

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Význam regulací signální cesty proteinu p53  
v protinádorové léčbě: inhibice p53

Bc. Soňa Zemánková

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. Soňa ZEMÁNKOVÁ**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

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

### 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. 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 p53 (pifithrin) 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 p53 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.

V Pardubicích dne 27. 4. 2009

Bc. Soňa Zemánková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této práce, zejména doc. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za odborné vedení, kvalitní pracovní zázemí a velkou pomoc se sepsáním diplomové práce.

Děkuji také Mgr. Darině Muthné, Ph.D. za odborné připomínky a vedení při zpracovávání experimentální části této práce. V neposlední řadě děkuji všem ostatním zaměstnancům Ústavu lékařské biochemie-UK, zejména Nadě Mazánkové za pomoc při osvojování techniky práce s buněčnou linií MOLT-4.

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

## SOUHRN

Cílem této práce bylo zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibitor proteinu p53, pifithrin- $\alpha$ , u lidských nádorových buněk aktivaci biochemických cest vedoucích k detekci a reparaci mitoxantronem vyvolaného poškození DNA nebo indukci apoptózy. Jako modelový systém byla zvolena buněčná linie MOLT-4 odvozená od lidské T-lymfocytární leukémie. Zaměřili jsme se na studii viability a proliferační aktivity buněk, apoptózy a buněčného cyklu pomocí flow-cytometrických metod a na expresi sledovaných proteinů (p53 a jeho fosforylované formy, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ERK 1/2, lamin B a  $\beta$ -aktin) využitím elektroforézy a western blotu s následnou imunodetekcí.

Zjistili jsme, že pifithrin- $\alpha$  snižuje u buněk MOLT-4 indukci p53 a následnou indukci p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 0,5 nmol/l mitoxantronem pouze v časném intervalu (4 hodiny), v pozdější fázi převáží potenciace cytotoxického působení mitoxantronu a indukce apoptózy, provázená již srovnatelným vzestupem p53 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Mitoxantronem indukovaná zástava buněčného cyklu v G2/M fázi není inhibicí p53 ovlivněna.

Klíčová slova: apoptóza, mitoxantron, MOLT-4, pifithrin- $\alpha$ , protein p53

## SUMMARY

The aim of this work was to determine whether and how the protein p53 inhibitor, pifithrin- $\alpha$ , affects in human tumor cells biochemical pathways leading to the detection and repair of DNA damage induced by mitoxantrone and/or induction of apoptosis. As a model system cell line MOLT-4 derived from human T-lymphocytic leukemia was selected. We focused on the study of viability and proliferative activity of cells, apoptosis and cell cycle using flow-cytometric methods and we also monitored the expression of proteins (p53 and its phosphorylated forms, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ERK 1/2, lamin B and  $\beta$ -actin) using electrophoresis and Western blot followed by immunodetection.

We have found that pifithrin- $\alpha$  reduced in MOLT-4 cells, induction of p53 and subsequent induction of p21WAF1/CIP1 caused by 0,5 nmol/l mitoxantrone in the early interval (4 hours), and at a later stage the potentiation of cytotoxic action of mitoxantrone and the induction of apoptosis prevailed, accompanied by the comparable increases in p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Mitoxantrone-induced cell cycle arrest in G2/M phase is not affected by inhibition of p53.

Key words: apoptosis, mitoxantrone, MOLT-4, pifithrin- $\alpha$ , protein p53



# OBSAH

1 Úvod .....	11
2 Teoretická část .....	13
2.1 Apoptóza .....	13
2.1.1 Obecná charakteristika apoptózy .....	13
2.1.2 Přehled regulace apoptózy na molekulární úrovni .....	14
2.1.2.1 Kaspasy .....	15
2.1.2.2 Receptorová dráha .....	16
2.1.2.3 Mitochondriální dráha .....	17
2.1.2.4 Proteiny rodiny Bcl-2 .....	19
2.2 ATM, ATR a dvojité zlomy DNA .....	21
2.3 Check-point kinasy Chk1 a Chk2 .....	23
2.4 Protein p53 .....	24
2.4.1 Charakteristika a struktura proteinu p53 .....	24
2.4.2 Funkce proteinu p53 .....	26
2.4.2.1 Funkce proteinu p53 v regulaci buněčného cyklu .....	27
2.4.2.2 Funkce proteinu p53 v navození apoptózy .....	27
2.4.3 Stabilizace a aktivace proteinu p53 .....	28
2.4.4 Degradace proteinu p53 .....	29
2.4.5 Cytostatikum mitoxantron jako induktor poškození DNA a apoptózy .....	30
2.4.6 Pifithrin- $\alpha$ .....	31
2.4.7 Hematopoetická nádorová linie MOLT-4 .....	32
3 Experimentální část .....	33
3.1 Materiál a metodika .....	33
3.1.1 Kultivace a pasážování buněčné linie MOLT-4 .....	33
3.1.2 Ředění mitoxantronu a inhibitoru pifithrinu- $\alpha$ .....	33
3.1.3 Viabilita buněk MOLT-4 .....	34
3.1.4 Flow-cytometrické metody .....	34
3.1.5 Elektroforéza a Western-blott .....	36
3.1.5.1 Lýza buněk .....	36
3.1.5.2 Stanovení celkové bílkoviny .....	37
3.1.5.3 Elektroforéza a Western-blott .....	38
3.2 Přístroje .....	42
4 Výsledky a diskuse .....	43
4.1 Viabilita a proliferace .....	43
4.1.1 Výběr dávkového schématu mitoxantronu pomocí sledování proliferační aktivity a viability buněk MOLT-4 .....	43
4.1.2 Vliv pifithrinu- $\alpha$ na působení mitoxantronu .....	45
4.2 Analýza apoptózy pomocí flow-cytometrie .....	48
4.2.1 Analýza AnnexinV/PI a jednoparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events .....	48
4.2.1.1 Analýza 24 hodin po ovlivnění .....	49
4.2.1.2 Analýza 72 hodin po ovlivnění .....	52
4.2.2 Dvouparametrická analýza Side-scatter/objem .....	54
4.3 Analýza buněčného cyklu .....	57
4.3.1 DNA analýza buněk 24 hodin po ovlivnění .....	57
4.3.2 DNA analýza buněk 72 hodin po ovlivnění .....	58
4.4 Elektroforéza a Western-blott .....	59



4.4.1	Expres proteinu p53 v buňkách MOLT-4.....	61
4.4.2	Posttranslační modifikace proteinu p53 .....	62
4.4.3	Expres proteinu p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	63
4.4.4	Expres ERK 1/2 .....	65
4.2.4	Expres laminu B .....	65
5	Závěr .....	67
6	Seznam literatury .....	69

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Annexin V
AIF	faktor indukující apoptózu
APS	amonium persulfát
ATM	ataxie telangiectasie-mutovaná kinasa
ATP	adenosin trifosfát
ATR	ataxioteleangiectasia and Rad3-related
CARD	casapase activation and recruitment domain
dATP	deoxyadenosin trifosfát
DED	efektorová doména smrti
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvojitý zlom DNA
EV	elektronický objem
FADD	Fas Associated Death Domains
FADD	Fas-asociovaná smrtící doména, Associated Death Domains
FITC	fluorescein isothiokyanát
FSC	forward scatter
HR	homologní rekombinace
IMDM	Iscova modifikace Dulbecova média
IOD	integrovaná optická densita
JNK	Jun NH <sub>2</sub> -koncová kinasa
MW	molekulová hmotnost
MX	mitoxantron
NES	nuclear export signal
NHEJ	nehomologní spojování konců
NLS	nuclear localization signal
PBS	fosfátový pufr v médiu fyziologického roztoku (pH 7,4)
PFT- $\alpha$	pifithrin- $\alpha$
PI	propidium jodid
PO	protookogeny
PTP	Permeability Transition Pore, přechodový pór permeability

PVDF	Polyvinylidene Fluoride
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SSC	side scatter
TAFs	TBP-associated factors
TBP	TATA box-binding protein
TBS	Salinický roztok na bázi Tris
TEMED	tetramethylethylenediamonium
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TS	tumorové supresory
WS	pracovní roztok
wt	wild type

Pozn. Zkratky a názvy proteinů a genů, pro něž není zažitý český ekvivalent, nejsou uvedeny.

# 1 Úvod

Znalost signálních drah, které vedou ke spuštění apoptózy u leukemických buněk po působení ionizujícího záření a chemoterapeutických látek a objasnění molekulárních mechanismů signalizace, reparace poškození DNA a indukce apoptózy, umožňují navrhnout optimální protinádorovou strategii. Smyslem chemoterapie a radioterapie je zastavit proliferaci a zvyšovat buněčnou smrt. V současné době je však chemoterapie limitována především vedlejšími toxickými účinky na normální tkáň. Řada publikací se proto zabývá způsobem, jak v senzitivních buňkách inhibovat apoptózu indukovanou poškozením DNA a zvýšit tak množství buněk, které stres přežijí. U mnoha buněčných linií se v tomto směru jeví jako účinný pifithrin- $\alpha$ , inhibitor proteinu p53. Existují však už i práce, které potvrzují, že pifithrin- $\alpha$  cytotoxicitu některých protinádorových látek potencuje.

