

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Význam regulací signální cesty proteinu p53 v protinádorové léčbě: inhibitory  
ATM**

**Bc. Marcela Chmelařová**

**Diplomová práce**  
**2009**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marcela CHMELAŘOVÁ**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Význam regulací signální cesty proteinu p53  
v protinádorové léčbě: inhibice ATM**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši a popište současný stav poznání o proteinu p53, jeho regulaci a vztahu k indukci apoptózy, a dále o jeho vztahu ke kinase ATM. Seznamte se s mechanismem protinádorového působení mitoxantronu.
2. Osvojte si techniku práce s buněčnou linií MOLT-4, její kultivaci a pasážování.
3. Zhodnoťte různé dávky mitoxantronu a způsob jejich aplikace pomocí sledování proliferační aktivity buněk a vyberte dávkové schéma pro další studii.
4. Zhodnoťte vliv inhibitoru ATM kinasy (kofein) na působení mitoxantronu pomocí sledování proliferační aktivity buněk, analýzy buněčného cyklu a stanovení apoptózy.
5. Zhodnoťte expresi a post-translační modifikace proteinu p53 a dalších substrátů ATM-kinasy pomocí imunodetekčních technik.
6. Naměřené hodnoty statisticky zpracujte a ze získaných výsledků vyvoďte, zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibitor ATM aktivaci biochemických cest vedoucích k detekci a reparaci mitoxantronem vyvolaného poškození DNA nebo k indukci apoptózy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**podle pokynu vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.**

Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Konzultant diplomové práce:

**Mgr. Darina Muthná, Ph.D.**

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Pardubicích dne 24.4.2009

Marcela Chmelařová

Děkuji své školitelce doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD. a konzultantce Mgr. Darině Muthné, PhD. za odborné vedení, rady a cenné připomínky týkající se této práce a v neposlední řadě za velmi přátelský osobní přístup.

Dále děkuji zaměstnancům Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, zejména pak laborantce Nadě Mazánkové za spolupráci a vytvoření příjemného pracovního prostředí pro provedení experimentální části diplomové práce.

Práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem MŠMT ČR, projekt č. MSM 0021620820.

## Souhrn

Cílem této práce bylo sledování apoptózy a molekulárních změn vyvolaných mitoxantronem a mitoxantronem v kombinaci s kofeinem u lidských nádorových buněk. Jako modelový systém byla zvolena buněčná linie MOLT-4, odvozená od lidské T-lymfocytární leukémie. Nejprve jsme sledovali proliferační aktivitu buněk MOLT-4 po vystavení různým dávkám mitoxantronu a následně jsme sledovali proliferační aktivitu buněk vystavených působení mitoxantronu společně s kofeinem, jakožto inhibítorem ATM kinázy.

Podrobnější analýzu ovlivněných buněk jsme provedli pomocí flow-cytometrie. Využívali jsme hodnocení buněčného cyklu pomocí obsahu DNA v buňce a hodnocení apoptózy pomocí duálního značení za použití Annexinu V a propidium jodidu. Dále jsme využívali změn optických parametrů rozptylu světla. Zjistili jsme, že kofein ruší blok v G2 fázi buněčného cyklu a v kombinaci s 0,5 nmol/l mitoxantronem má na buňky protektivní vliv, pozorovatelný zejména po 72 hodinách od ovlivnění.

Následně jsme studovali změnu v množství proteinů důležitých při reparaci buňky a regulaci buněčného cyklu po působení cytostatika a inhibítora ATM kinázy. Zabývali jsme se analýzou proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem p53\_ser15 a p53\_ser392, dále jsme sledovali změnu v množství proteinu p21, ERK1/2 a štěpení laminu B. Pro kontrolu nanášky jsme používali stanovení aktinu. Tyto změny jsme detekovali pomocí elektroforézy následované western blotem zakončeným imunodetekcí. V této práci jsme potvrdili, že kofein zabraňuje fosforylaci proteinu p53 u buněk MOLT-4 a tím snižuje jeho stabilitu.

Teoretická část této diplomové práce charakterizuje apoptózu, mechanismy jejího spuštění a regulace a dále pak regulaci buněčného cyklu zejména na molekulární úrovni. Jsou popsány reparační procesy vyvolané aktivací ATM kinázy po poškození DNA. Popsáno je také působení mitoxantronu a kofeinu a nejsou opomenuty ani metody detekce apoptózy ať už pomocí průtokové cytometrie nebo western blot analýzy.

Klíčová slova: apoptóza, ATM kináza, p53

## Summary

The aim of the thesis was to observe molecular changes activated by mitoxantrone and mitoxantrone in combination with caffeine (inhibitor of ATM kinase) of human tumor cells. MOLT-4 cell line was selected as a model system; this cell line is derived from human T-lymphocytic leukemia. At first we monitored the dynamics of proliferation of MOLT-4 cells after exposure to different doses of mitoxantrone and then we monitored dynamics of proliferation of cells after exposure to mitoxantrone in combination with caffeine.

More detailed analysis was performed by flow-cytometry. We used evaluation of cell cycle by measurement of DNA content in cell and apoptosis detection by dual marking by Annexin V and propidium-iodide. We also used changes of optical parameters of light scattering. We found that caffeine cancels the mitoxantrone-induced G2 arrest of cell cycle and in combination with 0,5 nmol/l mitoxantrone has temporary protective influence, detectable especially after 72 hours of exposition.

Subsequently, we studied changes in amount of proteins important for cell repair and regulation of cell cycle after exposure to mitoxantrone and inhibitor of ATM kinase. We analyzed protein p53 and its phosphorylated forms p53\_ser15 and p53\_ser392, then we observed changes in amount of protein p21, ERK1/2 and cleavage of Lamin B. As loading control we used assessment of actin. These changes we detected by electrophoresis followed by western blot and ended by immunodetection. We prove in this thesis that caffeine blocks phosphorylation of protein p53 in cells MOLT-4 and thereby lowers its stability.

The theoretic part of this diploma thesis characterizes apoptosis, mechanisms of its initiation and regulation, and the regulation of cell cycle with special focus on molecular mechanisms. Also described are repair processes triggered by activation of ATM kinase, such as reaction to DNA damage and effect of cytostatic mitoxantrone and ATM kinase inhibitor caffeine.

Key words: apoptosis, ATM kinase, p53

## Obsah

1. Úvod .....	10
2. Teoretická část .....	11
2.1 Apoptóza .....	11
2.1.1 Cesty indukce apoptózy .....	12
2.1.1.1 Vnější cesta indukce apoptózy .....	12
2.1.1.2 Vnitřní cesta indukce apoptózy .....	13
2.1.2 Kaspázy .....	14
2.2 ATM kináza a odpověď na poškození DNA .....	16
2.2.1 Aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu .....	17
2.2.1.1 Protein p53 a G1/S kontrolní bod .....	19
2.2.1.2 G2/M kontrolní bod .....	21
2.2.1.3 Kontrolní bod S fáze .....	22
2.2.1.4 Check point kinázy .....	22
2.3 Reparace dvouvlákných zlomů DNA .....	23
2.4 Mitoxantron (mitoxantroni dihydrochloridum, MTX) .....	24
2.5 Kofein jako inhibitor ATM kinázy .....	25
2.6 Buněčná linie MOLT-4 .....	25
2.7 Metody detekce apoptózy .....	26
2.7.1 Metody využívající mikroskopu .....	27
2.7.2 Metody využívající průtokového cytometru .....	27
2.7.3 Metody využívající western-blot analýzy .....	29
3. Metodická část .....	31
3.1 Materiál a metodika .....	31
3.1.1 Kultivace a pasážování buněk MOLT-4 .....	31
3.1.2 Mitoxantron (mitoxantroni dihydrochloridum- MTX) .....	31
3.1.3 Kofein (inhibitor ATM kinázy) .....	32
3.1.4 Průtoková cytometrie (flow cytometry) .....	32
3.1.5 Elektroforéza a Western blotting .....	34
3.2 Přístroje .....	39
4. Výsledky a diskuse .....	40
4.1 Proliferace a viabilita MOLT-4 .....	40
4.1.1 Vliv mitoxantronu na buňky MOLT-4 .....	40
4.1.2 Vliv mitoxantronu a kofeinu na buňky MOLT-4 .....	42



<b>4.2 Analýza apoptózy pomocí průtokové cytometrie</b> .....	44
<b>4.2.1 Analýza SS/EV</b> .....	44
<b>4.2.2 Analýza Annexin V/ PI</b> .....	46
<b>4.2.3 Analýza obsahu DNA</b> .....	50
<b>4.3 Elektroforéza a Western blot analýza</b> .....	53
<b>5. Závěr</b> .....	60
<b>6. Seznam zkratek</b> .....	62
<b>7. Seznam literatury</b> .....	64

## 1. Úvod

Znalost procesů indukce a regulace apoptózy je velmi významná v moderní léčbě nádorových onemocnění. Nádorová onemocnění představují jednu z nejčastějších příčin úmrtí jak v České republice, tak v celosvětovém měřítku.

Tato práce je zaměřena na studium apoptózy, zabývali jsme se zejména proliferací a mírou indukce apoptózy u nádorových buněk ovlivněných mitoxantronem a nescifickým inhibítorem ATM kinázy (kofeinem). Následně jsme studovali molekulární změny k nimž dochází po ovlivnění nádorových buněk. Zaměřili jsme se na expresi proteinů charakteristických pro buněčnou smrt a regulaci buněčného cyklu (p53 a jeho fosforylované formy, Lamin B, ERK1/2 a p21).

V naší práci jsme se zabývali indukcí apoptózy v modelovém systému, a to na buněčné linii MOLT-4, jedná se o příklad buněčné T-lymfocytární leukémie. Maligní lymfocyty, které se akumulují u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, jsou převážně klidové buňky vykazující prodlouženou životnost díky selhávající programované buněčné smrti (*Reed, 1998*).

V teoretické části je popsán současný stav problematiky související s indukcí a regulací apoptózy. Je zde popsána také regulace buněčného cyklu a působení kofeinu, jakožto inhibítora ATM kinázy a cytostatika mitoxantronu. Zmínka je také o možnostech detekce apoptózy pomocí průtokové cytometrie a western blot analýzy.

K zjišťování míry indukce apoptózy jsme využívali flow cytometrických změn a k kvantifikaci exprese sledovaných proteinů jsme používali elektroforézu a western blot s následnou imunodetekcí.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Apoptóza

Termín apoptóza byl poprvé použit autory Kerrem, Wylliem a Curriem v roce 1972 (*Krejsek a Kopecký, 2004*). Definovali tak soubor specifických morfologických změn spojených s atypickou formou buněčné smrti. Zdá se, že apoptóza je nejvýznamnější forma patofyziologické smrti a nekróza je značně výjimečnější než se předpokládalo v minulých letech. Významným znakem apoptózy, kterým se liší od nekrózy, je, že vznikají buněčné fragmenty, které nejsou cílem velké imunitní odpovědi. Apoptóza má také pomalejší mechanismus smrti trvající několik hodin až několik dní v závislosti na iniciačním podnětu.

Tato forma buněčné smrti má velice podstatnou roli v rámci imunitního systému. Za prvé je to je indukce imunologické tolerance. Při získávání imunokompetence procházejí buňky imunitního systému řadou vývojových stádií. Pokud jsou během vývoje identifikovány lymfocyty, jež jsou buď schopny interakce s tělu vlastními antigeny nebo jsou nefunkční (pozitivní a negativní selekce T-lymfocytů v thymu) dochází k jejich odstranění apoptózou. A druhou, neméně důležitou rolí je cytotoxické působení CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a NK buněk. Cytotoxické buňky imunitního systému jsou tak za určitých okolností velice potentními induktory apoptózy v cílových (např. nádorových) buňkách. Dalším stimulem k spuštění apoptózy může být napadení buňky virovou infekcí (*Hořejš a Bartůňková, 2005*).

K indukci apoptózy dochází také při odstraňování starých a nepotřebných či nefunkčních buněk v průběhu ontogeneze.

Dle současných poznatků se apoptóza definuje jako konkrétní forma geneticky řízené buněčné smrti. To znamená buňkou přísně střežený mechanismus, regulovaný na čase závislou expresí a vzájemnou interakcí specifických proteinů kódovaných vysoce konzervovanými geny. Principem je proteolytická degradace buněčných struktur a zdárný průběh je závislý na energii a udržení kontinuity cytoplazmatické membrány (*Krejsek a Kopecký, 2004*).

Tato forma nedestruktivní programované buněčné smrti je důležitá jak pro embryonální vývoj a udržení buněčné homeostázy, tak pro patogenezi mnoha nemocí (*Thompson 1995, Vaux a Korsmeyer, 1999*).

Morfologicky je proces apoptózy charakterizován svráštěním buňky v důsledku dehydratace, kondenzací a fragmentací jádra, puchýřkovatěním povrchové membrány

při zachování její funkce a konečně vznikem apoptotických tělísek, která jsou *in vivo* fagocytována řadou buněk (zejména makrofágy). Dalšími znaky buněčné apoptózy je mobilizace intracelulárního vápníku, aktivace transglutaminázy, která reaguje s cytoplazmatickými proteiny, ztráta mikrotubulů a ztráta asymetrie cytoplazmatické membrány. Všechny tyto změny způsobují, že se buňky stávají cílem fagocytózy.

Pro vlastní destrukční proces je nutná přítomnost dostatečně velkého množství ATP, nedostává-li se ATP, buňky hynou nekrotou.

Z hlediska průběhu buněčného cyklu rozeznáváme dvě formy apoptózy, a to časnou a oddálenou. K časné apoptóze dochází během stejné fáze buněčného cyklu, ve které byly buňky poškozeny, tj. před mitózou. Takto rychle do apoptózy většinou vstupují buňky hematopoetického původu. K oddálené apoptóze dochází během buněčného cyklu následujícího po fázi buněčného cyklu, kde byly buňky ovlivněny. Objevuje se většinou, jsou-li buňky vystaveny relativně nízkým dávkám cytostatických látek. Buňka totiž nejprve vyhodnotí poškození jako subletální a poté během dalšího kola DNA replikace a mitózy je poškození přehodnoceno na letální (Řezáčová, 2004).

K aktivaci apoptózy dochází dvěma hlavními cestami a to vnitřní (mitochondriální) a vnější cestou. Po aktivaci nastupuje fáze efektorová, která je charakterizována postupnou aktivací proteolytických enzymů (kaspáz) a postupným štěpením různých substrátů.

## **2.1.1 Cesty indukce apoptózy**

### **2.1.1.1 Vnější cesta indukce apoptózy**

Vnější cesta apoptózy vede přes tzv. receptory buněčné smrti. Mezi hlavní receptory buněčné smrti patří CD95R a TNFR1. Vedle těchto receptorů je možné apoptózu navodit přes receptor TRAIL-R1/DR4 a TRAIL-R2/DR5 vazbou TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL, APO-2L), přičemž receptor TRAIL může způsobit oba typy buněčné smrti, jak apoptózu, tak nekrotou (Srivastava, 2001).

Za aktivaci apoptického signálu je odpovědná trimerizace příslušného receptoru smrti. Komplex proteinů spojených s aktivací CD95 je označován jako „smrt indukující signální komplex“ - DISC (death inducing signaling complex). Komplex CD95L/CD95R váže pomocí adaptorové molekuly FADD (Fas-associated death domain protein) mnoho molekul prokaspázy 8, což vede ke vzniku aktivní kaspázy 8, procesem zvaným indukovaná blízkost. Aktivní kaspáza 8 pak štěpí mnoho různých

substrátů v buňkách a také prokaspázu 3, která vede k aktivaci úplného smrtícího programu buňky (Řezáčová, 2004).

### 2.1.1.2 Vnitřní cesta indukce apoptózy

Vnitřní cesta, nazývaná také mitochondriální, je druhou možnou cestou indukce apoptózy. Tato signální kaskáda je iniciována zejména v odpovědi na extracelulární podněty způsobující intracelulární poškození, například poškození molekul DNA. Je aktivována přes fosforylaci proteinu p53 a dále pak aktivací pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 (Bax, Bad, Bim a Bid).

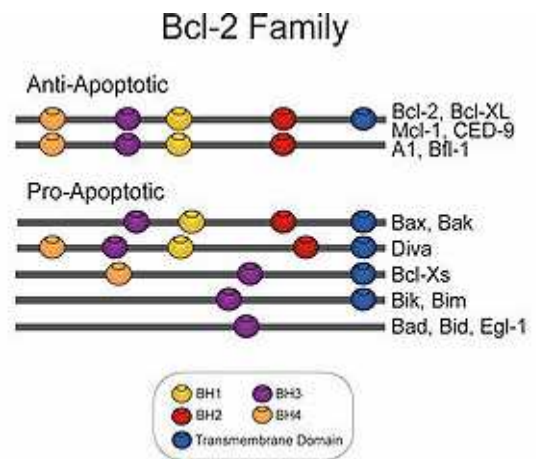
Proteiny rodiny Bcl-2 jsou klíčové regulátory kontrolující uvolňování cytochromu c a dalších faktorů z mitochondrií. Tyto polypeptidy mají významný vliv na apoptotický proces, mutace v genech pro Bcl-2 mohou mít závažné následky pro embryonální vývoj a patogenezi.

Proteiny této rodiny můžeme rozdělit to tří skupin:

a) Antiapoptické ( Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bf 11, Nrf3, Boo/Diva (Adams a Corry, 1998, Gross et al., 1999). Všechny tyto antiapoptické členové se vyznačují čtyřmi krátkými Bcl-2 homologními doménami (BH1-BH4), C-terminálními hydrofobními konci, kterými aktivují cytosolový povrch různých intracelulárních membrán.

b) Proapoptické Bax-příbuzné faktory smrti jako Bax, Bak, Bok/Mtd (Adams a Corry, 1998, Gross et al., 1999). Tyto proteiny jsou svou strukturou podobné první skupině, ale postrádají BH4 koncovou doménu, avšak mají diametrálně odlišný účinek.

Protein Bax z této podskupiny je schopen přivodit smrt buňky i v přítomnosti širokého spektra inhibitorů kaspáz. Bax se začlení do mitochondriální membrány a usnadní tak uvolnění cytochromu c. V odpovědi na integraci Bax do mitochondriální membrány dojde také k uvolnění endonukleázy G, což způsobí kondenzaci jaderného chromatinu a následnou apoptózu i v přítomnosti kaspázových inhibitorů.

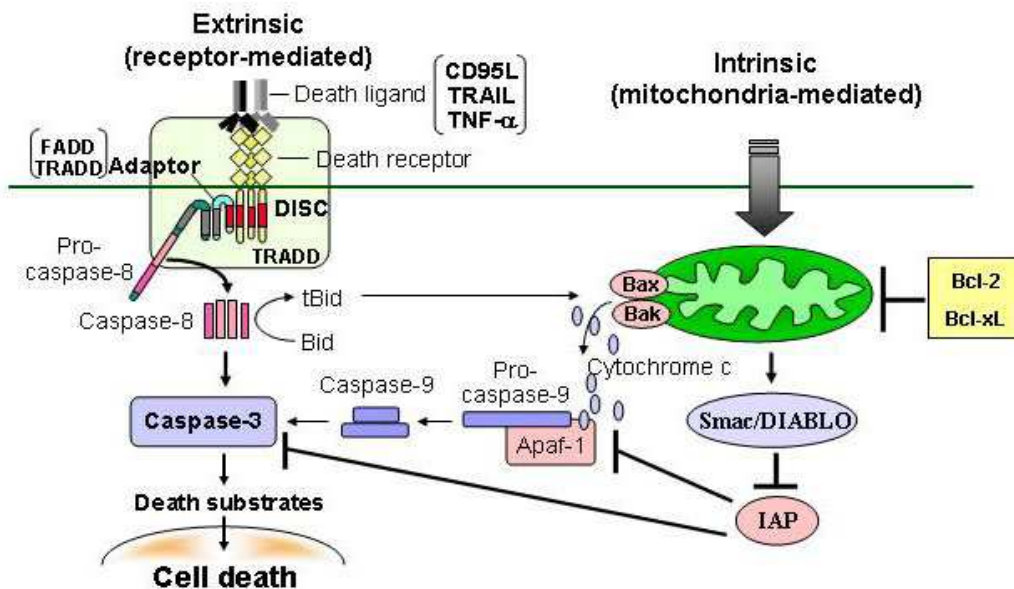


Obrázek 2.1: Převzato z wikipedia

c) BH3-příbuzné proapoptické faktory smrti mají jen doménu BH3: Bid, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, BimL/Bod, Bad, Noxa, PUMA/Bbc3 a Bmf . Proteiny této skupiny reagují na různé proapoptické signály (poškození cytoskeletu, DNA).

V nepřítomnosti smrtícího signálu je rodina Bcl-2 proteinů lokalizována odděleně na organelách. Anti-apoptičtí členové jsou součástí membránových struktur mitochondrií a endoplasmatického retikula. Pro-apoptičtí členové rodiny Bcl-2 jsou lokalizováni v cytosolu a cytoskeletu. Po přijetí smrtícího signálu dojde ke strukturálním změnám a pro- a proti- apoptičtí členové se setkávají na povrchu mitochondrií a tvoří homo a heterodimery, které představují práh, určující, zda buňka umře či nikoliv (Řezáčová, 2004). Proteiny z rodiny Bcl-2 regulují uvolnění cytochromu c, který pak aktivuje vlastní proces apoptózy. Dojde-li k převaze proapoptických členů, cytochrom c se uvolní z mitochondrií a vytvoří komplex s Apaf-1 a prokaspázou 9 (apoptozóm). Apoptozóm pak následně aktivuje prokaspázu 3. Aktivní kaspáza 3 pak štěpí cílové proteiny jako například lamin B a dochází pak k rozštěpení jádra na apoptické kousky (Řezáčová, 2007).

