nádory pankreatu. In: P. Klener (ed.), *Klinická onkologie*. Galén, Semily, s. 429-433.