Proto předmětem naší studie bylo zjistit jakým způsobem pifithrin- $\alpha$  a inhibice p53 ovlivňují mitoxantronem indukovanou buněčnou smrt u leukemických buněk MOLT-4.

Teoretická část práce popisuje současný stav poznání o proteinu p53, jeho regulaci a vztahu k indukci apoptózy. Dále pak charakterizuje mechanismus protinádorového působení mitoxantronu a význam pifithrinu- $\alpha$ . Popsány jsou molekulární mechanismy vedoucích k reparačním procesům či indukci apoptózy po poškození DNA.

V experimentální části jsou popsány chemikálie, buněčná linie, přístrojové vybavení a postupy prováděných metod.

Výsledky prováděných analýz shrnuje kapitola výsledky a diskuse. Nejprve jsme pomocí sledování proliferační aktivity zvolili dávkové schéma mitoxantronu pro další studii. Stanovili jsme viabilitu buněk po expozici vybraných koncentrací mitoxantronu a pifithrinu- $\alpha$ . Ke sledování vlivu inhibitoru proteinu p53 na protinádorové působení mitoxantronu jsme dále využili stanovení apoptózy a analýzy buněčného cyklu. Indukci apoptózy jsme zkoumali pomocí flow-cytometrických metod za použití značení buněk pomocí konjugátu Annexin V-FITC a propidium jodidu a pomocí analýzy změn optických parametrů rozptylu světla, která doplňuje metody detekujících apoptózu. Pro stanovení obsahu DNA a změn v buněčném cyklu v jednotlivých testovaných skupinách buněk MOLT-4 jsme ve dvou intervalech po ovlivnění provedli flow-cytometrickou analýzu obsahu DNA. Následně jsme studovali expresi a posttranslační modifikace proteinu p53 a dalších proteinů podílejících se na rozvoji apoptózy a na regulaci buněčného cyklu (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ERK 1/2, lamin B). Pro detekci změn v množství proteinů jsme použili

elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, westernový přenos, selektivní imunodetekci a kvantifikaci měřením optické denzity.

Interpretace výsledků je zaměřena na identifikaci změn v buňkách vystavených působení různých koncentrací mitoxantronu a to jak samostatně, tak v kombinaci s pifithrinem- $\alpha$  v závislosti na čase.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Apoptóza

#### 2.1.1 Obecná charakteristika apoptózy

Termín apoptóza byl vytvořen k popisu morfologických procesů vedoucích ke kontrolované buněčné smrti přirovnávané k „opadávání listů ze stromu“ a poprvé jej ve své publikaci použili r. 1972 Kerr, Wyllie a Currie (*Kerr et al., 1972*).

Apoptóza je aktivní a definovaný proces, který je podkladem řady fyziologických i patologických mechanismů. Vyskytuje se jako nedílná součást embryogeneze, ontogenetického vývoje a diferenciaci buněk (*Kaufmann a Hengartner, 2001*). Podílí se na homeostáze ve tkáních, hraje roli při vývoji imunitního systému a je důležitá pro patogenezi mnoha nemocí (*Fadeel et al., 1999*). Vedle apoptózy, zřejmě nejčastější formy programované buněčné smrti, existují jiné neapoptické typy buněčné smrti, které mohou být biologicky významné (*Leist a Jäätelä, 2001*).

Ke spuštění apoptózy je zapotřebí specifických impulsů, které narozdíl od nekrózy nevedou k zánětu a dalším patologickým stavům. Tyto stimuly jsou buď fyzikální (ionizující záření, UV-záření, teplota) nebo chemické (specifické smrtící ligandy, nedostatek růstových faktorů a celá řada chemikálií) povahy, výsledný typ buněčné smrti však také závisí na intenzitě stimulu.

Během apoptózy aktivuje buňka vnitřní sebevražedný mechanismus, který je spjat s řadou fyziologických, biochemických a morfologických změn, které se týkají jádra, cytoplazmy i cytoplazmatické membrány. Morfologicky je počátek apoptózy charakterizován smršťováním buňky a jádra. Dochází ke kondenzaci chromatinu v jádře a následně k rozpadu jádra. Buňka se odděluje od okolní tkáně a rozpadá se na membránou uzavřená apoptická tělíška obsahující cytosol, buněčné organely a fragmenty jádra. Tato apoptická tělíška jsou rychle pohlcena sousedními buňkami, kterými jsou makrofágy a buňky parenchymu. Na rozdíl od jiných forem smrti probíhá apoptóza bez poškození okolních buněk a tkání a bez rozvinutí destruktivní zánětové odpovědi (*Saraste a Pulkki, 2000*).

Biochemickým znakem apoptózy je degradace DNA endonukleasami, které štěpí chromatin preferenčně v internukleosomální sekvenci za vzniku 180 bp dlouhých oligonukleosomálních fragmentů. Tyto fragmenty na elektroforeogramu z agarózové gelové elektroforézy vytvářejí typický žebříčkovitý obraz, což je charakteristickou

známkou apoptózy (Wyllie, 1980). Únik těchto fragmentů z buněk rovněž vede k poklesu obsahu DNA v apoptických buňkách.

Pro průběh apoptózy je nezbytná energie ve formě ATP a dalších nukleosid trifosfátů pro syntézu potřebných proteinů, reparaci polynukleotidů atd. Jestliže se energie ve formě ATP nedostává, jedinou alternativou je nekróza (Vávrová *et al.*, 2002).

Porucha mechanismů smrti je výsledkem mutace genů, které kódují faktory přímo nebo nepřímo spojené se zahájením, zprostředkováním nebo uskutečněním apoptózy. Mutace v apoptických genech jsou příčinou nebo přispívajícím faktorem četných závažných onemocnění (Müllauer *et al.*, 2001). Genetické změny zabráňující buňce vstoupit do apoptózy mohou vést k rozvoji nádorových onemocnění, imunodeficitních virových infekcí a autoimunitních stavů. Existují i onemocnění, která vznikají v důsledku přílišného výskytu apoptózy ve tkáních. Jsou to akutní a chronické neurodegenerativní stavy, různé hematopoetické poruchy a AIDS (Vávrová *et al.*, 2002).

### **2.1.2 Přehled regulace apoptózy na molekulární úrovni**

Apoptóza je definována jako konkrétní forma geneticky řízené buněčné smrti, která je řízena expresí a vzájemnou interakcí specifických proteinů kódovaných vysoce konzervovanými geny (Krejsek a Kopecký, 2004).

Nejprve byly mechanismy apoptózy popsány u bezobratlých živočichů z kmene hlístů. Horvitz ve své studii použil pro identifikaci a charakterizaci genů a proteinů spojených s programovanou buněčnou smrtí hlístici *Caenorhabditis elegans*. U tohoto dobře kultivovatelného živočicha, jehož tělo je tvořeno z přesně definovaného počtu buněk a buněčná smrt je u něj řízena kaskádou nejméně deseti genů, byly identifikovány geny *ced-3* a *ced-4* (cell death defective) kódující proteasy homologní se savčími kaspasami (Horvitz, 1999).

Existuje celá řada buněčných faktorů zapojených do signálních drah apoptózy. Mezi tyto faktory patří buněčné povrchové receptory, regulátory buněčného cyklu, proteolytické enzymy (kaspasy), členové rodiny Bcl-2, inhibitory apoptického proteinu (IAPs), heat shock proteiny a buněčné adhezivní proteiny (Cho a Choi, 2002). Mezi faktory regulace apoptózy je možné uvést i protein p53, který řídí transkripci jiných bílkovin a připravuje tím tak podmínky pro úspěšný průběh apoptózy (Krejsek a Kopecký, 2004).