### Cesty indukce apoptózy:



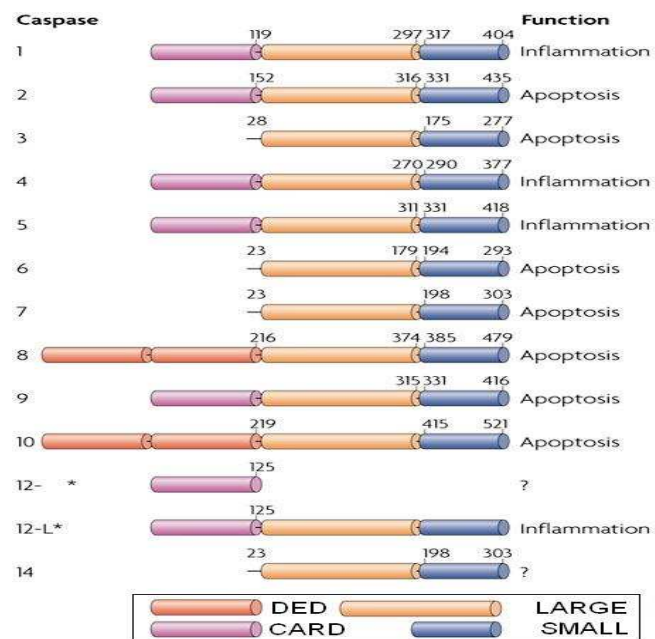
Obrázek 2.2 převzato z ([www.dkfz.de](http://www.dkfz.de))

### 2.1.2 Kaspázy

Kaspázy představují velkou rodinu cysteinových proteáz. Jednotlivé kaspázy se od sebe navzájem liší v primární struktuře aminokyselin a substrátové specifitě.

V intaktních buňkách mají tyto proteázy minimální aktivitu, jelikož jsou syntetizovány ve formě inaktivních proenzymů (Řezáčová, 2004), které vyžadují specifickou enzymatickou aktivaci. Tyto zymogeny jsou tvořeny N-koncovou prodoménou a velkou a malou podjednotkou. Mohou být rozděleny do dvou skupin - iniciátorové a efektorové. Mezi iniciátorové kaspázy řadíme kaspázu 8, 9, 10. Aktivní iniciační kaspázy se objevují na začátku receptorové i mitochondriální cesty a jsou charakterizovány přítomností rozsáhlých N-terminálních domén DED (death effector domain) nebo CARD (caspase recruitment domain), které přispívají k navození proteolytické aktivity (Rudolfová, 2008). Tyto kaspázy slouží především k aktivaci kaspáz efektorových. Mezi efektorové kaspázy patří kaspáza 3, 6, 7. Tyto kaspázy jsou zodpovědné za vlastní výkon apoptické smrti. Kaspázy selektivně štěpí cílové proteiny na jedné nebo několika málo pozicích. Rozštěpení specifických substrátů má za následek některé charakteristické znaky apoptózy např. štěpení jaderného laminu je zodpovědné za zmenšení jádra (Rao et al., 1996).

K aktivaci kaspázové kaskády může dojít dvěma cestami - vnější a vnitřní. Vnější cestou přes receptory buněčné smrti dochází především k aktivaci kaspázy 8, která následně aktivuje prokaspázu 3. Kaspáza 3 je pak odpovědná za vlastní apoptózu. Při aktivaci vnitřní cestou dochází nejprve k aktivaci kaspázy 9, především v důsledku uvolnění některých faktorů jako např. cytochromu c z aktivovaných mitochondrií. Kaspáza 9 aktivuje zejména prokaspázu 3 a výsledkem je opět apoptóza (Řezáčová, 2004).



Obrázek 2.3: upraveno dle [www.nature.cz](http://www.nature.cz)

## 2.2 ATM kináza a odpověď na poškození DNA

Jedná se o proteinkinázu, která je nepostradatelná pro kontrolu buněčného cyklu a opravu poškozené DNA. Tento 370 kDa velký fosfoprotein skládající se z 3056 aminokyselin patří do rodiny proteinů příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze (Rotman a Shiloh, 1999). Buněčná lokalizace ATM je variabilní, primárně je ovšem lokalizována v jádrech proliferujících buněk. Je aktivována zejména dvouřetězcovými zlomy (double strand breaks-DSBs) DNA, které mohou být způsobeny např. ionizujícím zářením nebo některými cytostatiky. ATM může být však aktivována i sloučeninami chromu (V), tyto sloučeniny sice nezpůsobují DSBs, ale dokáží aktivovat tuto kinázu (Yang *et al.*, 2003).

Úlohou ATM kinázy je zejména fosforylace dalších proteinů. Fosforylace těchto proteinů je nezbytná pro udržování genomické integrity, je významná pro správnou aktivaci kontrolních bodů (checkpoints) buněčného cyklu a pro zahájení opravy poškozené DNA. V kontrolních bodech je prováděn dohled nad správnou replikací genomu před spuštěním vlastního buněčného dělení. Tyto body představují bariéru, která chrání organismus před dělením a vznikem nových buněk s poškozeným genomem. Ztrátou této bariéry dochází k destabilizaci genomu, která je charakteristická pro nádorové buňky. ATM dále funguje při opravě DNA a regulaci apoptózy a je tedy klíčovým a kontrolním článkem buněčné odpovědi na vznik DSB (Khanna *et al.*, 2001).

Za normálních okolností je tato kináza přítomna v jádře ve formě nefosforylovaného dimeru (Bakkenist a Kastan, 2003). Při poškození DNA disociuje na monomer a je fosforylována na serinu 1981. Je obecně přijímáno, že se jedná o autofosforylaci, avšak není dosud jasné, jak dojde k přesmyku neaktivního dimeru na aktivní monomer.

U onemocnění ataxia-teleangiectasia je gen kódující tento enzym defektní. Jedná se o autozomálně recesivní poruchu charakterizovanou imunitní nedostatečností, neurodegenerací, náchylností k rakovině a citlivostí k ionizujícímu záření. Buňky s chybějící funkční ATM kinázou projevují defekty v opravách DNA, nedostatečnou inhibici buněčného cyklu a malý nárůst hladiny proteinu p53, což má za následek zvýšenou citlivost k ionizujícímu záření (Sun *et al.*, 2007).

Mezi cíle aktivované ATM kinázy patří p53, Mdm2 a Chk2, což má za následek blok v G1 fázi. Dále pak Nbs1, Chk2 a Chk1, tyto fosforylace jsou zodpovědné za hromadění buněk v S fázi. Dalším cílem je Chk1, Brca1 a hRad17, které zajišťují blok v G2 fázi (Řezáčová, 2004).



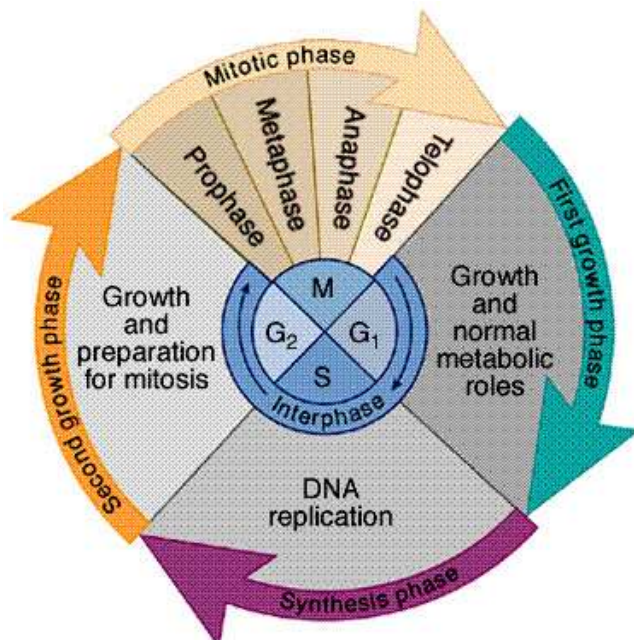
Mezi cíle této kinázy patří také histon H2AX v okolí DSB, tato fosforylace se pak šíří po sousedním chromatinu, na který se pak váží další proteiny potřebné pro reparační a smrtící procesy (Vávrová *et al.*, 2008).

ATM kináza fosforyluje také reparační proteiny jako je Brca1 (Breast cancer gene product) na serinu 1423, Nbs1 a c-Abl. Brca1 je fosforylován ATM nepřímo (přes Chk-2), aby se mohl následně spojit s proteinem Rad51 (Lee *et al.*, 2000). Ten katalyzuje ATP-dependentní párování a výměnu vláken mezi homologními úseky DNA a jeho aktivitu moduluje fosforylací další ATM podřízený substrát, c-Abl (Yuan *et al.*, 1998). c-Abl je onkoprotein, při jehož nedostatku nedochází k bloku v G1 ani G2 fázi buněčného cyklu a není iniciována apoptóza (Kharbanda *et al.*, 1998). c-Abl může také aktivovat stresem aktivované protein kinázy (SAPK) vedoucí k transkripční regulaci genů odpovídajících za stres.

### 2.2.1 Aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu

Buněčný cyklus je uspořádaný sled událostí, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřinné.

Během buněčného cyklu musí být genom zreplikován, organely a makromolekuly adekvátně zduplikovány a následně rozděleny do dvou dceřinných buněk.



**Obrázek 2.4** (převzato z [www.biologycorner.com](http://www.biologycorner.com))  
Obrázek ilustruje fáze buněčného cyklu

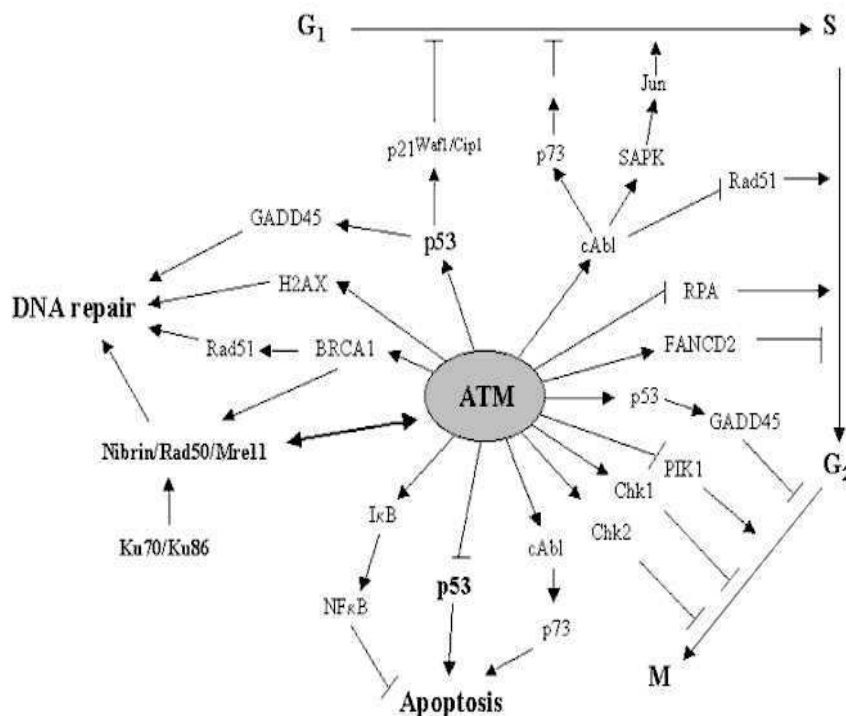
Buňka se připravuje na buněčné dělení během interfáze, která se skládá ze tří fází: G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> fáze (G z anglického *gap* = mezera) a S-fáze (syntetická). Buňka v nepříznivých podmínkách nebo při obdržení příslušných inhibičních extracelulárních signálů, může setrvat v G<sub>1</sub>-fázi nebo vstoupí do klidové G<sub>0</sub> fáze. V této fázi buňky obvykle nerostou a mohou v ní zůstat několik dnů, týdnů či měsíců. V G<sub>1</sub>-fázi buňka zvětšuje svoji velikost a zdvojují se organely.

Během S-fáze buňka replikuje DNA a syntetizuje specifické proteiny asociované s DNA. V G<sub>2</sub>-fázi probíhá syntéza proteinů potřebných pro vstup do mitózy.

Další fází je fáze mitotická - M-fáze, při níž dochází k rozdělení buňky na dvě buňky dceřinné. M-fáze zahrnuje jaderné dělení (mitózu) s následným cytoplazmatickým dělením (cytokinezí).

U eukaryotických buněk se vyvinula komplexní síť regulačních proteinů, které řídí průběh buněčného cyklu. Tato síť musí reagovat na velikost buňky, replikaci genomu a extracelulární signály. Musí být zajištěno zduplikování DNA a rozdělení buňky. Buňky si vyvinuly systém regulace založený na kontrolních bodech – specifická místa buněčného cyklu, kde buňka ověřuje, zda všechny předchozí události (např. DNA replikace) proběhly správně.

Poškození DNA aktivuje kontrolní body buněčného cyklu, které zpomalují vstup buňky buněčným cyklem, což poskytuje čas na opravu kritických poškození DNA. Kontrolní body jsou na třech místech buněčného cyklu: G<sub>1</sub>/S přechod, vstup přes S fázi a G<sub>2</sub>/M rozhraní.



**Obrázek 2.5:** (převzato z atlasgeneticsoncology.org)- Odpověď na dvouřetězcové zlomy DNA (DSBs). ATM ovlivňuje mnohé proteiny, které způsobí zástavu buněčného cyklu v kontrolních bodech, zvýšení opravy DNA a zabránění apoptózy.

### 2.2.1.1 Protein p53 a G1/S kontrolní bod

Lidský gen pro nádorově-supresorový protein p53 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17. Celková délka genu je přibližně 20kb a je složen z 11 exonů, z nichž jeden je nekódující, a 10 intronů. Tento fosfoprotein skládající se z 393 aminokyselin byl objeven roku 1979. Obsahuje 4 hlavní funkční domény. Na N-konci proteinu je transkripčně-aktivní doména, v centrální části je DNA-vazná doména a na C-konci se nachází oligomerizační a regulační doména (*Kotala et al., 2002*).

Protein p53 je jaderný transkripční faktor, který má schopnost působit proti nádorové transformaci buněk. U více než poloviny lidských nádorů dochází k delecii nebo mutaci v genu p53 (*Uldrijan et al., 2002*).

Protein p53 je považován za jeden z nejdůležitějších regulátorů odpovědi na nejruznější formy buněčného stresu. Je významný v několika fázích buněčného cyklu počínaje zástavou buněčného cyklu, přes inhibici replikace DNA, řízení diference, regulaci transkripce a reparace DNA. V případě rozsáhlého poškození DNA, které již nelze opravit, indukuje tento protein smrt buňky apoptózou a tím brání přenosu poškozené DNA do dceřiných buněk.

Aktivaci a stabilizaci proteinu p53 provází řada posttranslačních modifikací této molekuly zahrnujících fosforylaci na Ser-15, 20, 33, 37, 392, defosforylaci Ser-376 (*Waterman et al., 1998*) a acetylaci Lys-382 (*Sakaguchi et al., 1998*).

ATM zajišťuje fosforylaci proteinu p53 na Ser-15, dále pak nepřímo přes Chk2 kinázu na serinu 20 (*Chebab et al., 1999*). Pozdější udržení fosforylace na Ser-15 zprostředkovává ATR. Aktivace protein-kinázy C působením UV A záření (nikoliv však UV B a UV C) vede k fosforylaci p53 na serinu 371, 376, 378. Kasein kináza II vazbou na p53 v důsledku působení UV i ionizujícího záření fosforyluje p53 na serinu 392, zvyšuje tetramerizaci a reguluje na p53 závislou transkripční represi (*Sakaguchi et al., 1997, Szkanderová et al., 2003*). Dále je za potřebí k defosforylaci Ser-376, který tvoří vazebné místo pro proteiny 14-3-3. Spojení proteinu p53 s 14-3-3 postupně zvyšuje afinitu p53 k sekvenčně-specifické DNA (*Waterman et al., 1998*).

Důležitou molekulou pro degradaci p53 je Mdm2 onkoprotein. Exprese proteinu Mdm2 je transkripčně indukována proteinem p53, a protože se Mdm2 zároveň podílí na jeho degradaci, vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka, která omezí působení proteinu p53 jen na dobu nutnou pro iniciaci transkripce cílových genů (*Uldrijan et al., 2002*). Mdm2 se váže na N-terminální konec proteinu p53, potlačuje jeho aktivitu a

zprostředkovává jeho odstranění z jádra buňky. Takto označený protein p53 je předurčen k likvidaci v proteazómu.

Funkce Mdm2 je rovněž regulována pomocí fosforylací. Fosforylace katalyzovaná ATM kinázou vede k inaktivaci Mdm2 a akumulaci p53. Musí však být zdůrazněno, že indukce fosforylace na Ser-15 a akumulace p53 v A-T buňkách je sice zpomalena, však ne zcela zrušena. Toto pozorování ukazuje, že ATM kináza není jediná proteinkináza která indukuje p53 odpověď na buněčný stres (*Rotman a Shiloh, 1999*).

Dalším významným proteinem podílejícím se na degradaci p53 je komplex buněčného proteinu E6-AP (E6-associated protein) s onkoproteinem E6 některých lidských papilomavirů. V nepřítomnosti E6 se buněčný protein E6-AP na degradaci p53 nepodílí, ale interakce s E6 mění pravděpodobně jeho substrátovou specifitu a umožní tak ubikvitinaci p53. Předpokládá se, že tento mechanismus degradace p53 je jedním z kritických faktorů pro vznik karcinomu děložního čípku (*Uldrijan et al., 2002*).

G1/S kontrolní bod u savčích buněk je závislý na proteinu p53. Při poškození DNA se aktivita tohoto transkripčního faktoru zvyšuje. Efektem p53 na G1/S přechod je zvyšování exprese p21, což je inhibitor cyklin-dependentních kináz, které kontrolují vstup do S fáze.

Protein p21 je 164 aminokyselin dlouhý polypeptid a molekulové hmotnosti 21 kDa, který je lokalizovaný v jádře buňky. Za normálních fyziologických podmínek má protein p21 schopnost vytvářet komplexy s různými cyklin/CDK komplexy (N-koncová doména proteinu, aminokyseliny (1-80)) a s proliferačním jaderným antigenem PCNA (C-koncová doména proteinu, aminokyseliny 142-163). Tento proliferační jaderný antigen se účastní procesu replikace (jako součást DNA-polymerázy), rekombinace a reparace DNA. Interakce proteinem p21 brání PCNA vytvářet aktivní komplex s DNA-polymerázou, jehož přítomnost je nezbytná pro správný průběh replikace, nenarušuje však reparační funkce PCNA. Tímto mechanismem se tedy p21 podílí na inhibici syntézy DNA a navození zástavy buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě (*Pospíšilová, Vojtěšek, 2004*).

P21 je inhibitor cyklin-dependentních kináz, jež fosforylují a tím inaktivují retinoblastoma protein - RB. Funkce RB proteinu spočívá v negativní expresi transkripčního faktoru E2F, jež je nezbytný pro aktivaci transkripce genů specifických pro S-fázi. Nefosforylovaný RB protein váže E2F faktor a tím brání jeho vazbě na DNA (*Řezáčová, 2004*). E2F má však duální funkci. Jednak řídí vstup buněk do S fáze a

jednak při poškození DNA gama- nebo UV-zářením se váže na p53 a tím je iniciována apoptóza.

### 2.2.1.2 G2/M kontrolní bod

Blok buněčného cyklu v G2 fázi je důležitý pro opravu poškozené DNA před vstupem do mitózy (M fáze). Zástava cyklu v G2 fázi je zajištěna cestou na p53 závislou (p53 dokáže redukovat fosforylaci tyrosinu Cdc2) a na p53 nezávislou (například *Kastan et al., 1991*).

Mechanismus, kterým p53 reguluje G2/M kontrolní bod zahrnuje regulaci cyklin dependentní kinázy Cdc2, která je nepostradatelná pro vstup do mitózy (*Nurse, 1990*). K aktivaci Cdc2 jsou potřebné vazba k cyklinu B a fosforylace na threoninu 161 CDK-aktivační kinázou (CAK) (*Pines, 1995*). Během G2 fáze je komplex Cdc2/Cyklin B udržován v neaktivní formě díky fosforylaci Cdc2 na tyrosinu 15 a threoninu 14. Na začátku mitózy jsou obě tyto rezidua defosforylována pomocí fosfatázy Cdc25 (*Draetta a Eckstein, 1997*). Cdc2/Cyklin B pak může fosforylovat Cdc25, později aktivovat a iniciovat pozitivní zpětnovazebnou smyčku (*Izumi a Maller, 1993*). Fosforylace Cdc2 na tyrosinu může být redukována díky proteinu 53, nicméně tento účinek na aktivitu Cdc2 je závislý na buněčném typu (*Taylor a Stark, 2001*).

Dobře popsána je také p53-nezávislá cesta inhibice Cdc2 aktivity v odpovědi na DNA poškození. DNA poškození stimuluje aktivitu ATM a ATR, které aktivují Chk1 a Chk2, které poté fosforylují Cdc25, což způsobí vytvoření vazebného místa pro protein rodiny 14-3-3, které kotví Cdc25 v cytoplazmě, kde nemůže defosforylovat Cdc2/Cyklin B (*Kumagai a Dunphy, 1999*). Tak ATM a ATR inaktivují Cdc2 – snížením defosforylace na reziduích tyrosinu 15 a threoninu 14. Proto u A-T buněk selhává zástava v G2 fázi po ozáření před vstupem do mitózy.

Farmakologické odstranění G2 bloku po vystavení buněk cytotoxickému poškození může být jednou z terapeutických strategií ke zvýšení citlivosti nádorových p53 negativních buněk k danému agens. Mezi látky, které způsobují zkrácení G2 bloku buněčného cyklu, patří například kofein.

### 2.2.1.3 Kontrolní bod S fáze

Aktivace kontrolního bodu S fáze poškozením DNA je manifestována jako přechodná redukce syntézy DNA. Tato inhibice se projevuje regulací na úrovni iniciace replikace (*Larner et al., 1994*). Molekulární mechanismus, který signalizuje přítomnost poškození DNA replikačnímu aparátu zůstává zatím nejasný. Rychlá inhibice DNA syntézy během S fáze je ve vztahu s down-regulací aktivity cyklinA/Cdk2 komplexu. Molekulární jev, který spojuje ATM s inhibicí aktivity cyklinA/Cdk2 je nejasný, je však zřejmé, že pro regulaci zástavy cyklu v S fázi je ATM kináza nezbytná. ATM fosforyluje Chk1, Chk2 a Nbs1. Je možné, že Chk2 je zapojena do inhibice všech tří Cdc25 fosfatáz (A, B a C) (*Rotman a Siloh, 1999*).

Další potencionální efektor zástavy cyklu v S fázi je replikační protein A (RPA), heterotrimerický komplex s vysokou afinitou k jednovlákné DNA. RPA je potřebný pro DNA replikaci, rekombinaci a opravu. Podjednotka tohoto proteinu RPA2 je fosforylována Cdc2 na Ser-23 a Ser-29 během S a G2 fáze buněčného cyklu (*Rotman a Siloh, 1999*).

### 2.2.1.4 Check point kinázy

Mezi nejdůležitější proteiny, které se podílí se na zástavě cyklu v kontrolních bodech, patří Chk1 a Chk2, jejichž fosforylace ATM kinázou vede k inhibici funkce fosfatáz Cdc25A a Cdc25C odpovědných za průchod přes G1/ S a G2/M klíčové kontrolní body. Obě tyto serin/threonin kinázy jsou strukturně nepříbuzné, avšak jejich funkce se překrývají.

Chk1 je evolučně starou kinázou identifikovanou poprvé u kvasinek. Jde o labilní protein objevující se převážně v S a G2 fázi, její správná funkce má zásadní význam pro správný průběh buněčného cyklu u zdravých buněk. Chk1 brání hyperfunkci Cdc25A fosfatázy, protože přímým cílem této fosfatázy je komplex cdk2 s cyklinem E, jehož nekontrolovaná exprese vede k chromozomálním aberacím.

Chk1 kináza je po ozáření fosforylována pomocí ATM na serinech 317 a 345, což vede k její aktivaci. Její aktivace po poškození DNA nevyžaduje dimerizaci ani autofosforylaci. Chk1 kináza pak reguluje interakci mezi Cdc25c a proteinem 14-3-3, fosforylací Cdc25c na serinu 216 (*Graves et al., 2000*). Protein 14-3-3 odpovídá za export Cdc25 fosfatáz z jádra a jejich degradaci v cytoplasmě. Nefunkční Chk1 kináza tedy způsobí defektní odpověď na poškození DNA buňky. Buňka nevstoupí do bloku v S a G2 fázi a neumí odbourat Cdc25A fosfatázu a tak dochází k vzestupu hladiny

Cdc25A vysoko nad fyziologické hodnoty. Tento vzestup má významné následky pro průchod buněk buněčným cyklem, neprogramovanou syntézu DNA a pro buněčnou smrt.

Chk2 kináza je stabilní protein exprimovaný v průběhu celého buněčného cyklu. K její aktivaci dochází v důsledku odpovědi ATM/ATR na dvojité zlomy DNA. Aktivace této kinázy na rozdíl od Chk1 zahrnuje autofosforylaci a dimerizaci. Předpokládá se, že ATM fosforyluje threoninová a serinová rezidua v regulační části molekuly Chk2, zejména threonin 68. Fosforylace threoninu 86 je nezbytným předpokladem pro další aktivační krok, autofosforylaci Chk2 na tyrosinu 383 a 387 v aktivační kličce kinázové domény (Řezáčová, 2004).

Cdc25A fosfatáza je protoonkogenem regulujícím buněčný cyklus. Ve zvýšené míře je exprimována v agresivních tumorech a je cílem Chk1 a Chk2 kináz, které působí jako tumor supresory. Tyto tumor supresory (Chk1 a Chk2 kináza) jsou často mutovány u nádorových buněk (Řezáčová, 2004).

### 2.3 Reparace dvouvlákných zlomů DNA

V reparačních procesech dvouvlákných zlomů DNA převládají dva základní mechanismy. Prvním mechanismem je homologní rekombinace (HR) a druhým je nehomologní rekombinace (nehomologous end-joining, NHEJ).

K homologní rekombinaci dochází zejména v G2/M fázi buněčného cyklu v místě replikační vidličky. Tento typ reparačního procesu využívají především jednoduché organizmy jako jsou kvasinky. Homologní rekombinace používá homologickou DNA sesterské chromatidy jako matici pro znovuspojení DSB, to umožňuje opravit a správně spojit poškozené konce DNA. Je realizována především přes proteinový komplex Mre11/Rad50/Nbs1. K HR jsou dále nutné zejména proteiny Rad52, Rad51 a jeho homologní proteiny - XRCC2 a 3. Aktivita Rad51 může být přímo stimulována Rad54 a DNA-dependentní-ATPázou. Existuje i možnost přímé interakce Rad51 a XRCC3. Tyrosinkináza cAbl moduluje aktivitu Rad51 pomocí fosforylace. Zde existuje i spojení s ATM, která po poškození DNA způsobuje fosforylaci BRCA1 a c-Abl (Vávrová *et al.*, 2008).

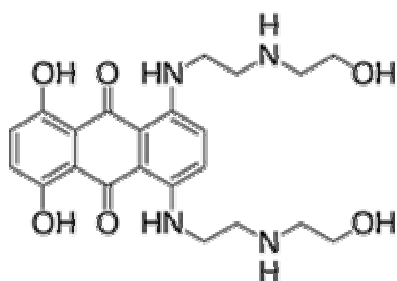
NHEJ je zodpovědná za reparaci ve všech fázích buněčného cyklu. Tento systém není schopný přesně rozpoznat, které části mají být spolu spojeny, což může vést k široké škále změn ve struktuře DNA. NHEJ je důležitá především pro vyšší

eukaryotní organizmy. V procesu reparace pomocí NHEJ jsou důležité především DNA-dependentní proteinkinázy, heterodimer Ku70 a Ku80, DNA-ligáza IV a XRCC4.

Zatímco NHEJ reparace je rychlý proces, HR je relativně pomalejší. Funkce ATM je spojena s HR, což dokazuje, že ATM kontroluje především klíčový kontrolní bod pro HR a že NHEJ reparace není závislá na bloku buněk v klíčových kontrolních bodech (Řezáčová, 2004).

V buněčné odpovědi na poškození DNA jsou důležité také geny Brca1 a Brca2, mutace spojené s těmito geny jsou v souvislosti s větší predispozicí ke karcinomům prsu (Martin a Weber, 2000). Buňky s mutacemi Brca1 a Brca2 špatně reparují DSB.

#### 2.4 Mitoxantron (mitoxantroni dihydrochloridum, MTX)



**Obrázek 2.6**  
Strukturní vzorec MTX

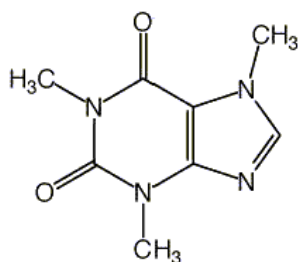
Mitoxantron, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]9,10-antracendion dichlorid, je pevnou tmavě modrou krystalickou látkou rozpustnou ve vodě, která se podobá svou chemickou strukturou antracyklinovým antibiotikům a má i podobný mechanismus účinku (interkalace a účinek na topoizomerázu II). To vede ke zlomům molekuly DNA a k poruchám transkripce i replikace DNA před rozdělením buňky. Mimo to se na cytotoxickém účinku

může podílet i jeho pevná vazba na cytoskeletální protein cytokeratin 8. MTX na rozdíl od antracyklinů nepůsobí tvorbu kyslíkových radikálů, přesto však má toxické účinky na myokard. Z hlediska buněčného cyklu patří mezi nesespecifická cytostatika, s určitou převahou inhibice ve fázi G2. V plazmě se rychle váže na proteiny a proniká do krevních elementů.

Používá se k indukční léčbě akutní myeloblastické leukémie (v kombinaci s cytarabinem), jako cytostatikum druhé volby u Hodgkinovy choroby a nehodgkinských lymfomů. Ze solidních nádorů je nejčastější indikací karcinom prsu a karcinom ovaria. Doplnkovým lékem může být též u sarkomů měkkých tkání, u mezoteliomu, karcinomu žaludku, u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu močového měchýře (Klener, 1996).



## 2.5 Kofein jako inhibitor ATM kinázy



**Obrázek 2.7**  
Strukturní vzorec  
kofeinu

Jedná se o alkaloid s purinovým jádrem (1, 3, 7-trimethylxanthin), který je obsažen v celé řadě produktů jako je káva, čaj či kakao. Kofein je schopný rušit zástavu buněčného cyklu v G2 fázi v odpovědi poškození DNA. Díky schopnosti rušit blok v G2 fázi byl používán k identifikaci role p53 v G2 kontrolním bodu. Bylo zjištěno, že kofein dokáže inhibovat G2 blok i u buněk, kterým chybí p53, proto lze usuzovat, že působí mechanismem na p53 nezávislým. (Řezáčová, 2004). Kofein zamezí reparaci v G2 fázi a má radiosenzibilizující efekt, především u buněk, kde je poškození reparováno mechanismem homologní rekombinace (Řezáčová, 2004).

Mechanismus působení kofeinu není zcela znám. Podle starších teorií autorů Tempela & Zallingera (1997) je efekt kofeinu pravděpodobně podložen tvorbou aduktů s DNA. V současné době však převládá názor, že kofein inhibuje ATM a také ATR kinázu. Míra inhibice ATM je závislá na koncentraci kofeinu. Většina jeho fyziologických účinků je vysvětlována interakcí s cAMP fosfodiesterázou (Kaufmann *et al.*, 2003).

## 2.6 Buněčná linie MOLT-4

Buňky hematopoetické nádorové linie MOLT-4 jsou odvozeny od lidské T-lymfocytární leukémie. Buňky MOLT-4 mají wild formu proteinu p53 (Szkanderová *et al.*, 2003) a dojde-li k apoptóze v důsledku ozáření, je podobně jako u T-lymfocytů navozena apoptóza vnitřní (mitochondriální) cestou (Řezáčová *et al.*, 2005).

Tato buněčná linie je vhodným modelovým systémem pro studium molekulárních mechanismů apoptózy u T-lymfocytů a leukémií. T-lymfocyty patří do skupiny leukocytů pocházejících z lymfoidní linie. Nacházejí se v krvi, lymfě a lymfatických tkáních. Jedná se o buňky podílející se na správné funkci imunitního systému. Hlavní část vývoje T-lymfocytů probíhá v thymu. Thymus opouštějí dvě hlavní subpopulace: prekurzory pomocných T-buněk ( $T_H$ ), které mají na povrchu receptor CD4 a prekurzory cytotoxických T-buněk ( $T_C$ ), které mají místo receptoru CD4 receptor CD8 (Hořejš a Bartůňková, 2005). Specificky rozpoznávají antigen a i jako zralé buňky si zanechávají proliferační potenciál. Charakteristickou vlastností zralých lymfocytů je schopnost cirkulace mezi krví a lymfou.

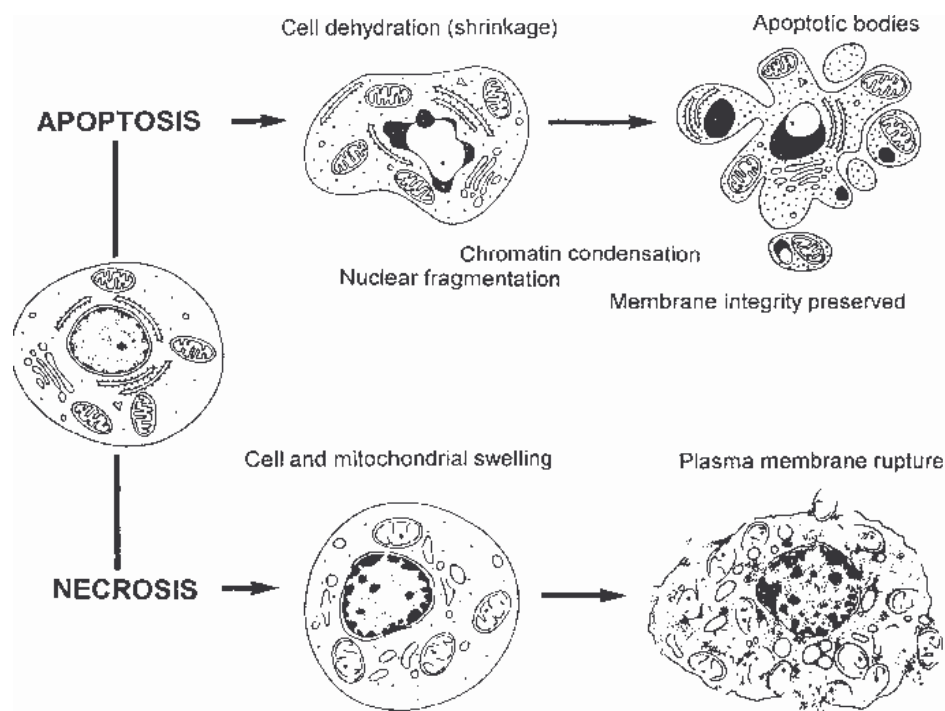
## 2.7 Metody detekce apoptózy

V posledních letech je apoptóza velice diskutovaným tématem buněčné smrti, proto i zájem o metody detekce je veliký, zejména v oblasti onkologie a imunologie. Tento zájem vychází zejména z faktu, že apoptóza se objevuje fyziologicky, nebo je manifestací patologického stavu, je aktivním regulovatelným postupem buněčné smrti. Zájmem onkologie je především zjistit, jaká je spontánní schopnost jednotlivých nádorových buněk hynout apoptózou i schopnost protinádorových látek tuto apoptózu navodit. Agresivita nádoru může být totiž spojena se změnami schopnosti buněk prodělat apoptózu. Strategií onkologie je je modulovat citlivost nádorů a normálních buněk k protinádorovým látkám tak, aby došlo ke zvýšení účinnosti léčby a snížení toxicity na normální tkáň.

V současné době existuje mnoho metod umožňujících sledování buněčné smrti. Výběr určité metody pro monitorování apoptózy (nekrózy) závisí zejména na buněčném systému a způsobu jakým byla apoptóza vyvolána a v neposlední řadě také na technických a finančních možnostech pracoviště.

K detekci apoptózy se využívá změn, ke kterým v jejím průběhu dochází. Typicky se rozvíjí dehydratace, v důsledku níž dochází ke ztrátám intracelulární vody a tím ke změně tvaru buňky (svraštění). Další změnou je kondenzace jaderného chromatinu. Je-li DNA kondenzovaná, vykazuje pak chromatin hyperchromazii a barví se více fluorescenčními nebo světlo absorbujícími barvami. Dalším využívaným znakem je narušení jaderné membrány, štěpení laminu, aktivace endonukleáz, zachování funkce plazmatické membrány, ztráta její asymetrie a další.

Apoptóza je charakterizována aktivní účastí buněk na své destrukci, oproti tomu nekróza je pasivní degradační proces. Časné známky nekrózy jsou spojené se zvětšením mitochondrií následovaným prasknutím plazmatické membrány a uvolněním proteolytických enzymů. Nekróza vyvolává zánětlivou reakci a může v tkáních vést k tvorbě jizev.



**Obrázek 2. 8:** Převzato od *Darzynkiewicz et al., 1997*

Schéma ilustruje morfologické a biochemické změny během apoptózy a nekrózy

### 2.7.1 Metody využívající mikroskopu

Apoptózu je možné definovat jako sled událostí vedoucí ke změnám tvaru buňky, jako svaštění v důsledku dehydratace, tvorba výčnělků na cytoplazmatické membráně (tzv. „blebs“), jaderná fragmentace, tvorba apoptických tělísek a následná desintegrace buňky. Většina morfologických metod je založena na vizualizaci produktů intranukleozomálního štěpení DNA. Procentuální zastoupení buněk s morfologickými znaky apoptózy je možno počítat např. na cytospinových preparátech barvených Gimsovým barvivem (*Kravtsov et al., 1999*).

Velmi spolehlivou metodou detekce apoptózy je pozorování fragmentace DNA pomocí elektronového mikroskopu.

### 2.7.2 Metody využívající průtokového cytometru

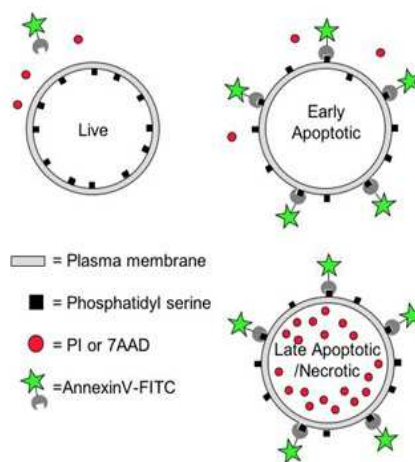
Průtoková cytometrie umožňuje rychlou, objektivní a kvantitativní metodu pro studium buněčné smrti

Morfologické změny, ke kterým během apoptózy dochází mají souvislost se změnami rozptylu světelného signálu v průtokovém cytometru. Analýza rozptylu světla poskytuje informaci o velikosti a struktuře buňky. Intenzita světelného rozptylu v předním směru (forward scatter - FS) dobře koreluje s velikostí buněk a intenzita

světelného rozptylu měřená v pravém úhlu (side scatter - SS) koreluje s granularitou buněk. Zatímco buněčná nekróza je spojena s počátečním zvětšením a následným rychlým poklesem schopnosti buněk rozptylovat světlo jak ve směru FS, tak ve směru SS, během apoptózy se ukazuje zmenšení rozptylu světla ve směru FS, které však na rozdíl od nekrózy není paralelně spojeno s poklesem SS. Naopak u některých buněk dochází k přechodnému zvětšení granularity (SS).

Změny světelného rozptylu nejsou však specifické pouze pro apoptózu. Zmenšenou schopnost rozptylovat světlo mají i mechanicky rozbité buňky, izolovaná jádra a nekrotické buňky. Identifikace apoptózy a nekrózy pomocí změny rozptylu světla však přináší kontrolu a může doplnit další specifické zkoušky.

Další metodou využívající průtokové cytometrie je detekce apoptózy pomocí Annexinu V a PI (propidium jodid). Annexin se specificky váže na fosfatidylserin, který je za normálních okolností na vnitřní straně buněčné membrány. V časně fázi apoptózy dochází ke ztrátě fosfolipidové asymetrie a tím k expozici fosfatidylserinu na vnější stranu membrány, a proto může být detekován pomocí Annexinu V konjugovaného s fluoresceinem. Barvením buněk s kombinací fluorescein-Annexin V a PI je možné rozlišit živé buňky (negativní na Annexin i PI), časně apoptické buňky (pozitivní na Annexin a negativní na PI), pozdě apoptické buňky (pozitivní na Annexin i PI).



**Obrázek 2. 9:** Převzato z [www.dundee.ac.uk](http://www.dundee.ac.uk)

Průtoková cytometrie může být také využita pro analýzu obsahu DNA. Jedním ze základních znaků apoptózy je štěpení DNA. Při apoptóze dochází k aktivaci endonukleáz, které preferenčně štěpí DNA v internukleozomální (spojovací) sekci (Vávrová *et al.*, 2002). Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství DNA v buňce a z tohoto důvodu vznik tzv. „sub-G1 vrcholu“, který tvoří buňky apoptické

(Vindelov, 1977; Darzynkiewicz, 1995). Stupeň degradace DNA závisí na stavu apoptózy a také na typu buněk a látek, které apoptózu vyvolaly. Měření obsahu DNA v buňce dále dává informace o pozici živých buněk v buněčném cyklu. Je však nutné si uvědomit, že sub-G1 vrchol může vedle apoptických buněk obsahovat i buňky mechanicky poškozené buňky nebo buňky s odlišnou strukturou chromatinu (např. buňky jdoucí do erytroidní diference), které mohou mít také nižší obsah DNA.

K barvení DNA po permeabilizaci buňky ethanolem se používá většinou PI, který se kvantitativně interkaluje mezi baze DNA.

Dalším znakem apoptózy, který je využíván pro její detekci, jsou změny na mitochondriích. Časným znakem apoptózy je pokles mitochondriálního transmembránového potenciálu, v jehož důsledku dojde k poklesu akumulace rhodaminu 123 v mitochondriích. Tato událost je spojena se vzestupem produkce superoxidových aniontů a zvýšením obsahu redukované formy buněčného glutaminu. Produkt bcl-2 genu hraje pravděpodobně kritickou úlohu v prevenci poklesu transmembránového potenciálu během apoptózy.

K detekci apoptózy lze také použít stanovení mitochondriálního membránového antigenu APO 2.7, který se objevuje na mitochondriální membráně při indukci apoptózy.