### 2.1.2.1 Kaspasy

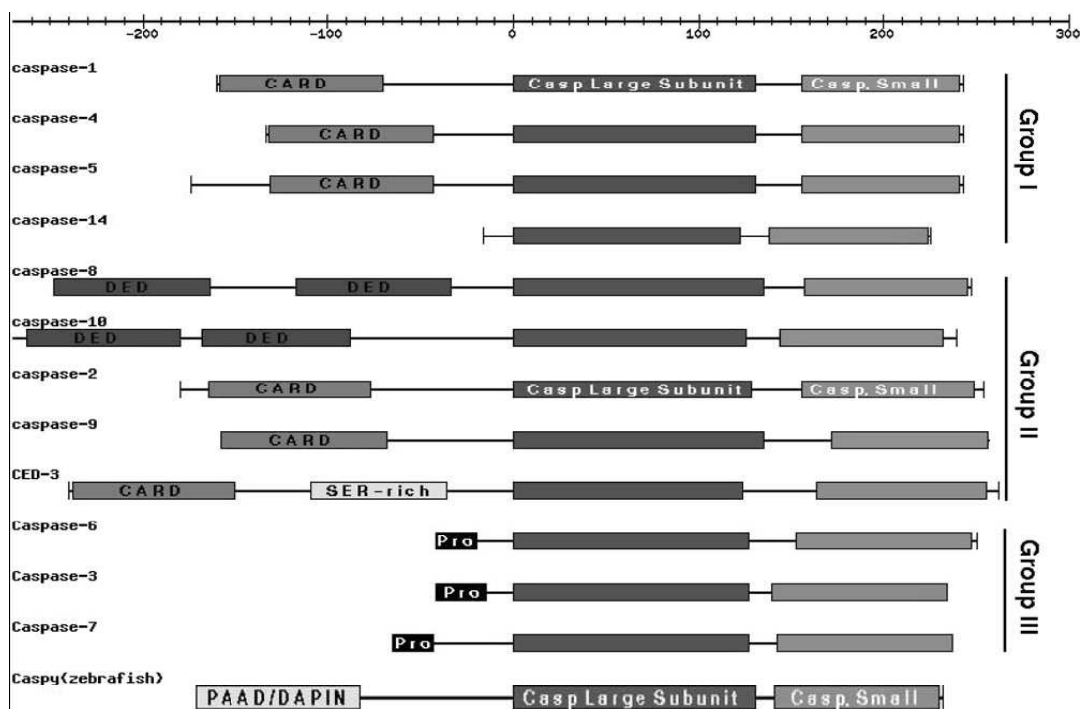
Kaspasy, cysteinové proteasy, jsou zodpovědné za zánik buňky (štěpení strukturálních, jaderných a dalších proteinů) a výsledný morfologický obraz apoptózy (*Thornberry a Lazebnik, 1998*). Kaspasy selektivně štěpí cílové proteiny, obvykle v jedné nebo několika málo pozicích (*Řezáčová, 2004*).

Neaktivní prokaspasy jsou jednořetězcové, každý řetězec má amino-terminální prodoménu, dlouhou podjednotku a malou karboxy-terminální podjednotku, které jsou někdy odděleny spojovacím peptidem. Proteolytické štěpení proenzymu na vnitřních specifických aspartátových reziduích má za následek odstranění prodomény a vytvoření aktivního heterodimeru složeného ze dvou dlouhých (20 kDa) a dvou malých (10 kDa) podjednotek (*Salvesen a Dixit, 1999; Bayascas et al., 2002; Cohen, 1997*).

Studie o substrátové specifitě, prodoménové struktuře a biologické funkci odhalily, že kaspasy jsou během apoptózy kaskádovitě štěpeny a aktivovány. Aktivace iniciátorových kaspas 2, 8, 9 a 10 proapoptickými signály vede k proteolytické aktivaci efektorových kaspas 3, 6 a 7 (*Saraste a Pulkki, 2000*). Tato proteolytická kaskáda, během které jedna kaspasa může aktivovat jiné kaspasy, zesiluje apoptickou signální cestu a vede tak k rychlé buněčné smrti.

Zatímco efektorové kaspasy mají pouze krátké prodomény, iniciátorové kaspasy mají dlouhé prodomény s interakčními motivy jako efektorová doména smrti (DED, death effector domain) v případě prokaspas 8 a 10 nebo CARD (caspase activation and recruitment domain) v případě prokaspas 9 a 2. Přestože kaspasy 2 a 9 nebo kaspasy 8 a 10 mají stejnou kombinaci domén, je každá z nich zapojena v jiné části apoptické signální cesty. Pro rozlišení biologické funkce musí být tedy detaily domén v každém proteinu zkoumány podrobně (*Doctor et al., 2003*).

Vedle těchto kaspas uplatňujících se při apoptóze existují kaspasy 1, 4, 5, 11, 12 a 14 zapojené do aktivace cytokinů (Obr. 1; *Grütter, 2000*).



**Obr. 1.** Schéma lidských kaspas. První skupina zahrnuje kaspasy aktivující cytokiny, druhá skupina jsou iniciátorové kaspasy zapojené v apoptotické cestě a třetí skupinou jsou kaspasy efektorové (*Doctor et al., 2003*).

Jsou známy dvě hlavní cesty aktivace iniciátorových kaspas – receptorová (vnější) a mitochondriální (vnitřní) dráha.

### 2.1.2.2 Receptorová dráha

Faktory z vnějšího prostředí spouští apoptické procesy na podkladě interakce povrchových receptorových systémů buňky (receptory smrti) s příslušnými ligandy.

Receptory smrti jsou transmembránové proteiny, které patří do rodiny TNF receptorů. Tyto receptory jsou složeny z extracelulární domény bohaté na cystein a cytoplazmatické domény tvořené asi 80 aminokyselinami nazývané jako domény smrti (Death Domains-DD) (*Ashkenazi a Dixit, 1998*).

Typickým příkladem a nejlépe popsáním procesem aktivace receptorů je signální dráha receptoru Fas (Apo-1, CD95). Připojením ligandu FasL dochází ke konformační změně C-konců molekul (Death Domains-DD). Receptor trimerizuje a prostřednictvím komplementárních domén DD váže cytoplazmatický protein FADD (Fas Associated Death Domains). Protein FADD se následně spojuje díky DED doméně s iniciační kaspasou

kaskády vnější cesty, prokaspasou 8. V tomto okamžiku vzniká komplexu označovaný jako DISC (smrt vyvolávající signální komplex) mající za následek auto-katalyzovanou aktivaci prokaspasy 8 (*Kischkel et al., 1995*). Aktivovaná kaspasa 8 štěpí různé substráty v buňce a také efektorovou prokaspasu 3, jejíž aktivace vede k aktivaci smrtícího programu buňky (*Medema et al., 1997*).

Kromě výše zmíněného receptoru lze navodit apoptózu touto cestou taky přes receptory TNF-R1, TRAMP (WSL-1/DR-3/LARD), receptory pro TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) TRAIL-R1 (DR-4), TRAIL-R2 (DR-5, Apo-2, TRICK-2, KILLER) a DR-6 (*Ashkenazi a Dixit, 1999, 1998*).

Apoptóza spouštěná přes receptory smrti může být inhibována celulárním proteinem c-FLIP, který se váže k FADD a kaspase 8 (*Scaffidi et al., 1999*). Jiným proteinem regulujícím apoptózu je Toso. Tento protein blokuje Fas-indukovanou apoptózu v T buňkách inhibicí kaspasy 8 (*Hitoshi et al., 1998*).

### **2.1.2.3 Mitochondriální dráha**

Mitochondrie, vedle své funkce v dýchacím řetězci, hrají důležitou roli v procesu apoptózy.

Aktivátory vnitřní cesty indukce apoptózy mohou být buněčné metabolické změny, volné radikály, anoxie, působení virů a cytostatik (*Krejsek a Kopecký, 2004*). K selhání suprese smrtícího programu, a tedy ke spuštění apoptózy, vede taky nedostatek růstových faktorů, hormonů a cytokinů (*Elmore, 2007*). Nejčastěji však na počátku vnitřní cesty stojí poškození DNA, následná fosforylace proteinu p53 a dále pak aktivace pro-apoptických členů rodiny Bcl-2 (*Krejsek a Kopecký, 2004; Řezáčová, 2004*).

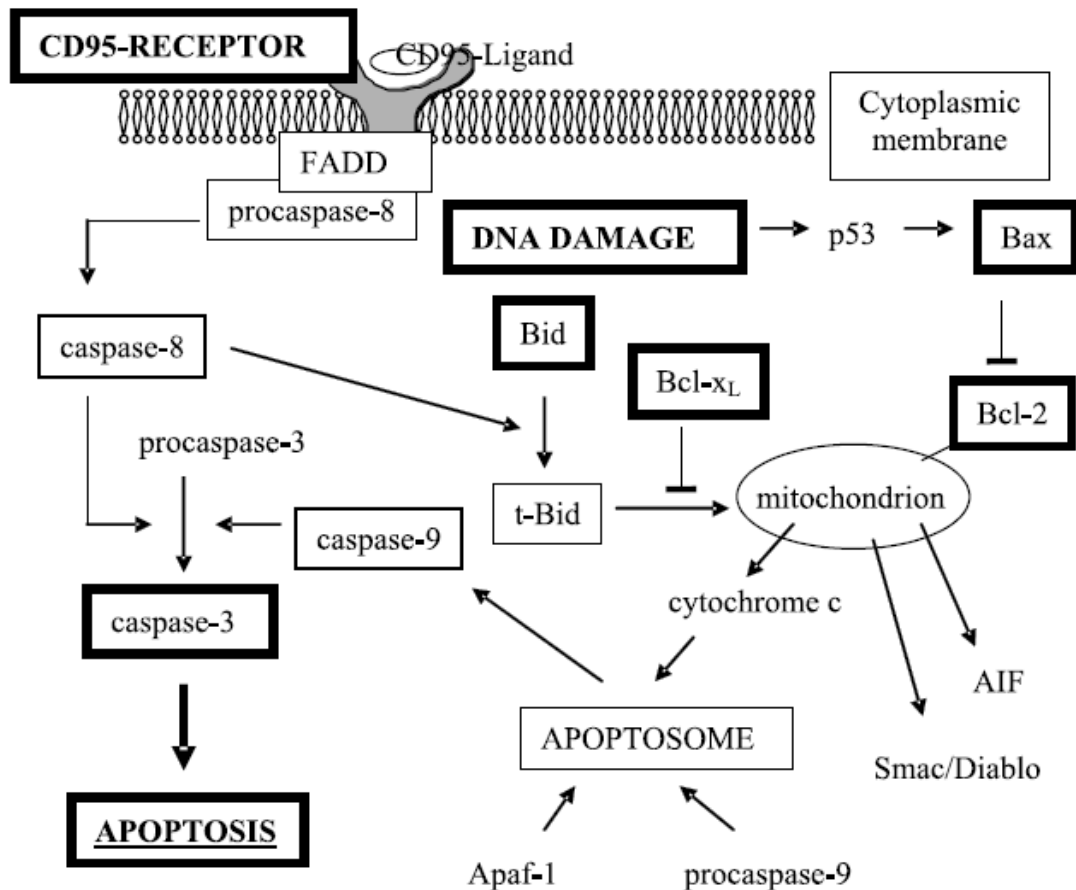
Důležitým poznáním v procesu objasňování molekulárních mechanismů apoptózy bylo, že mitochondriální proteiny přispívají k aktivaci kaspas a následnému štěpení DNA (*Li et al., 1997*). Byla vypracována řada modelů vysvětlujících, jak mitochondrie uvolňují tyto proteiny z intermembránového prostoru do cytoplazmy. Jeden z modelů prosazuje přítomnost mitochondriálního kanálu (PTP, Permeability Transition Pore, přechodový pór permeability), jehož otevírání může být modulováno pro- a anti-apoptickými proteiny rodiny Bcl-2. Vznik PTP způsobuje ztrátu transmembránové potenciálu, což je klíčovou událostí v procesu apoptózy (*Zamzami a Kroemer, 2001*). Jiné práce popisují tvorbu pórů přímo z membránových pro-apoptických proteinů rodiny Bcl-2 (viz kap. 2.1.2.4). Například po indukci apoptózy je Bax, cytoplazmatický protein z rodiny Bcl-2,