Dále mohou být značeny pro průtokovou cytometrii lysozomy. Lysozomy značíme pomocí AO (akridinová oranž). Příjem tohoto barviva lysozomy živých buněk se projeví červenou fluorescencí. Příjem barviva je výsledkem funkce aktivní protonové pumpy lysozómů. Mrtvé buňky s nízkou koncentrací AO pak vykazují pouze nízkou zelenou a minimální červenou fluorescencí. Tato zkouška je užitečná pro buňky, které mají vysoký počet aktivních lysozómů, jako jsou například monocyty a makrofágy (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

### **2.7.3 Metody využívající western-blot analýzy**

Při apoptóze dochází ke změnám v expresi různých proteinů, které můžeme detekovat po elektroforetickém rozdělení pomocí western-blot analýzy.

Jednou skupinou sledovaných peptidů mohou být kaspázy. Kaspázy se po aktivaci apoptickým signálem rozdělí na aktivní štěpy 20 a 17 kDa (Inanami *et al.*, 1999), které následně štěpí specifické proteinové substráty v místě kyseliny aspargové. Mezi tyto cíle patří např. poly-(ADP-ribose)-polymeráza (PARP) a jaderný lamin. Laminy jsou dobře charakterizovanou skupinou proteinů a jsou fragmentovány zejména

působením kaspázy 6 (Vávrová *et al.* 2002). Lamin B je protein s molekulovou hmotností 76 kD a ionizujícím zářením je degradován na fragmenty velikosti 28 kD. Štěpení laminu je zodpovědné za kondenzaci chromatinu v apoptických buňkách.

Western-blot analýza může být využita i k zjišťování změny exprese různých proteinů. Jedním z nejvíce sledovaných proteinů v souvislosti s apoptózou je protein p53 a jeho fosforylované formy p53<sub>392</sub> a p53<sub>15</sub>, přičemž při vstupu buněk do apoptózy dochází k zvyšování jejich exprese. Dále může být sledována exprese proteinu p21, proteinů rodiny Bcl-2, např. Mcl-1, MAPKináz, např. Erk1/2 a dalších.

### 3. Metodická část

#### 3.1 Materiál a metodika

##### 3.1.1 Kultivace a pasážování buněk MOLT-4

Linii MOLT-4 tvoří buňky T-lymfocytární leukémie, které jsme získali z American Type Culture Collections (Manassas, VA, USA). Pro kultivaci buněk MOLT-4 jsme používali Iscovu modifikaci Dulbecova media suplementovaného 20 % fetálního telecího séra, glutaminem a antibiotiky.

✓ Kultivační medium:

Příprava 50 ml kompletního kultivačního media IMDM:

Fetální telecí sérum FTS.....	10 ml
Glutamin.....	0,5 ml (20 mM glutaminu)
Penicilin+Streptomycin.....	0,5 ml (směs ATB Sigma)
Medium Sigma.....	39 ml

Pasážování, viabilita:

Počítání buněk: Do zkumavky jsme napipetovali 50  $\mu$ l trypanové modři a 50  $\mu$ l buněčné suspenze. Důkladně jsme protřepali, suspenzí naplnili Bürkerovu komůrku a spočítali buňky v padesáti čtvercích. Výsledek je počet buněk  $\cdot 10^4$ /ml. Mrtvé buňky mají porušenou cytoplasmatickou membránu, kterou může pronikat trypanová modř, a proto se barví modře.

Buňky jsme pasážovali každý druhý den, vždy jsme je naředili kultivačním médiem do výsledné koncentrace  $2 \cdot 10^5$  buněk/ml. Asi po dvaceti pasážích jsme rozmrazili další zkumavku a používali nové buňky.

##### 3.1.2 Mitoxantron (mitoxantroni dihydrochloridum - MTX)

Z mitoxantronu (MW= 517,4 g/mol, rozpustnost ve vodě až 5 mg/ml) SigmaAldrich, jsme připravili zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l (1,3 mg MTX do 2,5 ml sterilní vody). Dalším ředěním zásobního roztoku jsme si připravili pracovní 1  $\mu$ mol/l roztok (10  $\mu$ l 1 mmol/l naředit 990  $\mu$ l sterilní vody). Z tohoto naředěného pracovního roztoku jsme odebírali vypočtené objemy do kultivačních rakviček, abychom dosáhli požadovanou finální koncentraci MTX.

### 3.1.3 Kofein (inhibitor ATM kinázy)

Z kofeinu (MW = 194,19 g/mol) jsme připravili zásobní roztok o koncentraci 0,02 mol/l (195 mg kofeinu do 50 ml IMDM-bez séra). V pokusech jsme používali kofein o výsledné koncentraci 2 mmol/l (1 ml zásobního roztoku na 10 ml média). Kofein jsme aplikovali 45 minut před přidáním MTX.

### 3.1.4 Průtoková cytometrie (flow cytometry)

Průtoková cytometrie je metoda umožňující analyzovat velké množství částic (buněk) v suspenzi na základě různých přesně definovaných parametrů (fyzikální, chemické vlastnosti, struktury, které lze označit monoklonální protilátkou). Nejčastěji detekovaným parametrem je rozptyl světla v malém úhlu – čelní rozptyl (FS), rozptyl světla v 90° úhlu – boční rozptyl (SS) a fluorescence různé vlnové délky. Buňky, které jsou obarvené fluorochromem, jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny (shear fluid). Fluorescence se excituje paprskem světla – nejčastěji argonovým laserem.

- **Analýza obsahu DNA**

Jedním ze základních znaků apoptózy je štěpení jaderné DNA. V časných fázích apoptózy dochází k aktivaci endonukleáz, které preferenčně štěpí DNA v internukleozomální (spojovací) sekci. Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství buněčné DNA a vznik tzv. „sub-G1 vrcholu“, který tvoří buňky apoptotické. Ke stanovení množství DNA v buňce jsme používali propidium jodid (PI). PI je interkalační barvivo, které se váže kvantitativně mezi baze DNA. PI se do buňky dostane díky permeabilizaci pomocí 70% ethanolu.

Přibližně  $5 \cdot 10^5$  kontrolních a ovlivněných buněk v suspenzi jsme 2x promyli ledovým fosfátovým pufrům (PBS) a permeabilizovali 70% ethanolem (alespoň 30 minut, nejlépe však 24 hodin). Odstranili jsme etanol centrifugací při 2300 otáčkách (15 minut). Slili supernatant a buňky jsme promyli fyziologickým roztokem a PBS. Opět jsme slili supernatant a přidali 0,5 ml citrát-fosfátového pufru a nechali 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Dále jsme do zkumavky přidali asi 3 ml PBS a centrifugovali při 2300 otáčkách (15 minut). Důkladně jsme slili supernatant a přidali 0,5 ml Vindelova roztoku a nechali inkubovat 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Suspenzi jsme přelili do kyvetky a proměřili na flow cytometru.



Výsledky jsme zpracovali pomocí programu WinMDI2.8 a programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systém, San Diego, USA) a stanovili jsme procentuální zastoupení v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

✓ **Použité roztoky:**

Citrát-fosfátový pufr pH 7,8:

0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....192 ml (14,32 g na 200 ml vody)

0,1M kyselina citronová.....8 ml (0,21 g na 10 ml vody)

Po smíchání uložit v lednici, ale před použitím vždy včas vyjmout, aby se rozpustily vysrážené krystaly.

Vindelův roztok: 1M TRIS.....1 ml.....1,2114 g/ 10ml

RNáza.....1 mg/1ml PBS

NaCl.....60 mg

PI.....5 mg/ml PBS

Doplnit do 100ml vodou, uchovávat v lednici ve tmě.

• **Měření Annexinu a PI**

Annexin se specificky váže na fosfatidylserin, který je za normálních okolností na vnitřní straně buněčné membrány. V časné fázi apoptózy dochází k expozici fosfatidylserinu na vnější stranu membrány a proto může být detekován pomocí Annexinu V konjugovaného s fluorochromem. Ke značení jsme používali kit Apoptest (Dako) s Annexinem konjugovaným s fluoresceinisothiokyanátem (FITC).

Barvením buněk kombinací Annexin V-FITC a propidium jodid (PI) je možné rozlišit živé buňky (negativní na Annexin i PI), časně apoptotické buňky (pozitivní na Annexin a negativní na PI), pozdě apoptotické buňky (pozitivní na Annexin i PI).

Asi  $5 \cdot 10^5$  ovlivněných buněk jsme zcentrifugovali (1100 ot., +4 °C), supernant jsme slili, buňky jsme promyli 2 ml PBS a znovu centrifugovali (1100 ot., + 4 °C). Naředili jsme vápenatý pufr a k buňkám jsme přidali 90 µl ledového vápenatého pufru, 1 µl annexinu, 2,5 µl propidium jodidu a inkubovali 10 minut na ledu ve tmě. Na závěr inkubace jsme přidali 500 µl vápenatého pufru. Suspenzi jsme přelili do kyvetek a proměřili na průtokovém cytometru (pokud možno hned).

✓ **Použité chemikálie a roztoky:**

✓ ANNEXIN V-FITC Kit (Apoptest, Dako)

Set obsahuje: Annexin V-FITC 100  $\mu$ l

Vápenatý pufr 10x koncentrovaný 3 x 1,7 ml – ředit 1 díl pufru +  
9 dílů destilované vody – připravuje se vždy čerstvý  
Propidium jodid 250  $\mu$ l – rozpustit v 1 ml deionizované vody

### **3.1.5 Elektroforéza a Western blotting**

Elektroforéza je metoda založená na migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku se v průběhu separace vytvářejí oddělené zóny se separovanými složkami. K nejpoužívanějším elektroforetickým technikám v současnosti patří elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE).

Velkého rozšíření se PAGE dočkala v kombinaci s užitím aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS – PAGE). SDS se pevně váže k proteinům a mění jejich tvar do válcovité podoby. Vysoký negativní náboj navázaného SDS překrývá vlastní náboj proteinu a výsledné komplexy SDS – bílkovina pak mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný tvar. Následkem toho se při SDS – PAGE proteiny dělí na principu „molekulového síta“, tzn. jejich pohyblivost klesá se stoupající molekulovou hmotností.

Western blotting je technika umožňující přenos elektroforézou separovaných proteinů na membránu (v našem případě polyvinylidenfluoridovou). Následně dojde k hybridizaci s příslušnými protilátkami a k vizualizaci sledovaných proteinů pomocí chemiluminiscenčního kitu. Denzita byla hodnocena pomocí programu Bio-Rad Laboratories Quantity One 1-D Analysis Software.

- **Lýza buněk**

Potřebujeme  $10^7$  buněk, které máme obvykle v objemu 20 ml.

Buňky jsme centrifugovali 10 minut při 1300 otáčkách (+4  $^{\circ}$ C), následně jsme slili supernatant a k sedimentu přidali 5 ml PBS s 1 mM orthovanadičnanem sodným, poté jsme opět suspenzi centrifugovali 10 minut při 1300 otáčkách (+4  $^{\circ}$ C). Po centrifugacím jsme důkladně supernatant slili a k sedimentu přidali 0,5 ml ledového lyzovacího pufru (denně čerstvý nebo zmražený). Suspenzi jsme důkladně protřepali a

inkubovali 30 minut na ledu při důkladném protřepání na vortexu každých 5 minut. Takto vzniklý lyzát jsme resuspendovali injekční 2 ml stříkačkou a přendali do ependorfky. Resuspendovaný lyzát jsme centrifugovali 30 minut při 14000 otáčkách (+4<sup>0</sup> C, centrifuga BR4) a nakonec jsme supernatant slili do kryozkumavky a zamrazili při -80<sup>0</sup> C.

✓ **Lyzovací pufr**

137 mM NaCl 800,6 mg

10% glycerol 10 g

1% oktyl-B-D-glukopyranosid 2 ml

50mM fluorid sodný 210 mg

Doplnit do 100 ml 20 mM Trisem pH 8,0 (242,28 mg/100 ml)

Takto připravený lyzovací pufr jsme rozplnili po 10 ml do zkumavek a zamrazili. Před použitím jsme ho rozmrazili a přidali 1 tabletu COMPLETE MINI (Roche) a 10µl orthovanadičnanu sodného.

• **Stanovení bílkoviny a příprava vzorků**

Stanovení je založené na reakci peptidové vazby s kyselinou bicinchoninovou a Cu<sup>2+</sup> za vzniku barevného produktu.

Do mikrotitrační destičky TTP (96 jamek) jsme napipetovali reagentie v pořadí: voda, vzorek (resp. protein standard BIORAD), pracovní roztok, nechali inkubovat 30 minut při 37 °C a proměřili absorbanci při 562 nm na TECAN INFINITE M200. Z naměřených dat jsme sestavili kalibrační křivku a z rovnice přímky jsme si vypočítali potřebná množství pro pipetování vzorků (vzorky se nanáší tak, aby množství bílkoviny bylo v každé jamce stejné - 20 µg).

Pracovní roztok (WS): roztok CuSO<sub>4</sub> : BCA = 1:50

Koncentrační řada standardů: (každý standard v duplikátu)

	protein standard [µl]	destilovaná voda [µl]	WS [µl]
S1	0	10	200
S2	2	8	200
S3	4	6	200
S4	6	4	200
S5	8	2	200
S6	10	0	200

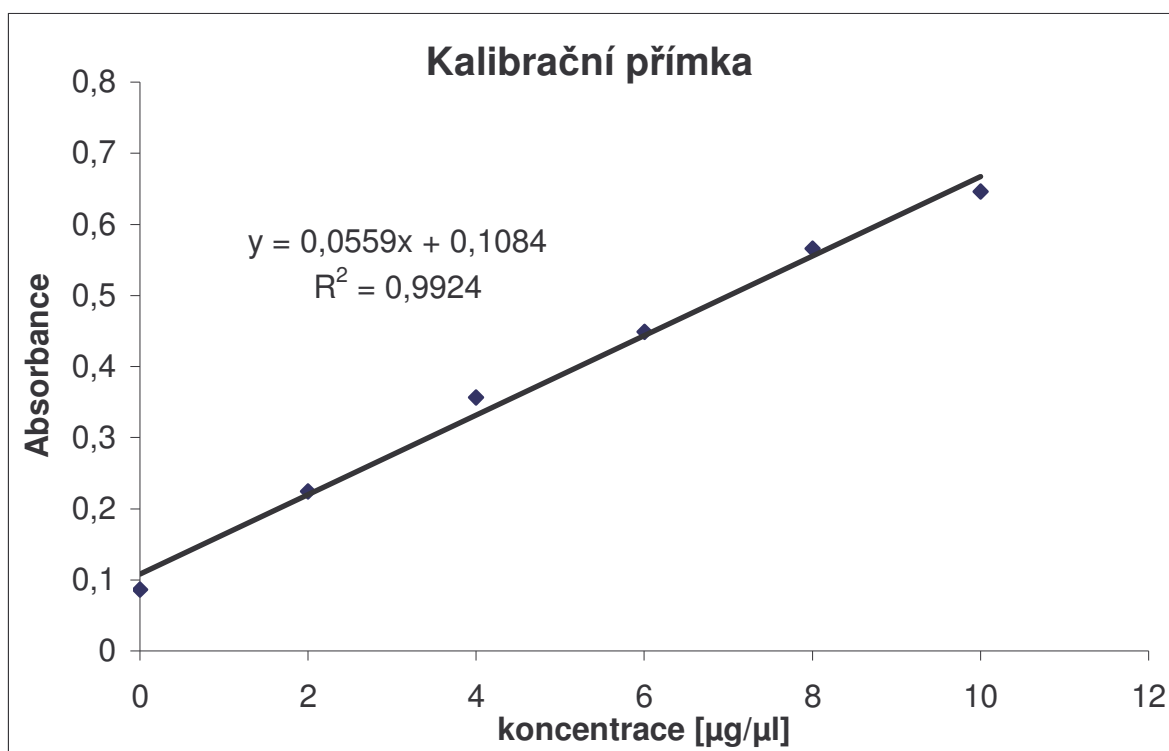
Vzorek: (každý vzorek v tripletu)

1 μl vzorku

9 μl destilované vody

200 μl WS

Výpočet pipetovaného množství nanášeného vzorku z rovnice přímky:  $y = 0,0559x + 0,1084$ ,  $R^2 = 0,9924$  ( nanáška vzorku na elektroforézu byla 20 μg).



Graf 3.1.5.1 Kalibrační přímka standart pro stanovení celkové bíkoviny

	4 hodiny			
	kontrola	0,5 nM MTX	kofoein	kofoein+ MTX
Absorbance	0,255	0,2589	0,2518	0,2344
Vypočtený nanášený objem [μl]	11,44	11,14	11,69	13,31

	24 hodin			
	kontrola	0,5 nM MTX	kofoein	kofoein+ MTX
Absorbance	0,2833	0,2218	0,2142	0,2145
Vypočtený nanášený objem [μl]	9,59	14,78	15,85	15,80

Příprava vzorků:

Rozmrazili jsme marker molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein™ Standards, BIORAD nebo Prestained SDS-PAGE Standards, BIORAD) a vzorky. Pro elektroforézu jsme používali nanášku 20 µg vzorku, kterou jsme si vypočítali z kalibrační přímky a naměřených absorbancí. Ke každému vzorku jsme přidali 3krát koncentrovaný vzorkový pufr s β-merkapt ethanolom v poměru 2:1. Takto připravené vzorky jsme důkladně vortexovali a 5 minut zahřivali ve vodní lázni na 95 °C. Na závěr jsme je stočili krátkým impulsem SHORT (10 s) na centrifuze MPW.

- **Příprava gelu – rozpis na 2 gely**

Rozdělovací 12%		Zaostřovací 4%	
dH <sub>2</sub> O	5,0 ml	dH <sub>2</sub> O	3,05 ml
TRIS pufr 1,5M pH 8,6	3,75 ml	TRIS pufr 0,5M pH 6,8	1,25 ml
Akrylamid (30% roztok) + 0,8% BIS	5,0 ml	Akrylamid (30% roztok) + 0,8% BIS	0,65 ml
SDS	75 µl	SDS	75 µl
APS	37,5 µl	APS	37,5 µl
TEMED	5 µl	TEMED	3,75 µl

Elektroforézu jsme prováděli v zařízení MiniProtean3 od firmy BioRad. Dle rozpisu jsme připravili rozdělovací gel, který jsme po zpolymerování převrstvili gelem zaostřovacím. Do něj jsme zasunuli hřebínky pro vytvoření jamek na nanášení vzorků. Po nanesení vzorků jsme komoru naplnili running pufrem a spustili elektroforézu za uvedených podmínek: 200 V, 0,24 A, přibližně 50 minut. Během elektroforézy jsme aktivovali PVDF membrány minutovým třepáním v methanolu. Po rozdělení proteinů jsme gely promyli v transfer pufru, spolu s membránami složili do blotovacích sendvičů a spustili transfer (120 V, 0,35 A, 120 min).

Po blottingu jsme rozložili sendvič a podle markeru molekulové hmotnosti ověřili správnost a efektivnost blottingu. Membrány jsme promyli v TBS-Tween 0,05% (2x5 minut), pak je hodinu blokovali v 10% mléce, opět promyli v TBS-Tween 0,05%.

Za mírného třepání jsme membrány inkubovali přes noc při 4 °C v primární protilátce (rozpis ředění viz tabulka). Druhý den jsme membrány promyli 5x10 minut v TBS/T a 1x10 minut v TBS a 60 minut inkubovali při pokojové teplotě se sekundární protilátkou (ředěnou v 5% mléce). Membrány jsme opět hodinu promývali. Mezitím jsme si připravili ECL roztok (substrát pro křenovou peroxidázu)- BM Chemiluminiscence Blotting substrát (ROCHE), ve kterém jsme po promývání membrány inkubovali 1 minutu. Na závěr jsme membrány složili do fotografických kazet a v temné komoře vyvolali signál na modrocitlivých filmech (Foma, Hradec Králové). Filmy jsme zpracovávali v chemikáliích Adepo a vyvolávacím automatu Fomei.

### **Roztoky a chemikálie:**

#### ✓ RUNNING PUFER

Na přípravu	1 l	2 l	3 l	4 l	5 l
TRIS (USB) [g]	6	12	18	24	30
GLYCIN (INC)[g]	28,8	57,6	86,4	115,2	144
SDS (FLUKA) [g]	1	2	3	4	5

#### ✓ TRANSFER PUFER

Na přípravu	1 l	2 l	3 l	4 l	5 l
TRIS (USB) [g]	3,03	6,06	9,09	12,12	15,15
GLYCIN (INC)[g]	14,4	28,8	43,2	57,6	72
Methanol (Kulich) [ml]	200	400	600	800	1000

- ✓ 10x koncentrovaný TBS (pH 7,6) – TRIS-base (48,0 g), NaCl (160,0 g), 1mol/l HCl, dH<sub>2</sub>O (doplněno na celkový objem 2l)
- ✓ TBS-0,05% TWEEN- 10x koncentrovaný TBS:TWEEN: dH<sub>2</sub>O= 200:1:1800

✓ Primární a sekundární protilátky:

- Sekundární protilátky:

- Polyclonal Swine Anti- Rabbit Immunoglobulins
- Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunoglobulins

Výrobce: DAKO

- Primární protilátky:

protilátka	původ	primární	sekundární	kDa	výrobce
lamin B	myš	1:100	1:1000	68/48	Calbiochem
p53	myš	1:2000	1:2000	53	Exbio
p53_392	myš	1:2000	1:2000	53	Exbio
B-aktin	myš	1:20000	1:9000	40	Sigma
p21	myš	1:1000	1:1000	21	Sigma
p53_15	králík	1:1000	1:1000	53	Calbiochem
Erk-nefosfo p44/42MAPK	myš	1:2000	1:2000	42/44	Cell Signaling

### 3.2 Přístroje

- Inkubátor I6150 Juan
- Centrifuga Hermle Z 323 K
- Centrifuga BR4
- Centrifuga MPW
- Protean 3 (Biorad, Praha, CZ)
- Minihybridizér Probiot Jp.
- Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter, Fullerton, USA)
- Laminární box MSC 12 Juan
- Hlubokomrazící box Sanyo
- Vyvolávací automat Fomei

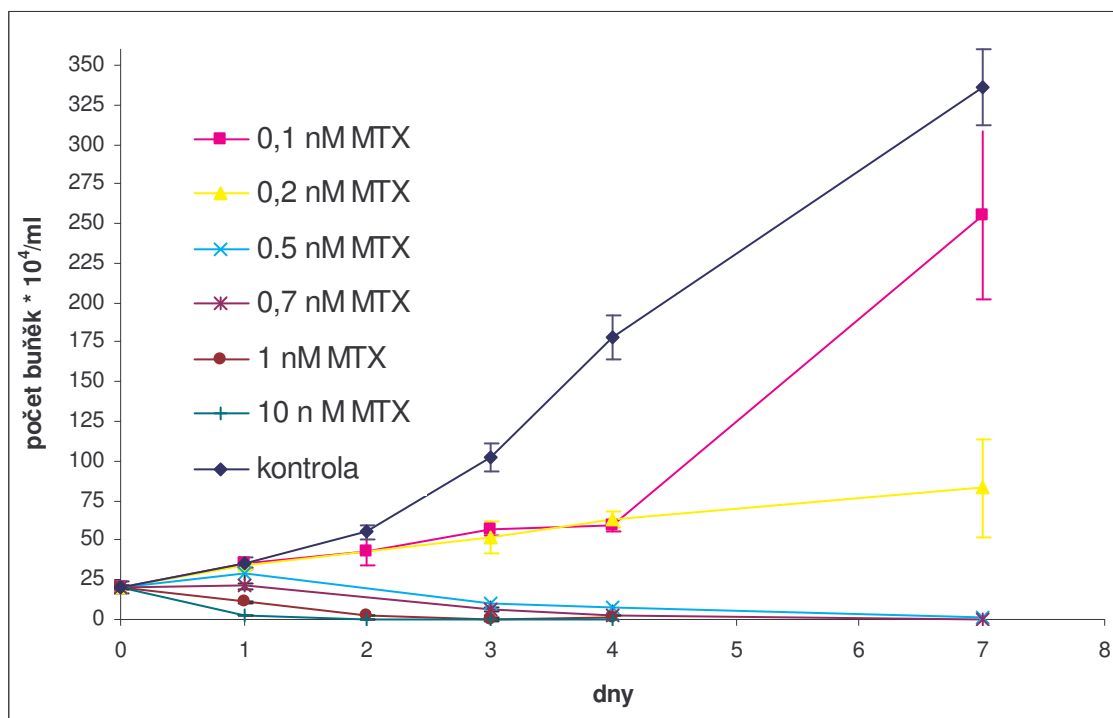
## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Proliferace a viabilita MOLT-4

#### 4.1.1 Vliv mitoxantronu na buňky MOLT-4

Prvním úkolem při řešení diplomové práce bylo zjistit vhodnou pracovní koncentraci MTX pro následující pokusy. Testovali jsme koncentraci MTX v rozmezí 0,1-10 nmol/l. Ke stanovení křivky přežití bylo použito stanovení viability buněk MOLT-4, které byly kultivovány v IMDM mediu a inkubovány při +37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Během pokusu jsme kultury ředili tak, aby byly zajištěny optimální růstové podmínky.

Ve sledovaných intervalech (24, 48, 72, 96 hodin a 7. den po ovlivnění) jsme odebírali odpovídající část buněčné suspenze a pomocí trypanové modře jsme určovali počet mrtvých a živých buněk. Provedli jsme 3 na sobě nezávislé pokusy, vypočítali jsme průměrnou hodnotu a směrodatné odchylky a hodnoty jsme následně vynesli do grafu.

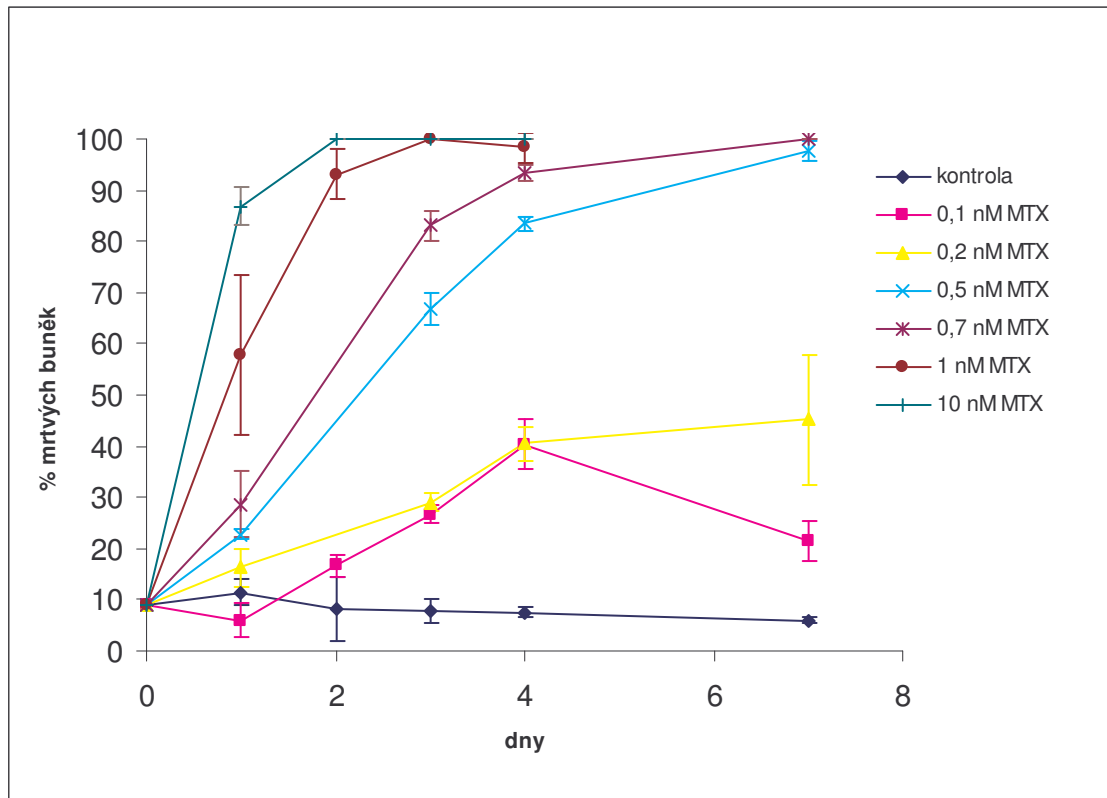


Graf 4.1.1 Graf závislosti počtu živých buněk na čase po aplikování MTX

Obr. č. 4.1.1. zachycuje vliv stoupajících koncentrací MTX na celkový počet živých buněk v kultuře. U skupiny kontrolních buněk je možné sledovat logaritmický nárůst populace v čase, což zjevně svědčí o zachování optimálních podmínek při provádění pokusu. Z ostatních křivek je patrné, že se zvyšující se koncentrací MTX se



postupně snižuje proliferační aktivita buněk MOLT-4. Koncentrace MTX 0,2 nmol/l zcela inhibuje proliferaci, při expozici vyšším koncentracím MTX (0,5-10 nmol/l) počet živých buněk klesá.



Graf 4.1.2 Graf závislosti procent mrtvých buněk na čase po aplikování MTX

Obr. 4.1.2. zaznamenává pokles viability kultury (tedy procentuelní zastoupení buněk s propustnou plasmatickou membránou, které se barví trypanovou modří) po expozici stoupajícím koncentracím MTX. U skupiny kontrolních buněk vidíme pokles procentuálního zastoupení mrtvých buněk, což je dáno tím, že buňky MOLT-4 jsou citlivé na manipulaci, proto při nasazování pokusu dochází k malému poškození, které je ovšem následně reparováno a značí to tedy o zachování optimálních podmínek během pokusu.

Na ostatních křivkách můžeme pozorovat postupný nárůst mrtvé populace buněk v závislosti na stoupající koncentraci MTX a době inkubace. MTX v koncentraci 5 a 10 nmol/l vede k eradikaci kultury do tří dnů, koncentrace MTX 0,7 a 0,5 nmol/l eradikují kulturu během 7 dnů. U koncentrací MTX 0,2 a 0,1 nmol/l dochází během 7 dnů k nárůstu procenta mrtvých buněk na  $45,3 \pm 3,9\%$  resp.  $21,4 \pm 12,7\%$ .

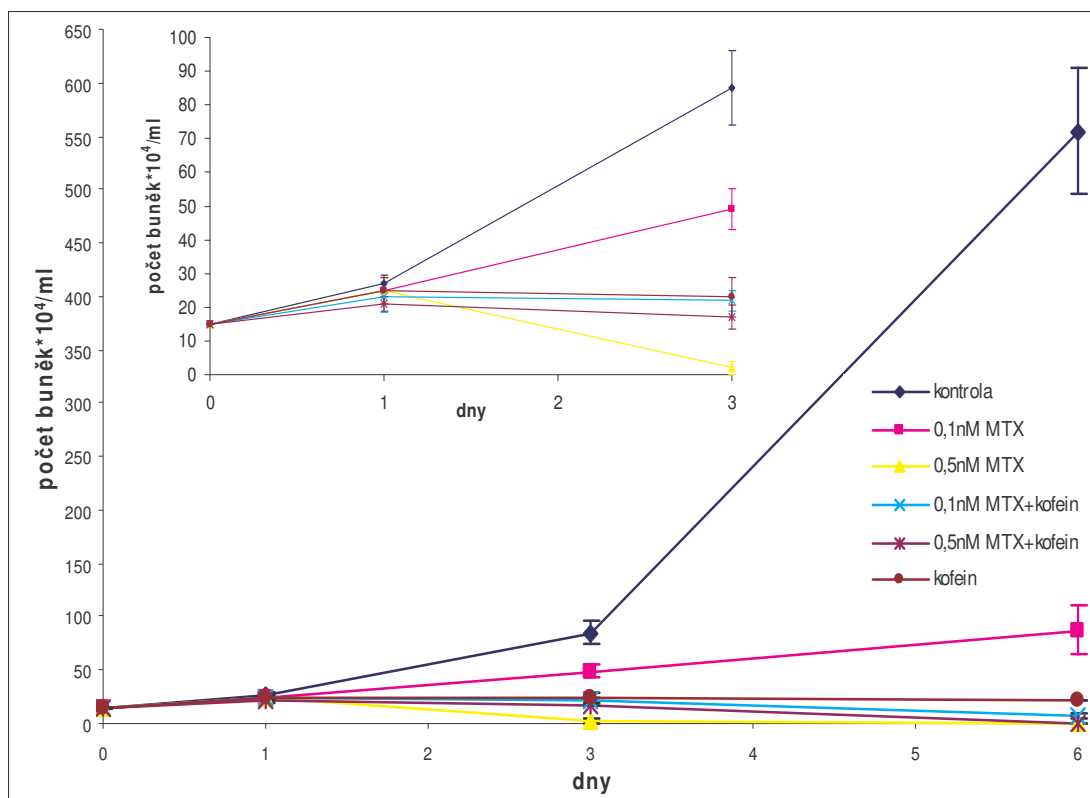
Pro další pokusy jsme si vybrali rozmezí koncentrace MTX 0,1 a 0,5 nmol/l, protože u vyšších koncentrací dochází k příliš vysokému snížení proliferace a zvýšení

úhynu buněk již po 24 hodinách, proto by tyto skupiny nebyly vhodné pro další experimenty.

#### 4.1.2 Vliv mitoxantronu a kofeinu na buňky MOLT-4

Po nalezení optimální pracovní koncentrace MTX jsme se zaměřili na aplikaci inhibitoru ATM kinázy kofeinu společně s MTX. Opět jsme zjišťovali proliferační aktivitu buněk a jejich úmrtnost. Kofein jsme aplikovali vždy 45 minut před přidáním MTX a to v koncentraci 2 mM, buňky jsme kultivovali v IMDM mediu a inkubovali při  $+37^{\circ}\text{C}$  v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$ . Během pokusu jsme kultury ředili tak, aby byly zajištěny optimální podmínky.

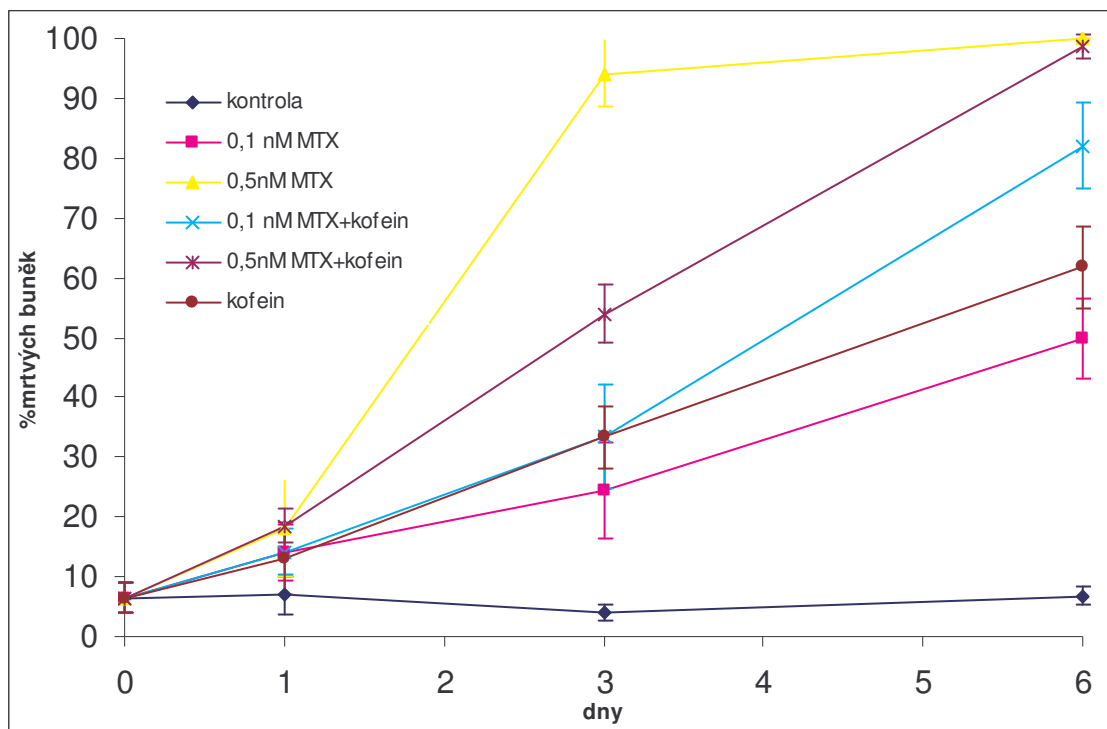
Ve sledovaných intervalech (24, 72 hodin a 6. den) jsme odebírali potřebné množství buněčné suspenze pro zjištění viability buněk.



Graf 4.1.3 Graf závislosti počtu živých buněk na čase po aplikování MTX a kofeinu

U kontrolní skupiny buněk je patrný logaritmický nárůst počtu buněk v čase, což značí, že experiment proběhl za vhodných podmínek. Kofein sám o sobě výrazně snižuje proliferační potenciál buněk. První den po aplikaci cytostatika narůstají křivky ovlivněných buněk v čase srovnatelně s kontrolní skupinou (rozdíl je nesignifikantní,

$p > 0,1$ ), ale 3. a 6. den po ovlivnění je viditelný pokles proliferace. K nejvýraznějšímu poklesu počtu buněk dochází po expozici 0,5 nmol/l MTX. Buňky ovlivněné 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem vykazují větší proliferaci než buňky vystavené samotnému 0,5 nmol/l MTX (rozdíl je vysoce signifikantní,  $p < 0,01$ ), což naznačuje, že kofein chrání ovlivněné buňky MOLT-4 před působením zejména vysokých dávek cytostatika. MTX v koncentraci 0,1 nmol/l snižuje proliferaci buněk MOLT-4, efekt kombinace s kofeinem je srovnatelný s působením samotného kofeinu. (Obr. 4.1.3).



Graf 4.1.4 Graf závislosti procent mrtvých buněk na čase po aplikování MTX a kofeinu

Z grafu závislosti procentuálního množství mrtvých buněk (obr. 4.1.4) můžeme vypočítat klesající tendenci křivky u skupiny kontrolních buněk, což značí o zachování vhodných podmínek při pokusu. Nejvyšší procento mrtvých buněk u ovlivněných skupin nacházíme u 0,5 nmol/l MTX a nejnižší pak u 0,1 nmol/l MTX. Kofein sám zvyšuje procentuální zastoupení mrtvých buněk dokonce více, než samotný MTX o koncentraci 0,1 nmol/l. Skupina buněk ovlivněná 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem vykazuje nižší četnost uhynulých buněk, než skupina s 0,5 nmol/l MTX samotným, a to zejména 3. den po ovlivnění (rozdíl je vysoce signifikantní  $p < 0,001$ ). Inhibice ATM kinázy tedy chrání buňky před apoptózou v přítomnosti vysoké koncentrace cytostatika, tato ochrana je však pouze dočasná, jelikož 6. den po ovlivnění

dochází k úhynu buněk i v přítomnosti kofeinu. U skupiny buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem dochází k aditivnímu efektu, což je patrné zejména 6. den po ovlivnění.

## **4.2 Analýza apoptózy pomocí průtokové cytometrie**

Průtoková cytometrie zajišťuje rychlou objektivní metodu pro analýzu apoptózy. Analýza apoptózy pomocí průtokové cytometrie vychází ze zachování funkce plazmatické membrány v časně fázi apoptózy. Časně apoptické buňky jsou charakteristické ztrátou fosfolipidové asymetrie membrány, což se projeví expozicí fosfatidylserinu na vnější straně membrány, přičemž funkce membrány je zachována. Tohoto jevu se využívá k analýze pomocí Annexinu V a PI. Annexin V se selektivně váže na fosfatidylserin, zatímco PI proniká pouze do buněk s poškozenou plazmatickou membránou a následně se váže na DNA. Touto metodou je možné rozlišit živé buňky (negativní na Annexin i PI), časně apoptické buňky (pozitivní na Annexin a negativní na PI) a pozdě apoptické buňky (pozitivní na Annexin i PI).

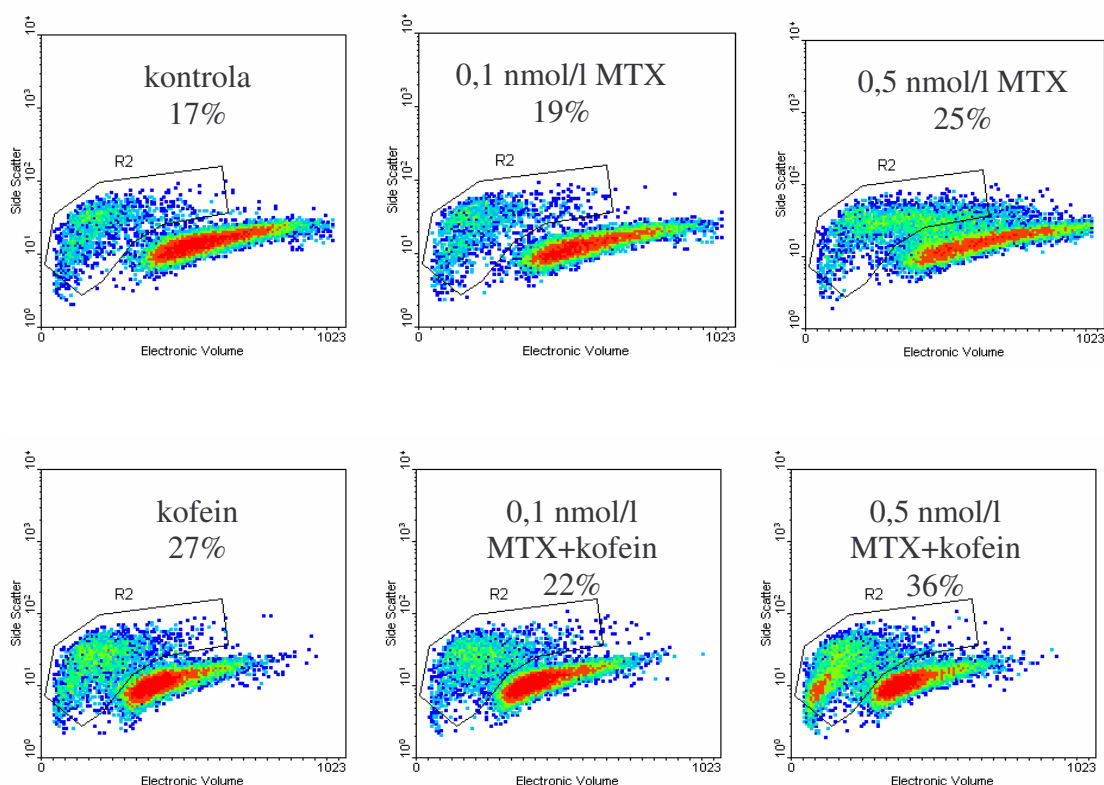
Během apoptózy dochází také ke změnám v rozptylu světelného signálu v průtokovém cytometru. Jsou sledovány dva optické parametry: side scatter (SS), který souvisí s granularitou buněk a forward scatter (FS). Forward scatter koreluje s velikostí buněk. U průtokového cytometru CellLab Quanta tomuto parametru odpovídá hodnota elektronického objemu (EV). Během apoptózy se díky svrašťování buněk ukazuje zmenšení rozptylu světla ve směru FS, které však na rozdíl od nekrózy není paralelně spojeno s poklesem SS, naopak u některých buněk dochází k přechodnému zvětšení granularity (vzestup SS).