translokován a začleněn do vnější mitochondriální membrány. Dohromady s Bak, proteinem z rodiny Bcl-2 přítomným ve vnější mitochondriální membráně, tvoří kanály, kterými může unikat cytochrom *c* (*van Gurp et al., 2003*). Cytochrom *c* je rozpustný protein o celkové velikosti asi 12 kDa obsahující hemové skupiny. Normálně je vázán na povrch vnitřní mitochondriální membrány.

Cytochrom *c* uvolněný z mitochondrie do cytoplazmy je schopný v přítomnosti dATP interagovat s proteinem Apaf-1, který postupně aktivuje prokaspasu 9. Spojením cytochromu *c*, Apaf-1 a prokaspasy 9 se utváří multiproteinový komplex známý jako apoptosom (*Yin, 2000*). V apoptosomu dochází k aktivaci kaspasy 9, následně apoptosom aktivuje prokaspasu 3 a aktivní kaspasa 3 je zodpovědná za vlastní apoptický proces (*Řezáčová, 2004*).

Z mitochondrie jsou v průběhu apoptózy uvolňovány další proteiny, jako například Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF (faktor indukující apoptózu) a endonukleáza G. Smac/DIABLO je antagonistou XIAP (X-vázaný inhibitor apoptózy), což je cytoplazmatický protein, který efektivně blokuje aktivované kaspasy a brání tak spuštění proteolytické kaskády. Omi/HtrA2 sdílí funkční vlastnosti s Smac/DIABLO. Je uvolňován z intramembránového prostoru mitochondrie a inhibuje cytoplazmatické proteiny IAP (inhibitor apoptózy). AIF katalyzuje uvolnění dalšího cytochromu *c* a spolu s endonukleázou G způsobuje na kaspasách nezávislou apoptózu (*Cory et al., 2003*).

Mezi receptorovou a mitochondriální cestou existuje propojení zprostředkované proteiny obsahující pouze BH3 doménu (Obr. 2). Příkladem je aktivace cytosolického pro-apoptického proteinu Bid kaspasou 8 z receptorové dráhy. Aktivovaný Bid následně usnadňuje permeabilizaci mitochondrie, uvolnění cytochromu *c* a dalších molekul do cytoplazmy a spuštění cesty mitochondriální smrti (*Cory et al., 2003*).



**Obr. 2.** Schématický model signálních cest apoptózy vedoucí k aktivaci kaspasy 3 (Tichý, 2006).

#### 2.1.2.4 Proteiny rodiny Bcl-2

Proteiny rodiny Bcl-2 jsou nejdůležitějšími regulátory mitochondriální cesty. Jejich hlavní funkcí je udržení mitochondriální integrity a kontrola uvolňování mitochondriálních proteinů do cytoplazmy (Cory a Adams, 2002). Na základě strukturálních kritérií, kterými jsou tzv. Bcl-2 homologní domény (BH), mohou v buňce indukovat nebo inhibovat proces apoptózy. Anti-apoptické proteiny rodiny Bcl-2 obsahují všechny domény BH1, BH2, BH3 a BH4, na druhou stranu pro-apoptické proteiny vedoucí buňku k zániku mohou obsahovat různé domény, ale nikdy jim nechybí BH3 (Tichý, 2006).

Skupina Bcl-2 proteinů byla rozdělena do tří skupin. V první skupině jsou zahrnuty anti-apoptické Bcl-2-příbuzné faktory přežití jako Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10 a Bcl-B. Druhá skupina obsahuje pro-apoptické Bax-příbuzné faktory smrti jako Bax, Bak, Bok/Mtd a Bcl-x<sub>s</sub>. Třetí skupinu tvoří BH3-příbuzné pro-apoptické faktory smrti mající jen doménu BH3 (tzv. BH3-onlies) jako Bid,

Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim<sub>L</sub> /Bod, Bad, Noxa, PUMA/Bbc3 a Bmf (*Borner, 2003*).

Anti-apoptické Bcl-2-příbuzné faktory přežití se vyznačují třemi nebo čtyřmi Bcl-2 homologními doménami (BH1-BH4). Tyto domény nemají enzymatickou aktivitu, ale zprostředkovávají interakci Bcl-2-příbuzných faktorů s jinými proteiny (*Borner, 2003*). BH1-BH3 domény tvoří hydrofóbní kapsu, která je stabilizována N-terminální BH4 doménou (*Aritomi et al., 1997*). Hydrofóbní kapsa je funkční oblastí Bcl-2-příbuzných faktorů a pro-apoptické proteiny mající BH3 doménu, savčí CED4 homology a případně i jiné pro-apoptické proteiny s chybějící BH3 doménou zde soutěží o vytvoření vazby za vzniku nefunkčních heterodimerů. Bcl-2-příbuzné faktory přežití jsou integrální součástí intracelulárních membrán (mitochondriální, jaderné, retikulární) a vykonávají svoji funkci bez výrazné změny struktury nebo subcelulární lokalizace (*Borner, 2003*).

Pro-apoptické Bax-příbuzné faktory smrti zahrnují tři savčí proteiny Bax, Bak a Bok/Mtd obsahující tři BH domény (BH1-BH3), jenž stejně jako u Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> tvoří hydrofóbní kapsu, do které se mohou vázat BH3 peptidy jiných proteinů (*Borner, 2003*). Nepřítomnost stabilizující domény BH4 byla zpočátku považována za příčinu pro-apoptického chování v důsledku konformační změny. Avšak tento mechanismus není postačující k vysvětlení rozdílného působení Bax-příbuzných faktorů smrti a Bcl-2-příbuzných faktorů přežití. Existují totiž Bcl-2-příbuzné faktory přežití jako Mcl-1 a A1, které neobsahují BH4 doménu a přesto působí ve smyslu přežití buňky a ne jako faktory smrti (*Adams a Cory, 1998*). Navíc Bcl-x<sub>L</sub> postrádá BH1 a BH2 domény, ale má BH4 motiv a působí anti-apopticky (*Boise et al., 1993*). Pro-apoptická aktivita Bax-příbuzných faktorů nesouvisí tedy s jejich strukturou, ale nýbrž se subcelulární lokalizací. Bax-příbuzné faktory smrti v průběhu apoptózy mění svoji strukturu, přemísťují se z cytoplazmy do vnější membrány, kde formují póry nebo interagují s proteiny tvořícími póry a jsou tak schopny přivodit smrt buňky (*Tichý, 2006*).