Cytometrickou analýzu jsme provedli u buněk 24 a 72 hodin po ovlivnění, výsledky jsou přehledně uvedeny v grafech, ve kterých je vidět procentuální zastoupení apoptických buněk.

### **4.2.1 Analýza SS/EV**

Níže uvedené grafy ukazují výsledky dvouparametrické analýzy apoptózy pomocí změn v rozptylu světelného signálu v průtokovém cytometru. U apoptických buněk je detekován pokles objemu (EV) doprovázený nárůstem granularity - zvýšením SS. Oproti tomu buňky nekrotické nejprve svůj objem zvětšují a následně dojde k lýze a vyhlití intracelulárního obsahu do vnějšího prostředí.

Proměření sledovaných parametrů 24 hodin po ovlivnění (obr. 4.2.1.1.) jsme podle předpokladu detekovali nejméně apoptických buněk v kontrolní skupině, relativně vyšší hodnota 17% je dána tím, že buňky MOLT-4 jsou velmi citlivé k manipulaci. Poměrně vysoké procento buněk, které jsou pouze pod vlivem kofeinu, přechází také do apoptózy (27%) Procentuální zastoupení apoptických buněk vzrůstá se vzrůstající koncentrací MTX (19% u 0,1 nmol/l, 25% u 0,5 nmol/l). U skupiny buněk vystavených působení 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem je po 24 hodinách viditelná kombinace smrtícího účinku cytostatika s toxickým efektem kofeinu.



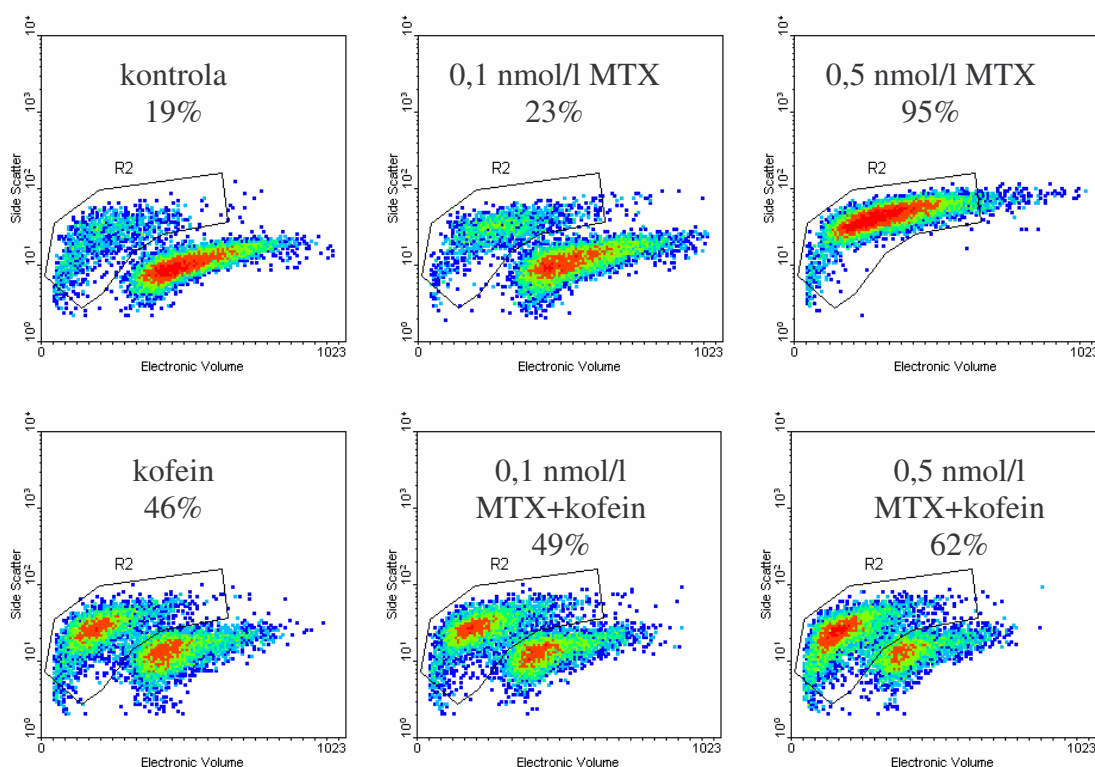
Obr. 4.2.1.1 Analýza SS/EV 24 hodin po ovlivnění

Analýza závislosti SS/EV u skupin buněk 72 hodin po ovlivnění (obr. 4.2.1.2) vykazuje nejnižší procento apoptických buněk podle předpokladu u kontrolní skupiny. Kofein sám o sobě způsobuje znatelnou apoptózu (46%). U skupiny buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX dochází k mírnému nárůstu apoptických buněk (23%), zatímco u skupiny buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem je efekt srovnatelný s působením samotného kofeinu (49%).

U skupiny buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX dochází po 72 hodinách k úhynu populace (95% apoptických buněk), avšak porovnáme-li toto zjištění se skupinou buněk

ovlivněných 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem, zjistíme výrazný protektivní účinek inhibice ATM kinázy kofeinem. Procento apoptických buněk je o 33% nižší než po působení samotného MTX.

Závěrem této analýzy lze říci, že přes toxický účinek samotného kofeinu dochází v kombinaci s vyšší koncentrací cytostatika (0,5 nmol/l MTX) po 72 hodinách k prokazatelnému ochrannému účinku kofeinu na buňky MOLT-4. Jak ale vyplývá z výsledků proliferace a viability, je tato ochrana před indukcí apoptózy MTX pouze dočasná.



Obr. 4.2.1.2 Analýza SS/EV 72 hodin po ovlivnění

#### 4.2.2 Analýza Annexin V/ PI

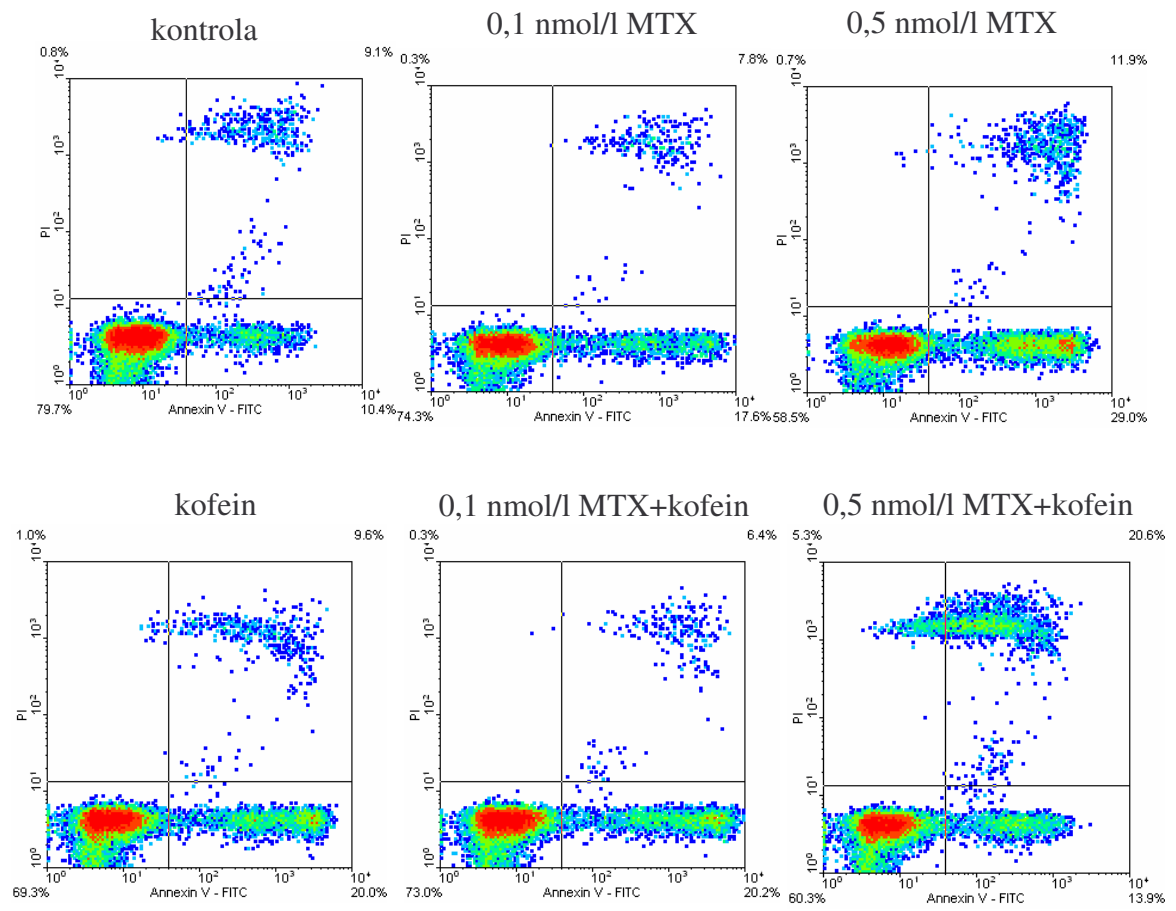
Analýzou pomocí duálního značení PI a Annexinem V jsme zjistili rozložení buněk v jednotlivých kvadrantech. První kvadrant odpovídá živým buňkám negativním na obě barviva, ve druhém kvadrantu jsou přítomny časně apoptické buňky pozitivní na Annexin V, třetí kvadrant reprezentují buňky pozitivní na obě barviva (pozdně apoptické/nekrotické). Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech je uvedeno na příslušném rohu grafu.

### **Analýza Annexin V/PI 24 hodin po ovlivnění**

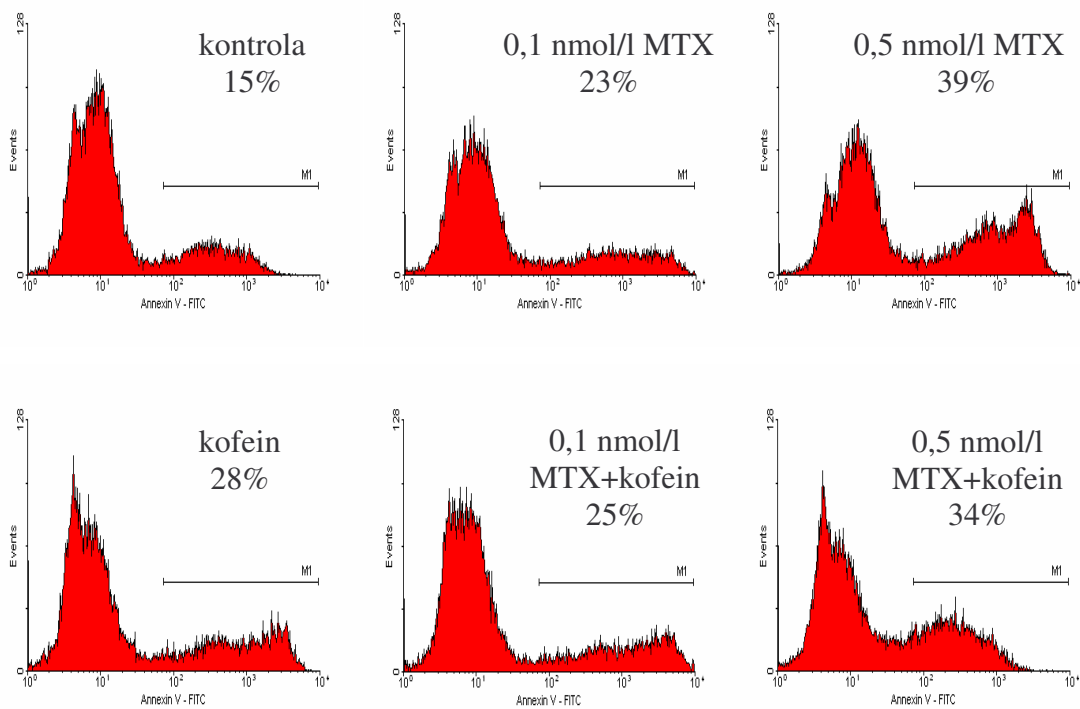
U kontrolní skupiny buněk se naprostá většina značených buněk nachází v prvním kvadrantu (80%) a dalších několik procent buněk v kvadrantu 2 (10%) a 3 (9%). Údaje korelují s procentem apoptických buněk zjištěných pomocí změn EV a SS a svědčí o citlivosti buněk MOLT-4 k zacházení. Opět je třeba poukázat na vliv kofeinu samotného, procento časně apoptických buněk v přítomnosti tohoto inhibitoru ATM kinázy stoupá vůči kontrolní skupině o 10%.

Grafy reprezentované skupinou buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX a 0,1 nmol/l MTX v kombinaci s inhibitorem kinázy AMT potvrzují výsledky předcházející analýzy – mitoxantron o koncentraci 0,1 nmol/l vede buňky do apoptózy a v přítomnosti kofeinu je efekt kombinace srovnatelný s působením samotného kofeinu. Po 24 hodinách sledujeme vzestup počtu časně apoptických buněk (kvadrant dva), přičemž poměrně vysoké procento buněk zůstává negativní na obě barviva.

Skupina buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX a 0,5 nmol/l MTX je reprezentována již po 24 hodinách poměrně výraznou apoptózou, u buněk ovlivněných pouze MTX je pozorovatelná zejména časná fáze apoptózy (29%, celkově Annexin V pozitivních buněk 39%) a u skupiny buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem je znatelný přechod do pozdní apoptózy (20%, celkově Annexin V pozitivních buněk 34%), přičemž se buňky začínají přesouvat do oblasti mezi kvadrantem tři a čtyři (5%), což může být způsobeno pozvolným rozpadem buněčné membrány.



Obr. 4.2.2.1 Analýza Annexin V/PI 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.2.2.2 Analýza Annexin V 24 hodin po ovlivnění

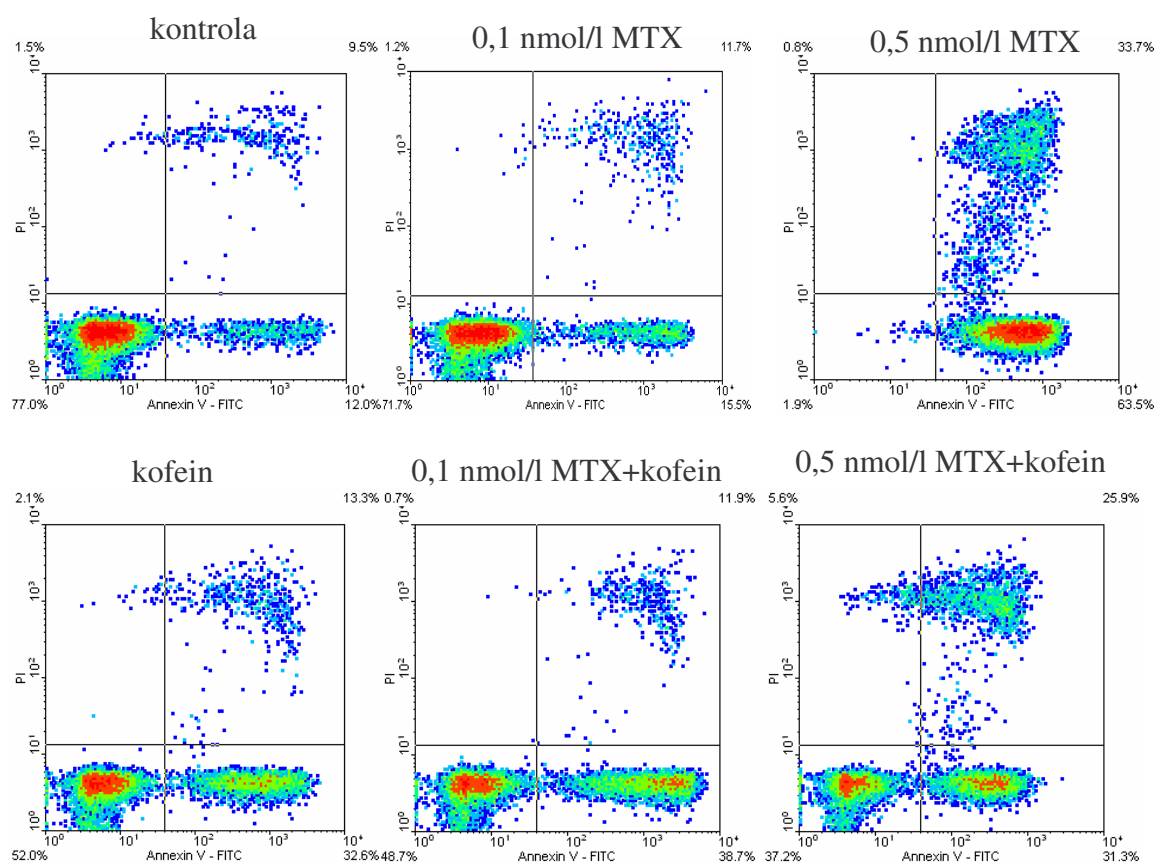


### Analýza Annexin V/PI 72 hodin po ovlivnění

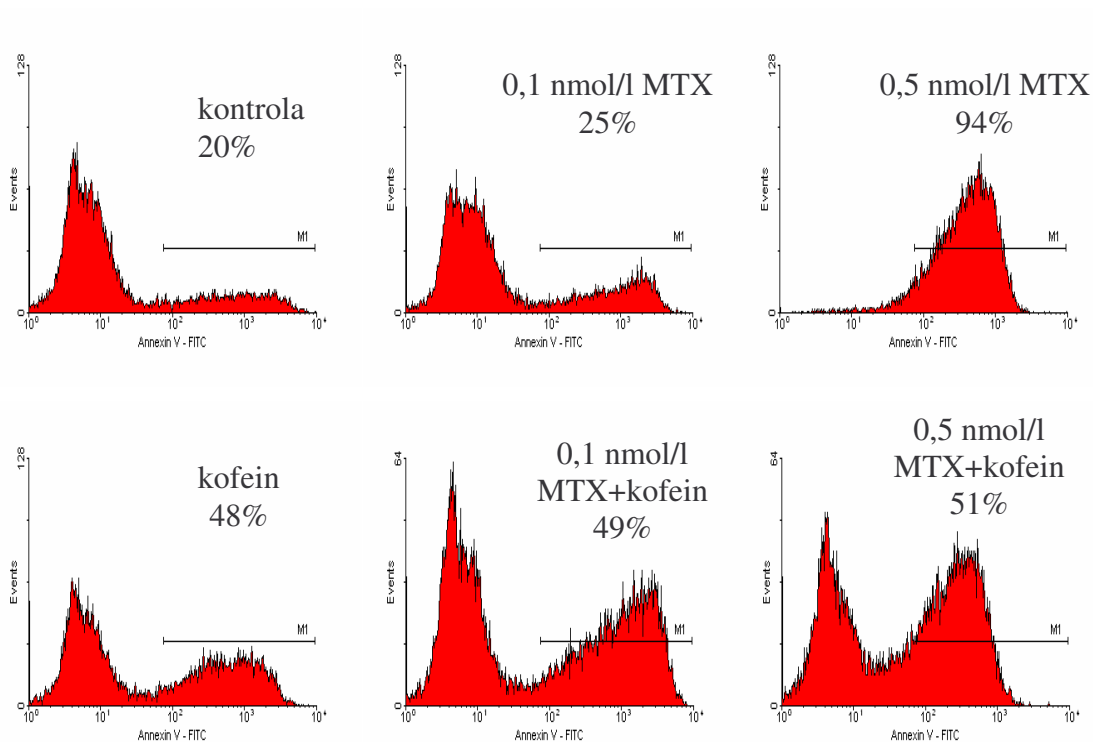
Po ovlivnění samotným kofeinem stoupá procento časně apoptických buněk vůči kontrolní skupině o 20%.

U skupiny buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX po 72 hodinách je méně buněk v časné fázi apoptózy než u téže skupiny po 24 hodinách, buňky totiž přešly do pozdní fáze apoptózy, kde je jejich zastoupení o něco vyšší. Celkem však nedošlo k výraznému poklesu živých buněk. U buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem pozorujeme aditivní efekt, v časné fázi apoptózy se nachází 39% buněk.

U skupiny buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX dochází téměř ke stoprocentnímu přechodu buněk do kvadrantu dva a tři, pouze 2% buněk jsou buňky neapoptické. Ovšem u buněk vystavených této koncentraci cytostatika společně s inhibitorem ATM kinázy kofeinem je viditelný protektivní efekt (zůstane 37% živých buněk).



Obr. 4.2.2.3 Analýza Annexin V/PI 72 hodin po ovlivnění



Obr. 4.2.2.4 Analýza Annexin V 72 hodin po ovlivnění

### 4.2.3 Analýza obsahu DNA

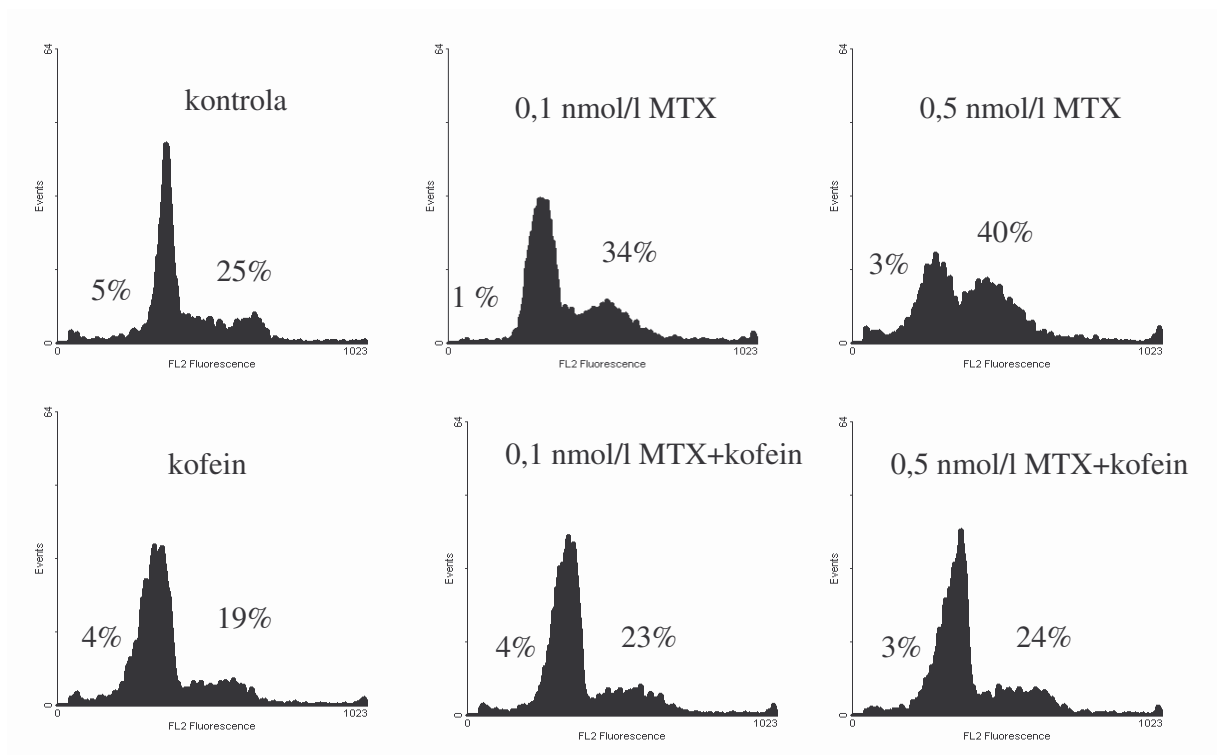
Analýza obsahu DNA v buňce nám umožní zjistit procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Metoda je založena na poznatku, že buňky jsou v G1 fázi mají jednu sadu chromozómů, v S fázi dochází k duplikaci chromozómů a tudíž i k nárůstu množství DNA v buňce. Dále můžeme identifikovat G2 fázi, v této fázi předcházející mitózu má buňka diploidní množství chromozómů (nejvyšší obsah DNA v buňce).

Během apoptózy dochází ke specifickému štěpení jaderné DNA pomocí specifických enzymů zvaných endonukleázy. Malé části takto rozštěpené DNA mohou opouštět buňku a dochází tak ke snižování obsahu DNA, a tak se při analýze obsahu DNA objevuje specifický sub-G1 vrchol reprezentovaný buňkami apoptickými.

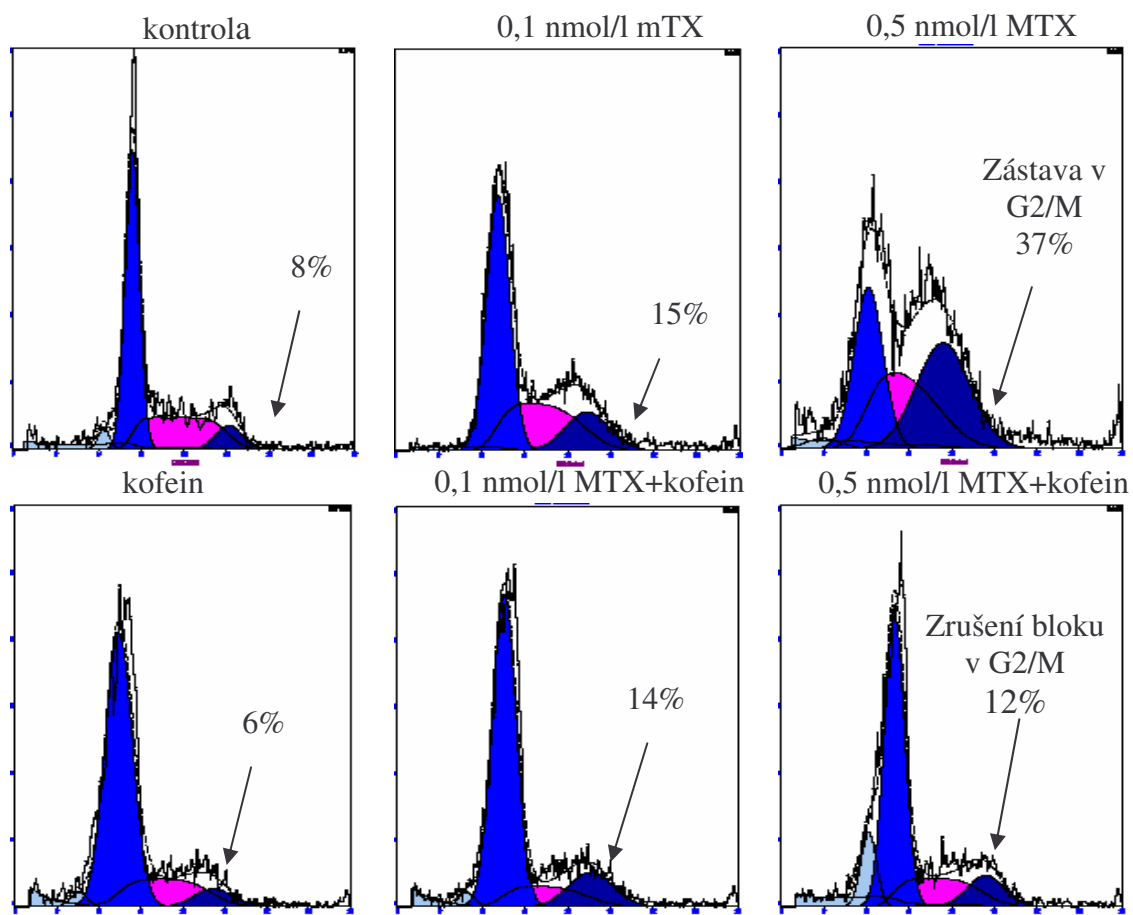
U kontrolní skupiny buněk můžeme pozorovat klasické rozmístění buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Nejvyšší procento buněk je v G1 fázi buněčného cyklu (59%).

Na obrázku 4.2.4.1b můžeme sledovat kumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu po 24 hodinách u skupiny buněk vystavených působení MTX (0,1 nmol/l 14%; 0,5 nmol/l 37%; kontrola 8%), je tedy patrné, že mitoxantron je cytostatikum způsobující blok v G2 fázi. Toto zjištění je v souladu s působením MTX jakožto

inhibitoru topoizomerázy II (*Klenner, 1996*) a obecně předpokládaným mechanismem zástavy buněčného cyklu po poškození DNA DSB. Dále jsme studovali, zda kofein, jakožto nesespecifický inhibitor ATM kinázy, dokáže tento blok rušit a znesnadnit tak buňkám opravu poškozené DNA. Prokázali jsme, že po přidání kofeinu dochází k rušení bloku v G2 fázi, tento efekt je patrný zejména u skupiny buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem, dochází ke snížení počtu buněk v G2 fázi na 12%, což je o 25% méně než-li u skupiny buněk vystavených pouze působení 0,5 nmol/l MTX. U skupiny buněk vystavených 0,1 nmol/l MTX a 0,1 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem 24 hodin po ovlivnění tento efekt patrný není, z obrázku 4.2.4.1a je však patrné snížení počtu buněk v S+G2 fázi buněčného cyklu. U buněk vystavených pouze 0,1 nmol/l MTX je procentuální zastoupení buněk v S+G2 fázi 34% a u buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MTX společně s kofeinem dochází ke snížení na 23%.

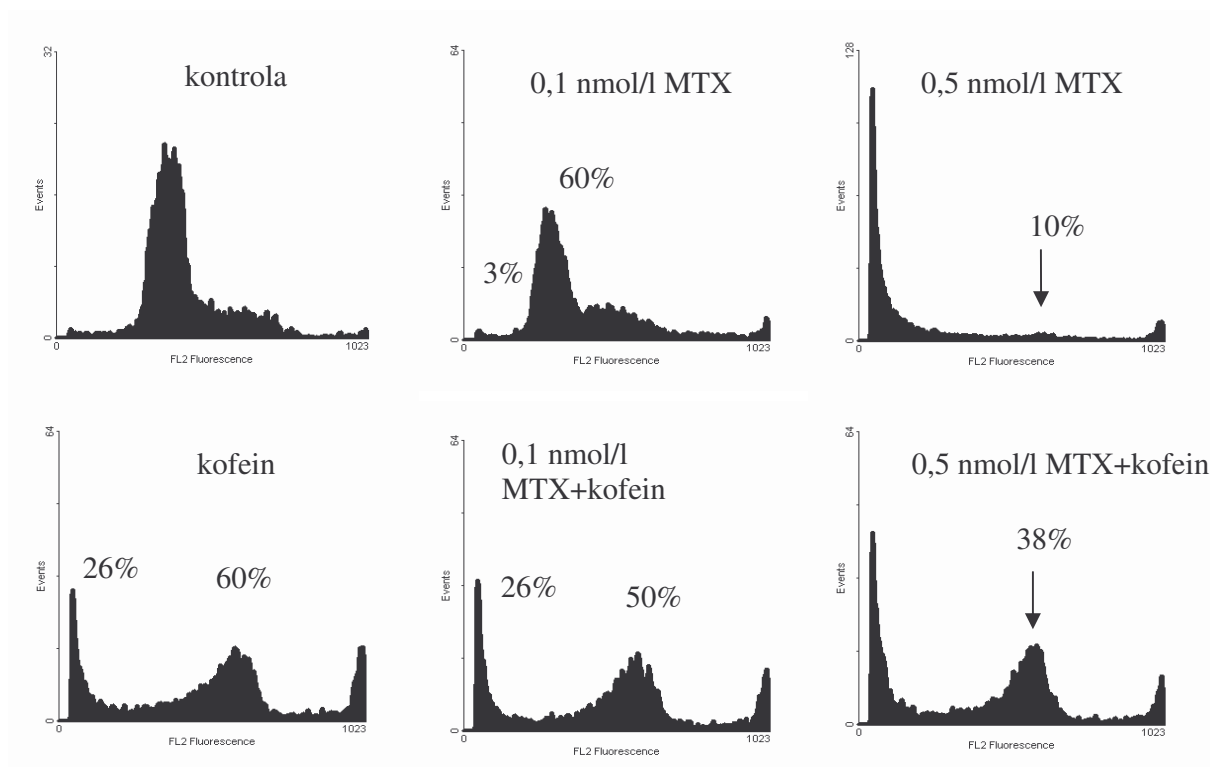


Obr. 4.2.4.1a Analýza obsahu DNA 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.2.4.1b Analýza obsahu DNA 24 hodin po ovlivnění, hodnocení programem Multicycle AV

Po 72 hodinách od ovlivnění dochází k rozpadu buněk, a tak data naměřená na průtokovém cytometru nebylo možné vyhodnotit v programu Multicycle AV, proto jsme pro vyhodnocení použili pouze histograpy z programu WinMDI2.8. Opět je patrné klasické rozmístění buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u kontrolní skupiny, kdy největší počet buněk je v G1 fázi buněčného cyklu. U dalších skupin v důsledku rozpadu buněk není možné určit přesné procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Obr. 4.2.4.2 však prokazatelně ilustruje protektivní efekt kofeinu v kombinaci s 0,5 nmol/l MTX po 72 hodinách. U skupiny buněk vystavených pouze 0,5 nmol/l MTX zůstává v cyklu pouze 10% buněk, avšak u buněk vystavených 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem zůstává v cyklu 38% buněk, což je rozdíl o 28%.



Obr. 4.2.4.2 Analýza obsahu DNA 72 hodin po ovlivnění

Závěrem lze konstatovat, že MTX způsobuje u buněk MOLT-4 zástavu buněčného cyklu v G2 fázi následovanou rozvojem apoptózy. Inhibice ATM kinázy kofeinem tuto zástavu buněčného cyklu znemožní. Zároveň je patrný krátkodobý ochranný efekt kofeinu před MTX způsobenou apoptózou.

### 4.3 Elektroforéza a Western blot analýza

Pomocí elektroforézy a western blotu jsme zjišťovali změny v expresi proteinů souvisejících s apoptózou a kontrolou buněčného cyklu. Zaměřili jsme se na sledování exprese proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem p53\_ser15 a p53\_ser392. Dále jsme sledovali proteiny p21, ERK1/2 a štěpení laminu B. Pro kontrolu nanášky jsme používali aktin. Zaměřili jsme se na sledování změn exprese u buněk ovlivněných 0,5 nmol/l mitoxantronem, kofeinem a u buněk ovlivněných kombinací 0,5 nmol/l MTX a kofeinu. Exprese vybraných proteinů byla sledována v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění.

Výstupem western blotu jsou fotografické snímky, na kterých je viditelný signál odpovídající jednotlivým proteinům z membrán. Ke kvantifikaci jsme následně použili počítačové měření integrované optické denzity, grafickým zpracováním těchto dat jsme

získali sloupcové grafy, které názorně ukazují kvantitu exprese proteinů u sledovaných skupin ovlivněných buněk.

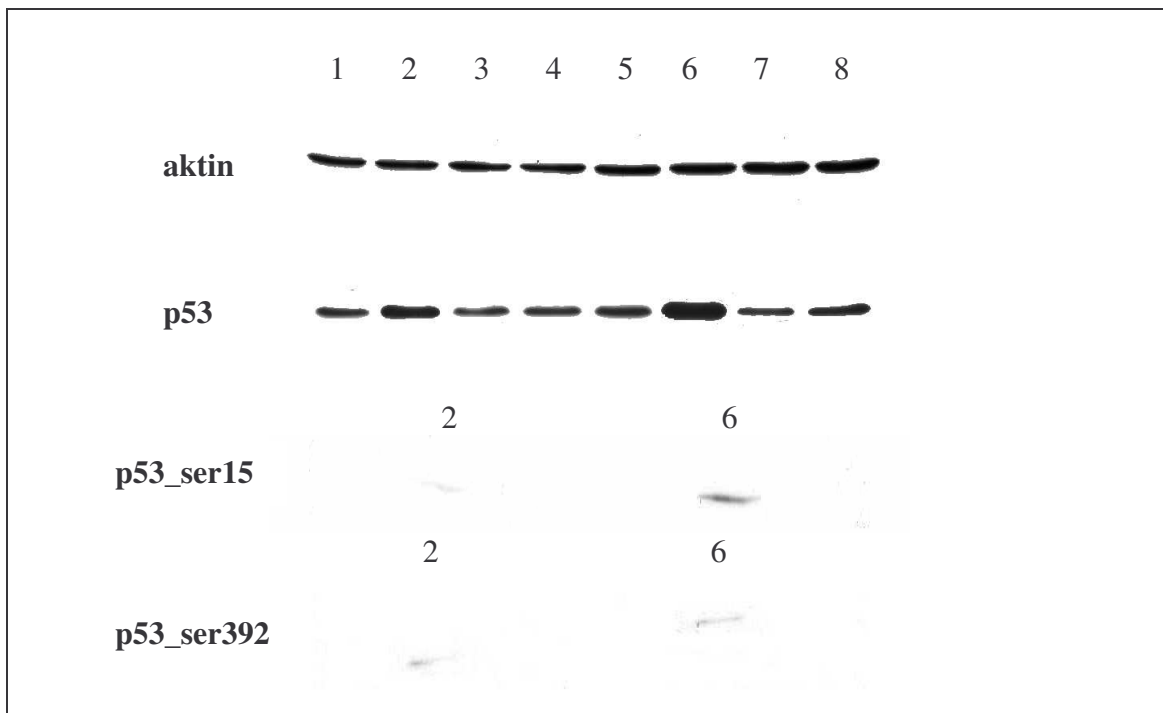
Nejprve jsme sledovali změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem u buněk MOLT-4 v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění. Protein p53 je tumor-supresorový protein. Tento transkripční faktor má schopnost působit proti nádorové transformaci buněk. Protein p53 je považován za jeden z nejdůležitějších regulátorů odpovědi na nejrůznější formy buněčného stresu. V odpovědi na poškození DNA dochází k fosforylaci p53 ATM/ATR kinázami, podmiňující vzestup jeho hladiny (Nakano *et al.*, 2007) a kumulaci proteinu v buňce.

Nejnižší expresi proteinu p53 jsme zaznamenali u kontrolní skupiny buněk a u buněk vystavených působení kofeinu. Hladina proteinu p53 stoupala zejména u skupiny buněk vystavených 0,5 nmol/l MTX (obr. 4.3.1). Ze sloupcového grafu kvantifikujícího optickou densitu blotu je vidět, že hladina p53 stoupá již po 4 hodinách, však k daleko vyšší expresi dochází po 24 hodinách od ovlivnění (obr. 4.3.2). Po přidání MTX a kofeinu o koncentraci 2 mmol/l jsme sledovali změny v expresi p53 po zablokování funkce ATM kinázy. Prokázali jsme, že u buněk MOLT-4 inhibice ATM kinázy po přidání kofeinu zabraňuje vzestupu hladiny p53 po 4 i 24 hodinách působení MTX (obr. 4.3.1. a 4.3.2).

Aktivaci a stabilizaci proteinu p53 provází řada posttranslačních modifikací. V této práci jsme sledovali fosforylaci proteinu p53 na serinech 15 a 392.

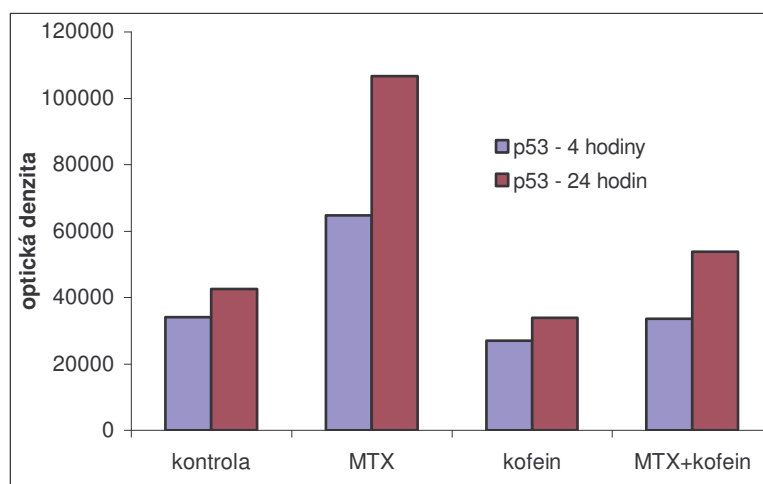
Fosforylace p53 na Ser15 je považována za hlavní místo posttranslační modifikace spojené s odpovědí na DSB, která vede k zástavě buněčného cyklu. Tato fosforylace na Ser15 inhibuje aktivitu Mdm2, brání jeho funkci jako ubikvitin ligázy a tím stabilizuje protein p53 (Toledo, 2007). Na obr. 4.3.1. je patrné, že po vystavení buněk 0,5 nmol/l MTX dochází k fosforylaci p53 na Ser15. Kofein tuto fosforylaci v odpovědi na poškození buňky MTX inhiboval (obr. 4.3.1. a 4.3.3).

Fosforylace na Ser392 je významná pro usnadnění funkce p53 jako transkripčního faktoru. Na obr. 4.3.1. je patrné, že po vystavení buněk 0,5 nmol/l MTX dochází k fosforylaci p53 na Ser392. Navzdory tomu, že dle prací jiných autorů je tato fosforylace katalyzována kaseinkinázou II (Sakaguchi *et al.*, 1997, Szkanderová *et al.*, 2003), přidání kofeinu tuto fosforylaci opět tlumilo (obr. 4.3.1. a 4.3.4), což naznačuje, že ač tato fosforylace není přímo katalyzována ATM, jde o děj ATM závislý.