BH3-příbuzné pro-apoptické faktory smrti obsahují samotnou interagující BH3 doménu, která je nezbytná a postačující pro jejich pro-apoptickou funkci. Ve zdravých savcích buňkách jsou tyto proteiny udržovány v inaktivním stavu transkripčním a translačním mechanismem. K jejich aktivaci může docházet v důsledku apoptického signálu jedním nebo několika mechanismy. Každý savčí BH3-příbuzný faktor je regulován rozdílně v závislosti na povaze proteinu a původu apoptického stimulu. V důsledku poškozením DNA chemoterapeutiky a UV-zářením je aktivován transkripční faktor p53, který indukuje expresi BH3-příbuzných faktorů smrti PUMA a Noxa (*Lakin a Jackson,*

1999). Nedostatek růstových faktorů a cytokinů nebo vazba ligandu na receptory smrti zasvede k aktivaci proteinů posttranslační modifikací. Jinou cestou vedoucí k aktivaci BH3-příbuzných faktorů smrti je proteolýza, mechanismus užívaný k aktivaci BH3-příbuzného faktoru Bid jako odpověď na aktivaci receptorů smrti. Jsou-li BH3-příbuzné proapoptické faktory aktivovány, interagují s Bcl-2-příbuznými faktory přežití, inaktivují je a volné Bax-příbuzné faktory pak mohou podléhat určitým konformačním změnám, jenž mají za následek uvolnění dalších pro-apoptických a kaspasy aktivujících faktorů (*Tichý, 2006; Borner, 2003*).

## 2.2 ATM, ATR a dvojité zlomy DNA

Ataxia-teleangiectasia mutated (ATM) a rad3-related (ATR) jsou serin/threonin specifické kinasy patřící do rozsáhlé rodiny fosfatidylinozitol-3 kinas (PI3Ks - ATM, ATR, DNA-PK, hSMG-1, mTOR a TRRAP). V případě poškození DNA jsou ATM, ATR a DNA-PK zapojeny v regulaci aktivity proteinu p53 (*Lakin a Jackson, 1999*).

ATM gen, který je mutován u pacientů s autosomálně recesivním onemocněním ataxia teleangiectasia (A-T), je lokalizován na lidském chromosomu 11q22-23 (*Lakin a Jackson, 1999; Bakkenist a Kastan, 2003*). Produktem tohoto genu je protein ATM dlouhý 350 kDa, jehož hlavní funkcí je odpověď buňky na dvojité zlomy DNA (double strand breaks, DSB), které nastávají v průběhu normálního vývoje nebo jsou vyvolány působením vnějších fyzikálních nebo chemických vlivů (*Shiloh, 2006*).

Dvojité zlomy DNA představují zvláště nebezpečné poškození buňky a aktivují komplexní buněčnou odpověď. Jsou aktivovány kontrolní body, které dočasně zastaví buněčný cyklus a umožní tak zhodnocení poškození DNA a jeho opravu. V případě velkého poškození je rychle spouštěna programovaná buněčná smrt. Eukaryotické buňky používají pro opravu DSB dva hlavní mechanismy: Nehomologní koncové spojení (nonhomologous end-joining, NHEJ) odpovědné za reparaci ve všech fázích buněčného cyklu a homologní rekombinaci (HR) mezi sesterskými chromatidami, která probíhá v pozdní S a G2 fázi. Tyto mechanismy jsou realizovány ve spolupráci s proteiny Mre11, Rad50 (ochranný chromozomální faktor) a Nbs1 (proteiny reparačního komplexu, MRN), Mdc1 (mediator of DNA-damage checkpoint protein 1), 53BP1 (p53-vazebný protein 1) a BRCA1 (multifunkční tumor supresorový protein), fosforylovanou formou histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX), které se lokalizují v místě DSB a podílí se na opravě poškození (*Shiloh, 2006*).



Aktivace ATM je bezprostřední reakcí na DSB (*Shiloh, 2006*). ATM je aktivována intermolekulární fosforylací na Ser1981, která způsobuje disociaci inaktivního dimeru a rychlou aktivaci ATM kinasové aktivity. ATM pak pomocí fosforylace aktivuje řadu substrátů podílejících se na zastavení buněčného cyklu a další reakci buňky. Fosforylace proteinu p53, Mdm2 a Chk2 vede k bloku v G1 fázi. Přechodná akumulace buněk v S fázi je způsobena fosforylací Nbs1, Brca1, FancD2, SMC1, Chk1 a Chk2 a k bloku v G2 fázi dochází fosforylací Brca1, hRad17 a Chk1 (*Bakkenist a Kastan, 2003*).

Buněčný cyklus je kontrolován řadou cyklinů a cyklin-dependentních kinas (Cdk). Jednotliví členové Cdk pak v komplexu se specifickými cykliny řídí průchod buněčného cyklu přes klíčové kontrolní body G1/S a G2/M, které jsou aktivovány po poškození DNA (*Řezáčová, 2004*). Dosud je známo devět cyklin-dependentních kinas (1-9) a jedenáct typů cyklinů (A-J a T). Na přechodu z G1 do S fáze se podílí cykliny D tvořící funkční komplexy s Cdk4 a Cdk6, cyklin C integrující s Cdk8 a cyklin E ve spojení s Cdk2. Zvýšená exprese těchto cyklinů má za následek zkrácení G1 fáze buněčného cyklu a rychlejší přechod do S fáze. Průběh S fáze je pak kontrolován cyklinem A vytvářejícím komplex s Cdk2. Komplexy cyklinů A a B s Cdk1 se podílí na fosforylaci celé řady proteinů nezbytných pro G2/M přechod (*Pospíšilová a Vojtěšek, 2000*).

Nejnámějším cílem ATM kinasy je protein p53. Fosforylace zvyšuje stabilitu p53, aktivuje jeho transkripční potenciál a stimuluje navázání na promotory jeho cílových genů (*Lakin a Jackson, 1999*). Protein p53 je klíčovou signální molekulou zástavy buněčného cyklu v G1 fázi a ovlivňuje expresi proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Dalšími cíly ATM kinasy jsou inhibitory p53 MDM2 a MDMX (viz kap. 2.4.4) (*Shiloh, 2006*).

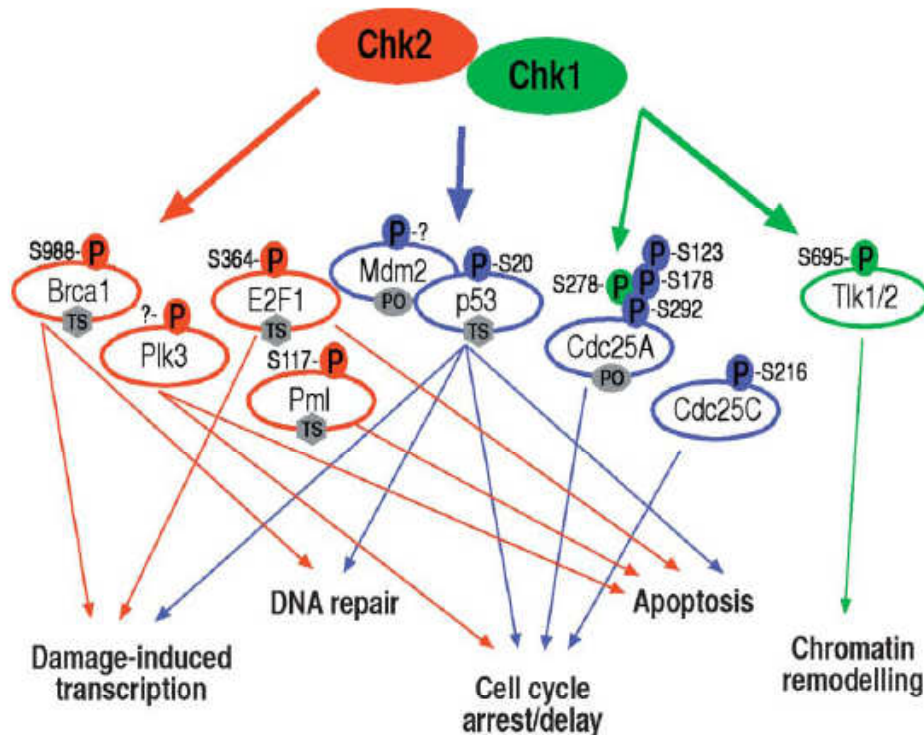
Zásadními proteiny, jejichž fosforylace ATM kinasou vede k inhibici funkce fosfatase Cdc25a a Cdc25c odpovědných za průchod přes G1/S a G2/M klíčové body a za pokračování buněčného cyklu, jsou Chk1 a Chk2-proteinkinasy (*Bakkenist a Kastan, 2003*).

ATR hlavně přenáší signál vycházející z poškození UV zářením a zablokování replikační vidličky a mohla by být přímo zapojena v regulaci replikace (*Shiloh, 2006*).

## 2.3 Check-point kinasy Chk1 a Chk2

Chk1 a Chk2 jsou strukturně zcela nepříbuzné serin/threonin kinasy, jejichž funkce se překrývají. Aktivovány ATM a ATR kinasou mají řadu společných substrátů. Chk1 a Chk2 regulují důležité buněčné funkce jako replikaci DNA a průběh buněčného cyklu, restrukturalizaci chromatinu a apoptózu (Obr. 3).

Funkce labilního protein Chk1 je převážně omezená na S a G2 fázi. ATM a ATR fosforylují Chk1 na Ser317 a Ser 345 C-konce. Její aktivace po poškození DNA nebo zastavení replikace nevyžaduje dimerizaci ani autofosforylaci. Chk2 je stabilní protein exprimovaný v průběhu celého cyklu. ATM fosforyluje N-koncovou regulační doménu Chk2, zejména Thr68, v důsledku odpovědi na DBS. Tato aktivace zahrnuje dimerizaci a autofosforylaci Chk2 (Bartek a Lukas, 2003; Řezáčová, 2004).



**Obr. 3.** Aktivované Chk1 a Chk2 fosforylují celou řadu substrátů, z nichž některé jsou společné oběma kinasám (modrá). Důsledkem těchto aktivací může být v závislosti na charakteru stresu, rychlosti poškození DNA a typu buňky stresem indukovaná transkripce (E2F1, Brca1, p53), opravení DNA (BRCA1, p53), zadržení (degradace Cdc25A) nebo trvalé zastavení (Cdc25C, p53, Plk3) buněčného cyklu, apoptóza (Pml1, p53, E2F1) a remodelace chromatinu (Tlk1/2). Některé cíle těchto kinas jsou protoonkogeny (PO) nebo tumorové supresory (TS) (Bartek a Lukas, 2003).

## 2.4 Protein p53

### 2.4.1 Charakteristika a struktura proteinu p53

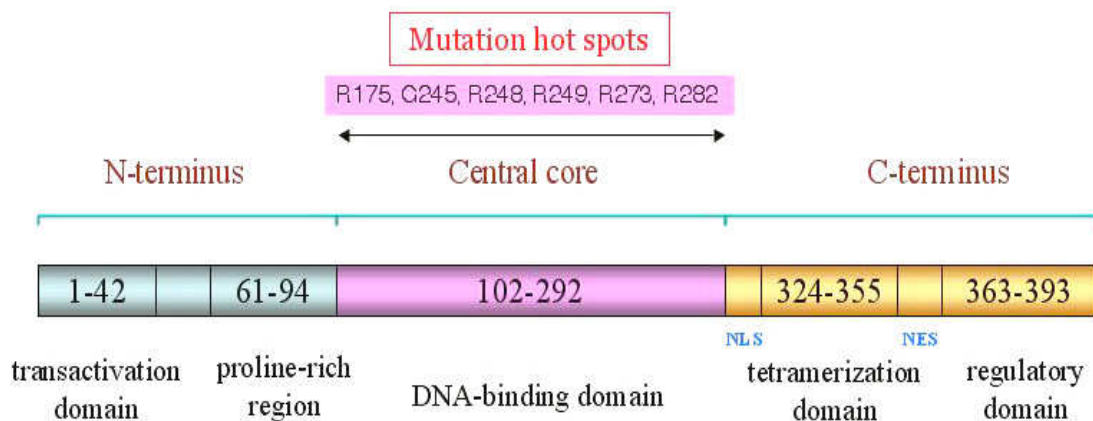
Lidský p53 je tumor-supresorový jaderný fosfoprotein o velikosti 53 kDa. Protein p53 byl poprvé identifikován v roce 1979 (*Bai a Zhu, 2006*). Je kódován genem TP53 lokalizovaném na krátkém raménku chromosomu 17 (17p3.1) (*Isobe et al., 1986*). Tento gen je tvořen 11 exony a 10 introny a jeho velikost je přibližně 20 kpb (*Lamb a Crawford, 1986*). Gen TP53 je jeden z nejčastěji mutacemi inaktivovaných genů mající vztah k různým typům nádorových onemocnění. Díky svému klíčovému významu pro normální chod buňky bývá též nazýván „strážce genomu“ (*Lane, 1992*).

Protein p53 patří k unikátní proteinové rodině, která zahrnuje tři členy: p53, p63 a p73. I když jsou tyto proteiny svojí strukturou a funkcí podobné sobě navzájem, zdá se, že p53 u vyšších organismů brání rozvoji nádorů, zatímco p63 a p73 se uplatňují v normálním vývoji (*Bai a Zhu, 2006*).

Nejintenzivněji studovanou funkcí proteinu p53 je jeho schopnost působit jako sekvenčně specifický transkripční aktivátor genů, jenž obsahují p53-vnímové sekvence a zprostředkovávají účinky proteinu p53 (*Prives a Hall, 1999*). Tumor-supresorový protein p53 je tak zapojen v rozličných buněčných procesech zahrnujících buněčný cyklus, apoptózu, stárnutí, opravu DNA, buněčnou diferenciaci a angiogenezi (*Sionov a Haupt, 1999*).

Protein p53 je v normální buňce udržován na velmi nízké hladině v latentní neaktivní formě a je aktivován působením různých forem stresu. Tímto stresem může být poškození DNA (UV nebo ionizující záření, syntetická chemoterapeutika), hypoxie, nedostatek nukleotidů a živin, aktivace onkogenů a oxidativní poškození (*Prives a Hall, 1999*). Po poškození DNA vyvolává protein p53 transaktivací proteinu p21 pozastavení buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi, čímž je umožněna oprava poškozené DNA. V případě rozsáhlého poškození indukuje apoptózu (*Steele et al., 1998*).

Lidský protein p53 se skládá z 393 aminokyselin a je uspořádaný do tří funkčních domén. Na N-konci proteinu je aktivační doména zahrnující transkripčně-aktivační subdoménu a PXXP oblast bohatou na prolin, v centrální části je DNA-vazebná doména a na C-konci se nachází oligomerizační doména (Obr. 4, *Bai a Zhu, 2006*).



**Obr. 4.** Schéma struktury proteinu p53 (*Bai a Zhu, 2006*).

Aminokyseliny 1-42 N-koncové oblasti p53 tvoří transkripčně-aktivační doménu, na kterou se váže řada transkripčních faktorů jako TBP (TATA box-binding protein), TAFs (TBP-associated factors), p62 a další. Obsahuje také vazebné místo pro MDM2, jenž negativně reguluje funkci p53 (*Bai a Zhu, 2006*). Ser15, Thr18 a Ser20 z této domény jsou častým cílem fosforylace a hrají tak důležitou roli při stabilizaci p53 (*Hupp et al., 2000*).

Doména bohatá na prolin je tvořena přibližně aminokyselinami 61-94. Vyznačuje se mnohočetným opakováním motivů o sekvenci PXXP (P-prolin, X-libovolná aminokyselina) a je nezbytná pro spuštění programované buněčné smrti, ale nikoliv pro zastavení buněčného cyklu. Tato doména je možným místem pro mutace u lidských nádorů (*Bai a Zhu, 2006; Sakamuro et al., 1997*).

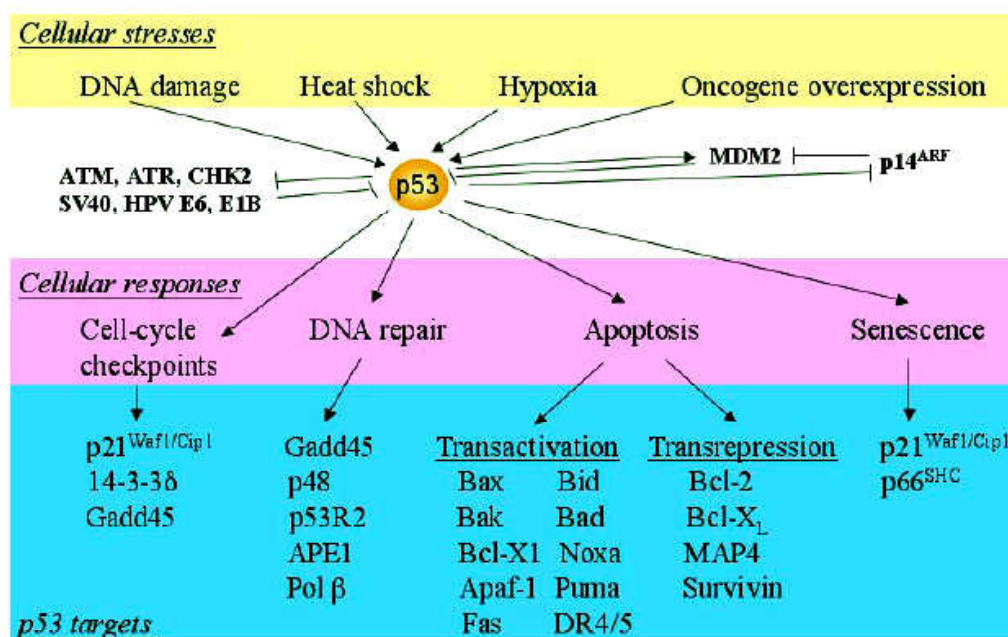
Centrální oblast proteinu p53 z aminokyselin 102-292 obsahuje sekvenčně specifickou DNA-vazebnou doménu (*Bai a Zhu, 2006*). Tato doména umožňuje interakci proteinu p53 se sekvencemi v promotorech p53 cílových genů (*Cho et al., 1994*). V promotorech cílových genů se váže na dvě po sobě následující sekvence 5'-PuPuPuCWWGPyPyPy-3' (Pu-purinová báze, Py-pyrimidinová báze, W-adenin nebo tymin), které mohou být odděleny až 13bp. Uvnitř této domény se nachází několik tzv. „hot spot“ mutačních míst (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 a Arg282) (*Bai a Zhu, 2006*). Frekvence a distribuce těchto mutací je různá u různých typů nádorů (*Kotala et al., 2002*).