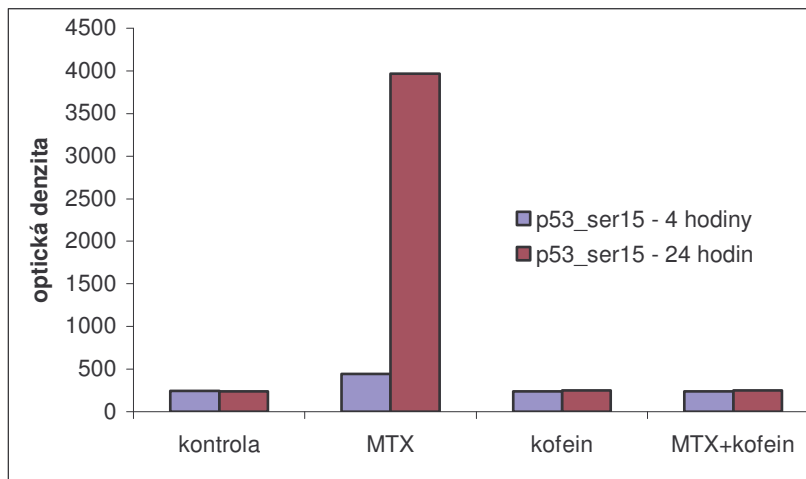


	4 hodiny po ovlivnění				24 hodin po ovlivnění			
	1	2	3	4	5	6	7	8
skupina buněk	kontrola	MTX	Kofein	MTX + kofein	kontrola	MTX	kofein	MTX + kofein

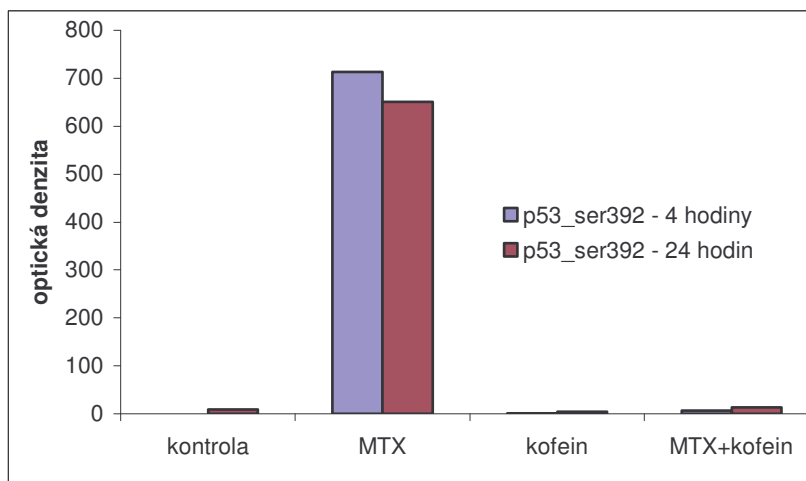
Obr. 4.3.1 Fotografické snímky western blottingu 4 a 24 hodin po ovlivnění zaměřené na sledování změn v expresi p53 a jeho fosforylovaných forem



Obr. 4.3.2 Integrovaná optická denzita. Expresie proteinu p53 4 a 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.3.3 Integrovaná optická denzita. Expresce proteinu p53\_ser15 4 a 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.3.4 Integrovaná optická denzita. Expresce proteinu p53\_ser392 4 a 24 hodin po ovlivnění

Změny v expresi po ovlivnění buněk jsme sledovali i u dalších proteinů - zaměřili jsme se na sledování hladiny proteinu ERK1/2, p21 a štěpení laminu B.

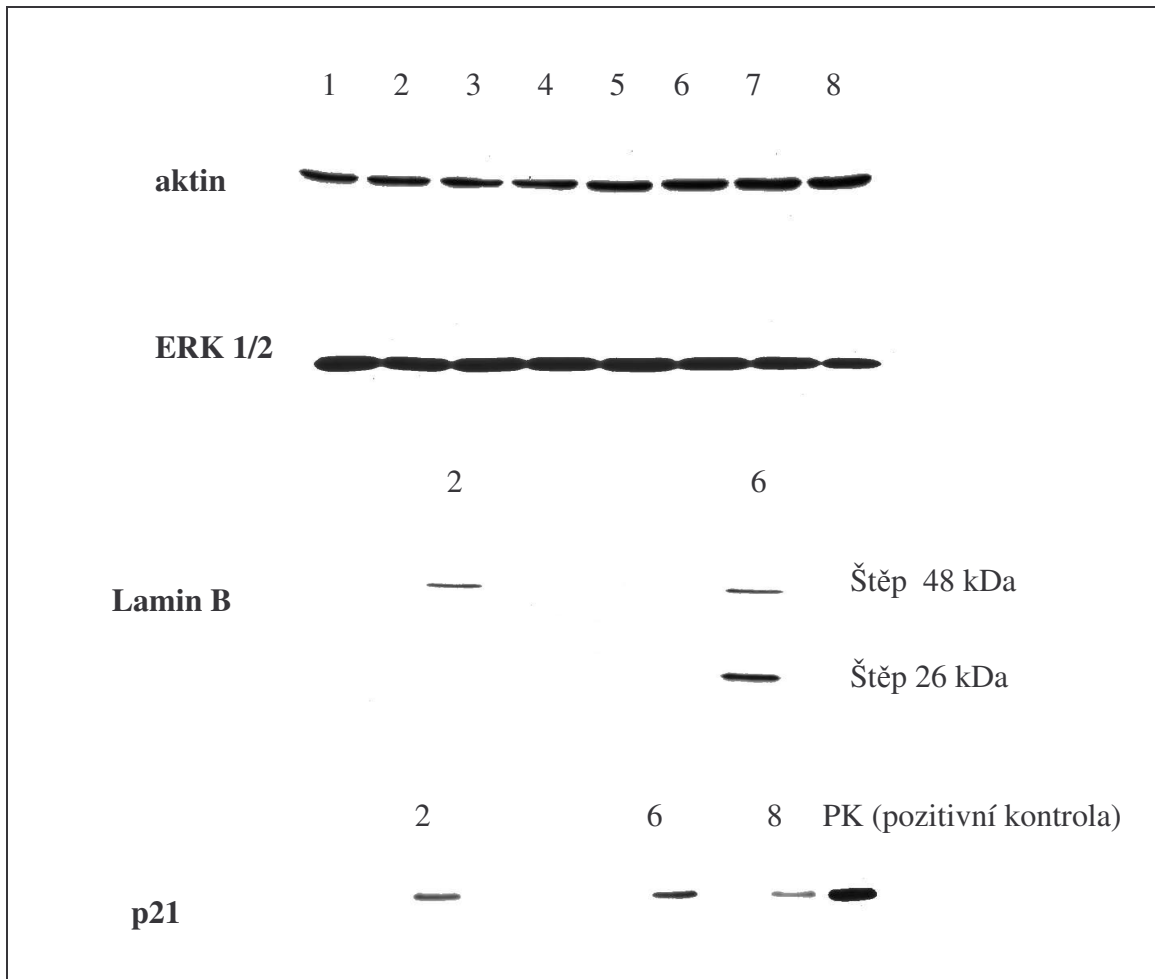
Protein p21 je významný regulátor buněčného cyklu. V důsledku zvyšování exprese proteinu p53 dochází k zvýšení exprese proteinu p21, což je inhibitor cyklin-dependentních kináz, které kontrolují vstup do S fáze. Dokázali jsme, že tento protein je v důsledku zvýšené exprese proteinu p53 exprimován u buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX po 4 i 24 hodinách od ovlivnění. V návaznosti na ATM-p53 signální dráhu jsme též zkoumali inhibiční efekt kofeinu na MTX způsobenou up-regulaci proteinu p21. Po



4 hodinách od vystavení MTX společně s kofeinem nebyl protein p21 detekován . Expresi proteinu p21 u buněk ovlivněných kofeinem spolu s MTX byla prokázána za 24 hodin, avšak i tak inhibice ATM kinázy způsobila nižší nárůst p21 ve srovnání s nárůstem u skupiny buněk ovlivněných pouze 0,5 nmol/l MTX (obr. 4.3.5. a 4.3.6).

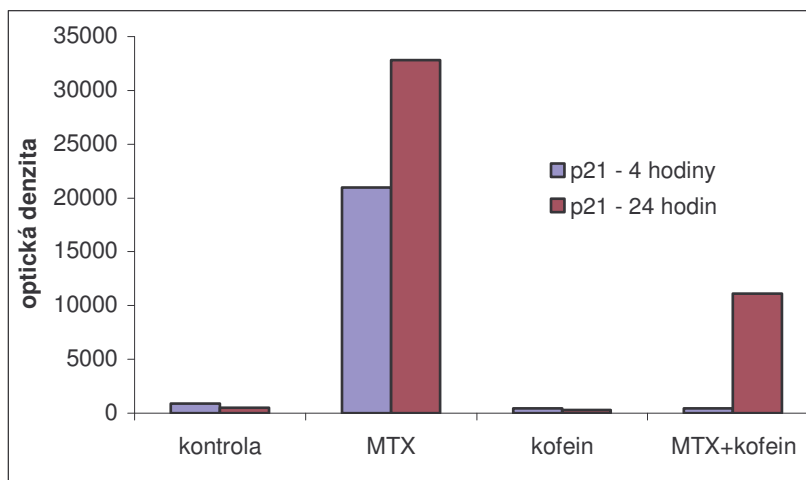
Lamin B je 68 kDa velký protein nacházející se v blízkosti jaderné membrány. Při aktivaci apoptických drah v buňce dochází k jeho štěpení pomocí kaspáz. K štěpení tohoto proteinu docházelo u buněk MOLT-4 vystavených působení 0,5 nmol/l MTX. Po 4 hodinách od ovlivnění se objevuje pouze jeden štěp, avšak po 24 hodinách dochází k štěpení Laminu B na 2 štěpy. Přičemž nejvyšší je hladina 26 kDa štěpu, je tedy patrný postupný rozvoj apoptózy. Naše výsledky dále prokázaly, že kofein tlumí štěpení laminu B v prvních 4 a 24 hodinách po ovlivnění, což koreluje s prokázaným protektivním efektem vůči indukci apoptózy. Pravděpodobně to ale neznamená, že by vlivem kofeinu docházelo k celkové protekci buněk MOLT-4 před působením MTX. Jak naznačila práce Vávrové et al. (2003), šlo by o zkreslenou interpretaci dat, protože k apoptóze indukované DSB v přítomnosti inhibitoru ATM kinázy nedochází celkově v nižší míře, nýbrž je indukována až ve velmi pozdních intervalech (3-6 dní po ozáření), jde o tzv. druhou vlnu apoptózy, což jsme v naší práci nesledovali.

Dále jsme sledovali také expresi proteinu ERK1/2. Zjistili jsme, že nedochází k významným změnám hladiny tohoto proteinu u žádné skupiny sledovaných buněk (obr. 4.3.5.).

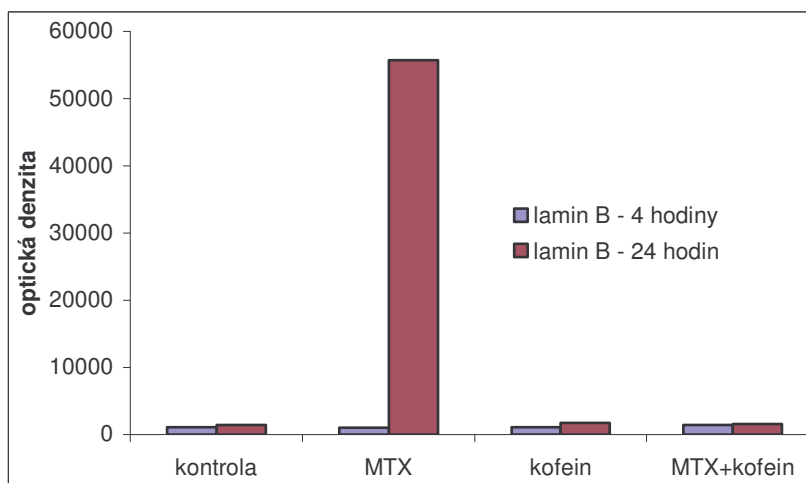


	4 hodiny po ovlivnění				24 hodin po ovlivnění			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Skupina buněk	kontrola	MTX	Kofein	MTX + kofein	kontrola	MTX	Kofein	MTX + kofein

Obr. 4.3.5 Fotografické snímky western blottingu 4 a 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.3.6 Integrovaná optická denzita. Expresce proteinu p21 4 a 24 hodin po ovlivnění



Obr. 4.3.7 Integrovaná optická denzita. Expresie štěpu laminu B o velikosti 26 kD 4 a 24 hodin po ovlivnění

## 5. Závěr

V této práci jsme se zabývali studiem apoptózy u buněk ovlivněných mitoxantronem a mitoxantronem v kombinaci s kofeinem, jakožto nespecifickým inhibitorem ATM kinázy. Nejprve jsme sledovali proliferační aktivitu buněk MOLT-4. Podrobnější analýza byla provedena pomocí průtokové cytometrie. Změny na molekulární úrovni byly sledovány pomocí western blotu s následnou imunodetekcí.

V první fázi naší práce jsme se zaměřili na sledování viability. Zjistili jsme, že kofein a mitoxantron u buněk MOLT-4 snižují proliferaci a zvyšují úmrtnost. K výraznému poklesu proliferace dochází u buněk vystavených působení 0,5 nmol/l MTX. Buňky ovlivněné 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem vykazují větší proliferaci než buňky vystavené samotnému 0,5 nmol/l MTX, což naznačuje, že kofein chrání ovlivněné buňky MOLT-4 před působením zejména vysokých dávek cytostatika.

Následně jsme sledovali apoptózu u ovlivněných buněk pomocí průtokové cytometrie. Analýza SS/EV a duální značení pomocí Annexinu V a PI ukázalo, že po 24 hodinách vzrůstá procentuální zastoupení mrtvých buněk se vzrůstající koncentrací MTX. U skupiny buněk vystavených působení 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem byla po 24 hodinách viditelná kombinace smrtícího účinku cytostatika s toxickým efektem kofeinu. Ovšem po 72 hodinách dochází k protektivnímu účinku inhibice ATM kinázy u buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX v kombinaci s kofeinem. Tato ochrana je však pouze dočasná.

Pomocí průtokové cytometrie jsme prováděli i analýzu obsahu DNA v buňce po 24 a 72 hodinách. Z DNA analýzy je patrné, že MTX způsobuje u buněk MOLT-4 zástavu buněčného cyklu v G2 fázi následovanou rozvojem apoptózy. Inhibice ATM kinázy kofeinem tuto zástavu buněčného cyklu znemožní. Zároveň je patrný krátkodobý ochranný efekt kofeinu před MTX způsobenou apoptózou.

V této práci jsem se také zaměřili na změny v expresi proteinů souvisejících s apoptózou a kontrolou buněčného cyklu. Sledovali jsme expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem p53-ser15 a p53\_ser392, dále pak protein p21, lamin B a ERK1,2.

Při sledování exprese proteinu p53 jsme pozorovali jeho nárůst zejména u buněk ovlivněných MTX a prokázali jsme, že u buněk MOLT-4 inhibice ATM kinázy po přidání kofeinu zabraňuje vzestupu hladiny p53 po 4 i 24 hodinách působení MTX. Dále jsme zjistili, že u buněk ovlivněných MTX dochází k vzestupu hladiny

fosforylovaných forem p53\_ser15 a p53\_ser392, kofein však tuto fosforylaci v odpovědi na poškození buňky MTX inhibuje. Inhibice fosforylované formy proteinu p53\_ser392 naznačuje, že ač tato fosforylace není přímo katalyzována ATM kinázou, jde o děj ATM závislý.

Sledováním proteinu p21 jsme dokázali, že tento protein je v důsledku zvýšené exprese proteinu p53 exprimován u buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX po 4 i 24 hodinách od ovlivnění. Dále jsme zjistili, že po přidání kofeinu v důsledku inhibice ATM kinázy dochází k zamezení exprese po 4 hodinách a ke snížení exprese po 24 hodinách.

Sledováním štěpení laminu B jsme zjistili postupný rozvoj apoptózy u buněk ovlivněných 0,5 nmol/l MTX a potvrdili jsme protektivní efekt kofeinu sledovaný v předchozích analýzách.

Závěrem lze říci, že tato práce přinesla potvrzení již známých faktů, že MTX způsobuje apoptózu a zástavu buněk v G2 fázi a kofein se chová jako inhibitor ATM kinázy a ruší tento blok. Zajímavé je, že u vyšších koncentrací cytostatika dochází k protektivnímu účinku kofeinu na ovlivněné buňky, tento efekt však může být pouze dočasný.

## 6. Seznam zkratek

AO – akridinová oranž  
APS – peroxidisíran amonný  
ATM – ataxie telangiektasie mutovaná kinaáza  
ATP – adenosintrifosfát  
ATR – ataxie telangiektasie a Rad3-related kináza  
BRCA – breast cancer gene produkt  
CARD – caspase recruitment doména  
CD – cluster of differentiation  
cyt-c – cytochrom c  
DED – death effector doména  
DISC – death inducing signaling komplex  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
DBS – dvouvláknový zlom  
E6-AP – E6-associated protein  
FADD – Fas-associated death domain protein  
FS – forward scatter  
FITC – fluorescein isothiokianát  
HR – homologní rekombinace  
IMDM – Iscova modifikace Dulbeccova média  
MTX – mitoxantron  
Mcl-1 – protein myeloidní buněčné linie 1  
NHEJ – nehomologní end-joining  
NK – natural killer  
PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza  
PI – propidium jodid  
PBS – fosfátový pufr  
PCNA – proliferating cell nuclear antigen  
RB – retinoblastoma  
SDS – sodium dodecylsulfát  
SS – side scatter  
TEMED – tetramethylethylendiamonium  
TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$

TNFR 1 – tumor necrosis factor receptor 1

WS – pracovní roztok

## 7. Seznam literatury

Adams JA, Corry S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322–6.

Bakkenist C, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421:499–506.

Darzynkiewicz Z. Apoptosis in antitumor strategies: Modulation of cell cycle and differentiation. *J Cell Biochem* 1995; 58:151–159.

Darzynkiewicz Z, Gloria Juan, Xun Li, Wojciech Gorczyca, Tomoyuki Murakami, and Frank Traganos. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental Cell Death (Necrosis). *Cytometry* 1997; 27:1–20

Draetta G and Eckstein J. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Apr 18; 1332(2):M53-63.

Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O`Conner PM and Piwnica-Worms H. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25; 275(8):5600-5.

Hořejší a Bartůňková. *Základy Imunologie*. Triton 2005. str. 26

Chebab NH, Malikzay A, Stavridi ES, and Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13777-82

Inanami, O.-Takahashi, K.-Kuwabara, M. Attenuation of caspase-3-dependent apoptosis by Trolox post-treatment of X-irradiated MOLT-4 cells. *Int. J. Radiat.*, 1999; 75:155-163



Izumi T and Maller JL. Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*. 1993 Dec; 4(12):1337-50.

Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene*. 1998 Dec 24; 17(25):3309-18. Review.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-11.

Kaufmann WK, Heffernan TP, Beaulieu LM, Doherty S, Frank AR, Zhou Y, Bryant MF, Zhou T, Luche DD, Nikolaishvili-Feinberg N, Simpson DA, Cordeiro-Stone M. Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat Res* 2003; 532:85-102.

Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. Related Articles, Links ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001; 8:1052-65. Review.

Klenner. Protinádorová chemoterapie. Galén 1996. str. 334-335

Kolektiv autorů. Vybrané kapitoly z molekulární patologie. Kapitola Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření – Vávrová J. *FVZ UO* 2008. str. 88-101

Kotala V, Uldrijan S, Nenutil R, Vojtěšek B. Protein p53 a protinádorová terapie. *Klinická onkologie* 2002; 15:98-101

Kravtsov VD, Daniel TO.-Koury, MJ. Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 1999; 155:1327-39

Krejsek a Kopecký. Klinická imunologie, 2004. str. 73-84

Kumagai A and Dunphy WG. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* 1999 May 1; 13(9):1067-72.

Larner JM, Lee H and Hamlin J. Radiation effects on DNA synthesis in a defined chromosomal replicon. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar; 14(3):1901-8.

Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 2000; 404:201-4.

Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jul 19; 92(14):1126-35. Review.

Nakano H, Yonekawa H, Shinohara K. Threshold level of p53 required for the induction of apoptosis in X-irradiated MOLT-4 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Jul 1; 68(3):883-91

Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 1990 Apr 5; 344(6266):503-8. Review.

Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J.* 1995 Jun 15; 308 ( Pt 3):697-711. Review.

Pospíšilová Š, Vojtěšek B. Protein p21<sup>WAF1</sup> a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. Česká onkologická společnost. 2004.

Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 1996 Dec; 135(6 Pt 1):1441-55.

Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol.* 1998; 25:11- 8. Review.

Rotman G and Shiloh Y. ATM: A mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* (1999);18:6135-6144.

Rudolfová G. Molekulární změny vyvolané frakcionovaným ozařováním u lidských nádorových buněk. 2008

Řezáčová M. Regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy u nádorových buněk. 2004.

Řezáčová M. Biodoz. Závěrečná zpráva POV. 2007

Řezáčová M, Vávrová J, Cerman J. Buňka a genotoxický stres: reakce na dvojité zlomy DNA. *Časopis lékařů českých*. 2005;144 (Suppl. 3):3-17

Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 1997; 36:10117-24.

Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia*. 2001 Nov-Dec; 535-46

Sun Yingli, Ye Xu, Kanaklata Roy, and Brendan D. Price. DNA- Damane- Included Acetylation of Lisine 3016 of ATM Activates ATM Dinase Activity. *Molekular and cellular biology*, Dec. 2007; 8502-8509.

Szkanderova S, Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Pavlova S, Smardova J, Stulik J. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol* 2003; 49:191-6.

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001 Apr 5; 20(15):1803-15. Review.

Tempel K, von Zallinger C. Caffeine-DNA interactions: biochemical investigations comprising DNA-repair enzymes and nucleic acid synthesis. *Z Naturforsch.* 1997; 52:466-74.

Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62.

Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007; 39:1467-1482.

Uldrijan S, Kotala V a Vojtěšek B. Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chem. Listy* 2002; 96:145-149.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96:245-54.

Vávrová M, Mareková-Řezáčová M, Vokurková D, Szkanderová S, Psutka J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiat Environ Biophys* 2003; 42:193-99.

Vávrová J, Stulík J, Mareková M, Vokurková D. Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. 2002

Vindelov, L. Microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from tumors and cell suspension. *Virchows Arch. Cell. Pathol.* 1977; 173:227-242

Yang Jun, Yingnian Yu, Hope E. Hamrick and Penelope J. Duerksen-Hughen. ATM,ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* (2003); 24(10):71-1580.

Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* 1998; 273:3799-802.

Waterman MJF, Stavridi ES, Waterman JLF and Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet.* 1998 Jun; 19(2):175-8.