C-koncová oblast (aminokyseliny 301-393) obsahuje oligomerizační doménu (aminokyseliny 324-355), negativní regulační doménu (aminokyseliny 363-393) zapojenou v navození buněčné smrti, sekvenci řídící export proteinu do jádra (NES-nuclear export signal) a sekvenci pro lokalizaci p53 do jádra (NLS-nuclear localization signal) (*Bai a Zhu,*

2006). Oligomerizační doména umožňuje tvorbu tetrametrů p53 a dalších oligomerů, nezbytných pro správnou funkci p53. C-koncová oblast p53 obsahuje druhou DNA vazebnou doménu zodpovědnou za rozpoznání a vytváření stabilního komplexu s nesespecifickými sekvencemi poškozené DNA (Selivanova et al., 1996). Jestliže je přerušena interakce mezi C-koncovou oblastí a DNA-vazebnou doménou posttranslační modifikací (fosforylace a acetylace) C-koncové domény, DNA-vazebná doména se stane aktivní a je tak navozeno zvýšení transkripční aktivity (Bai a Zhu, 2006).

## 2.4.2 Funkce proteinu p53

Jak již bylo řečeno, za normálního stavu je hladina proteinu p53 v buňkách nízká a většinou nedetekovatelná. Po poškození DNA se však protein stabilizuje a rychleji se přesunuje do jádra, kde indukuje transkripci genů zastavujících buněčný cyklus nebo spouští geny regulující apoptózu. Zvolení jedné z těchto možností závisí na buněčném typu a na charakteru a intenzitě stresového signálu (Obr. 5; Komarova a Gudkov, 2000).



**Obr. 5.** Protein p53 působí v buňce jako transkripční faktor, který aktivuje transkripci genů podílejících se na řízení řady buněčných procesů, mezi něž patří zastavení buněčného cyklu, oprava DNA, apoptóza a stárnutí (Bai a Zhu, 2006).

### 2.4.2.1 Funkce proteinu p53 v regulaci buněčného cyklu

Snad nejznámějším cílem nádorového supresoru p53 je inhibitor cyklin-dependentních kinas (CkIs) protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (wild-type activated fragment 1, cyklin-dependent kinase inhibitor protein 1). Exprese p21<sup>WAF1/CIP1</sup> je však vedle zvýšené hladiny proteinu p53 indukována ještě buněčnou diferenciací a senescencí. Tento protein byl objeven nezávisle několika laboratořemi v roce 1993 (*Pospíšilová a Vojtěšek, 2000*). Po poškození DNA je p21<sup>WAF1/CIP1</sup> primárním zprostředkovatelem na proteinu p53 závislého zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (*Bai a Zhu, 2006*).

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> je 164 aminokyselin dlouhý polypeptid o hmotnosti 20 kDa kódovaný genem Waf1/CIP1, který je tvořen třemi exony umístěnými na chromozomu 6p21.1. Protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup> váže komplexy cyklinu s cyklin-dependentní kinasou a proliferační jaderný antigen PCNA. Interakce s proteinem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> brání PCNA vytvářet aktivní komplex s DNA-polymerasou, jehož přítomnost je nezbytná pro správný průběh replikace, nenarušuje však reparační funkce PCNA. Tímto mechanismem se p21<sup>WAF1/CIP1</sup> podílí na inhibici syntézy DNA a vyvolává zastavení buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě cyklu (*Pospíšilová a Vojtěšek, 2000*).

Interakce proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> s komplexem cyklin E/Cdk2 inhibuje fosforylaci retinoblastoma (RB) proteinu a uvolnění proteinů rodiny E2F transkripčních faktorů, jež spouští transkripci genů nezbytných pro vstup buňky do S fáze, což se projeví zastavením buněčného cyklu v G1 fázi.

Protein p53 zvyšuje expresi reparačního faktoru Gadd45 (growth arrest and DNA damage 45) a jaderného proteinu 14-3-3- $\sigma$ , které se účastní na zastavení cyklu v G2 fázi. Gadd45 se váže na Cdk1, brání vytvoření komplexu s cyklinem B a inhibuje tak kinasovou aktivitu. Jaderný protein 14-3-3- $\sigma$  se váže na komplex cyklin B/Cdk1, jehož přechod do jádra je nezbytný pro přechod z G2 do M fáze (*Bai a Zhu, 2006*).

### 2.4.2.2 Funkce proteinu p53 v navození apoptózy

V případě nezvratného poškození tkání indukuje protein p53 apoptózu, a tím jsou eliminovány poškozené buňky. Je známa celá řada regulátorů apoptózy, jejichž exprese je transkripčně aktivována proteinem p53. Liší se svou funkcí a způsobem jak aktivují apoptózu.

Většina z nich se podílí na indukci apoptózy vnitřní cestou. Jsou to zejména Bax (Bcl-2-associated X protein), Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), Noxa, p53AIP1

(p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) a PIG3 (p53-inducible gene 3). Tyto proteiny kontrolují permeabilitu mitochondriální membrány a mohou tak modulovat uvolňování mitochondriálních faktorů, které podporují uskutečnění apoptózy (viz kap. 2.1.2.4) (*Bai a Zhu, 2006*).

Aktivací receptorů smrti Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), DR4/KILLER (death receptor 4), DR5/KILLER (death receptor 5) je indukována apoptóza vnější cestou, míra exprese těchto proteinů je rovněž regulována transkripčně. DR4 a DR5 mohou spouštět apoptózu navázáním TRAIL, Fas ligandu a chemoterapeutik. V mnoha tkáních je Fas nezbytný pro indukci p53 závislé apoptózy. Protein p53 může indukovat apoptózu zvýšením exprese proteinu Scotin, který je lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu a v jaderné membráně (*Bai a Zhu, 2006*).

### **2.4.3 Stabilizace a aktivace proteinu p53**

Poškození DNA vyvolává mnoho posttranslačních modifikací proteinu p53, zahrnujících fosforylaci, defosforylaci, acetylaci, metylaci a ubikvitinaci, které vedou k jeho aktivaci (*Lavin a Gueven, 2006*). Důležitým předpokladem vazby proteinu p53 na cílové sekvence je mimo jiné i jeho oligomerizace a dosažení správné konformace. Teprve vytvořené tetramery jsou aktivní (*Uldrijan at al., 2002*). Aktivace a stabilizace proteinu p53 v jádře je ovlivněna mnoha faktory a je silně regulována. Nejvýznamnější modifikace jsou soustředěny na N-koncové doméně molekuly, která je odpovědná za transkripční aktivitu proteinu p53 a je nutná pro navázání Mdm2, a dále pak na C-koncové regulační doméně (*Lavin a Gueven, 2006*).

Pro aktivaci proteinu p53 jsou velmi významné posttranslační fosforylace a acetylace, neboť mají za následek stabilizaci a akumulaci proteinu p53 v jádře (*Bai a Zhu, 2006*). Je známa celá řada protein-kinas fosforylujících protein p53. Patří mezi ně zejména ATM, ATR, Chk1 a Chk2, Jun NH<sub>2</sub>-koncová kinasa (JNK), p38 a další (*Lavin a Gueven, 2006*). Poškození DNA ionizujícím nebo UV zářením iniciuje fosforylaci Ser6, Ser9, Ser15, Thr18, Ser20, Ser33, Ser37, Ser46, Thr55, Thr81, Ser149, Ser150, Ser155, Ser315, Ser366, Ser371, Ser376, Ser378, Thr387 a Ser392, (*Bai a Zhu, 2006*).

Mezi nejlépe prozkoumaná fosforylační místa na N-konci proteinu p53 patří Ser15 fosforylovaný kinasami ATM a ATR v důsledku dvojitého zlomu DNA způsobených ionizujícím zářením nebo chemickými látkami (*Lavin a Gueven, 2006*). Postranslační modifikace fosforylací na Ser15, stejně tak na Ser20, Ser37, Thr18, inhibuje interakci mezi



p53 a jeho negativním regulátorem, onkoproteinem MDM2 (*Shieh et al., 1997; Yap et al., 2004*). Tato inhibice degradace působené MDM2 proteinem stabilizuje protein p53 v jádře (viz kap. 2.4.4).

Fosforylace Ser315 a Ser392 na C-konci proteinu p53 podporuje jeho vazbu ke specifickým úsekům DNA a stabilizuje tak působení p53 jako transkripčního faktoru. Modifikace Ser392 je spojována především s aktivací komplexu obsahujícího kasein-kinasu II (*Yap et al., 2004*).

Ionizující záření vede dále zejména k fosforylaci Ser6, Ser9, Ser15, Ser20, Ser46 a Thr18, která je rovněž převážně zprostředkována ATM kinasou (*Lavin a Gueven, 2006*).

Jedna protein-kinasa může fosforylovat protein p53 na několika místech a jedno místo může být fosforylováno více než jednou kinasou. Například fosforylace Ser15 je zprostředkována ATM/ATR kinasou buď přímo nebo prostřednictvím Chk1/Chk2. Chk1 a Chk2 kinasy v odpovědi na ionizující záření fosforylují Ser20. Fosforylace Ser20 je důležitá pro narušení interakce p53-Mdm2 (*Bai a Zhu, 2006*).

K fosforylaci Thr81 dochází pouze v důsledku genotoxického působení UV záření a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na druhé straně fosforylaci Thr18 spouští jak zlomy DNA tak nongenotoxické stimuly. JNK je zodpovědná za fosforylaci Thr81 (*Lavin a Gueven, 2006*). Kinasa p38 pak za fosforylaci Ser33 a Ser46. Ser376 a Thr55 podléhají defosforylaci v buňkách, které byly vystaveny působení ionizujícího záření (*Bai a Zhu, 2006*). Významná je také fosforylace Ser315 kinasami Cdk1 a Cdk2 a acetylace Lys320 a Lys382 acetyltransferasou p300 (*Uldrijan et al., 2002*).

#### **2.4.4 Degradace proteinu p53**

V normálních buňkách je nově syntetizovaný protein p53 rychle degradován proteasomem 26S. Pro degradaci proteasomem je nezbytná jeho ubikvitinace, tj. kovalentní připojení ubikvitinu k lyzinům proteinu p53. K tomu je zapotřebí tří různých enzymů označovaných jako E1 (enzym aktivující ubikvitin), E2 (enzym přenášející ubikvitin) a E3 (ubikvitin ligasa). Ubikvitin ligasovou aktivitu, důležitou pro degradaci proteinu p53, vykazuje protein MDM2 (mouse double minute 2), jehož exprese je transkripčně indukována proteinem p53. Protože se MDM2 podílí na degradaci p53, vzniká tak negativní zpětnovazebná regulační smyčka, která omezí působení proteinu p53 v buňce pouze na dobu nutnou pro iniciaci transkripce (*Uldrijan et al., 2002*).

Protein MDM2 se skládá z 491 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 56 kDa. Je kódován genem *mdm2*, který je lokalizován na lidském chromozomu 12q13–14 (Momand et al., 1998). MDM2 se sestává z několika funkčních domén: 1) N-terminální doména, která obsahuje vazebné místo pro p53, p73 a E2F; 2) kyselá doména; 3) Zn-finger doména a vazebné místo pro protein Rb; 4) C-terminální RING doména a E3 ligasovou doménu, která je odpovědná za ubikvitinaci proteinu p53. Navíc MDM2 obsahuje signální sekvence pro import a export z jádra do cytoplazmy, které jsou nutné pro spuštění procesu degradace (NES) (Klein a Vassilev, 2004; Uldrijan et al., 2002).

Zvýšená hladina proteinu p53 v jádře aktivuje transkripce genu *mdm2*. MDM2 se váže na p53, blokuje tak jeho N-koncovou transkripčně-aktivační doménu a cílí p53 k degradaci prostřednictvím proteasomu (Klein a Vassilev, 2004).

Dalšími ubikvitin ligasami jsou Pirh2 a Cop-1 (Lavin a Gueven, 2006). Významnou ubikvitin ligasou způsobující účinnou degradaci proteinu p53 je komplex buněčného proteinu E6-AP (E6-associated protein) s onkoproteinem E6 některých lidských papilomavirů (Uldrijan et al., 2002).

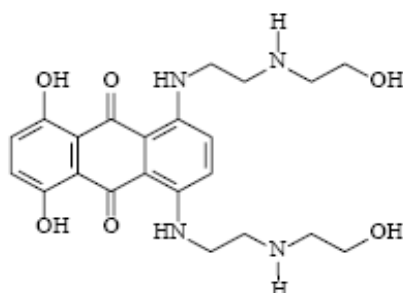
Strukturním homologem MDM2 je MDMX (MDM4) protein. Stejně jako MDM2 se váže na protein p53 a blokuje tak jeho transkripční aktivitu. Na rozdíl od MDM2 však není jeho exprese regulována proteinem p53 (Böttger et al., 1999).

#### **2.4.5 Cytostatikum mitoxantron jako induktor poškození DNA a apoptózy**

Mitoxantron, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-amino]-9,10-antracendion dihydrochlorid (NSC 301739), C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, MX, je cytostatikum ze skupiny derivátů aminoantrachinonu inhibující syntézu DNA.

MX se vyznačuje převážně interkalačním mechanismem účinku a v koncentracích dosažených podáváním terapeutických dávek hraje rovněž zásadní roli inhibice topoisomerasy II. Interkalací se rozumí nekovalentní vazba (vmezeření) cytostatika do dvojspirály DNA a výsledkem je inhibice replikace a následně transkripce. Topoisomerasa II je jaderný enzym zajišťující správnou topologii DNA a je tedy nutný pro správný průběh replikace a separaci chromozomů během mitózy. MX stabilizuje komplex topoisomerasy II a DNA, produkuje volné radikály a zvyšuje tak výskyt dvojitých zlomů DNA (double strand breaks, DSB). MX také způsobuje agregaci a zkompaktnění DNA prostřednictvím elektrostatického zesílení. Mimo to se na cytotoxickém účinku může podílet i jeho pevná vazba na cytoskeletální protein cytokeratin 8.

Z hlediska buněčného cyklu se MX řadí mezi fázově nespecifická cytostatika, s určitou převahou inhibice v pozdní S fázi a ve fázi G2.



**Obr. 6.** Mitoxantron.

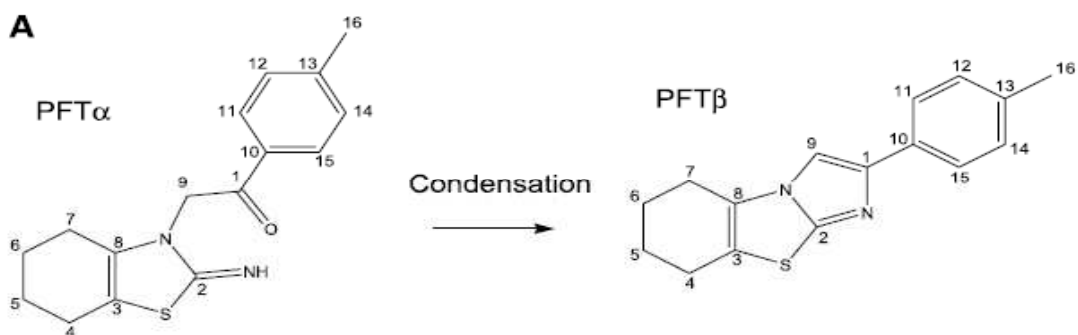
MX je distribuován do tkání, váže se na povrch endotelií a prostupuje do krevních buněk a nádorových tkání.

MX tvoří součást chemoterapeutických kombinací používaných v léčbě diseminovaného karcinomu prsu a v léčbě maligních lymfomů Hodgkinova i non-Hodgkinova typu, v léčbě hepatocelulárního karcinomu. Dále lze mitoxantron používat k indukci remise u akutní myeloblastické leukémie a rovněž k indukci remise u blastického zvratu chronické myeloidní leukémie. MX je dále jako modulátor imunitního systému indikován u mobilních pacientů trpících chronickou progresivní sclerosis multiplex.

Hlavním nežádoucím účinkem je útlum kostní dřeně (nejčastěji leukopenie, méně často trombocytopenie či anémie), nevolnost a zvracení, anorexie, průjem, gastrointestinální krvácení, stomatitis, mukositis, dyspnoe, slabost, únavnost a horečka. Kardiomyopatie se objevují až po opakovaném podání jako kumulativní chronická toxicita po překročení celkové dávky  $160 \text{ mg/m}^2$  (Klener, 1996; Faulds et al., 1991).

#### 2.4.6 Pifithrin- $\alpha$

Pifithrin- $\alpha$ , PFT- $\alpha$ , p-fifty three inhibitor ([2-(2-imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyethanon] hydrobromid) je malá chemická sloučenina, která inhibuje transkripční aktivitu proteinu p53 a umožňuje tak identifikaci genů, jenž jsou jeho cílem (např. cyklin G, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a mdm2). Tento chemický inhibitor funkce proteinu p53 byl úspěšně použit *in vitro* a *in vivo* k ochraně normálních buněk před jinak letální dávkou chemo- a radioterapie (Rocha et al., 2003). PFT- $\alpha$  je *in vitro* nestabilní a je rychle převeden na jeho produkt PFT- $\beta$  (Walton et al., 2005).



**Obř. 7.** Struktura PFT- $\alpha$  a jeho produktu PFT- $\beta$  (Walton *et al.*, 2005).

PFT- $\alpha$  byl původně považován za specifický inhibitor tumor supresorového proteinu p53. Avšak bylo zjiřtěno, že potlačuje i signalizaci přes heat shock transkripční faktor HSF1 a glukokortikoidový receptor (GR), ale ne signalizaci NF- $\kappa$ B. PFT- $\alpha$  tak neovlivňuje specificky pouze p53 (Komarova *et al.*, 2003).

Byl popsán ochranný efekt PFT- $\alpha$  v srdečních buňkách myří před apoptózou indukovanou doxorubicinem, v neuronech před apoptózou indukovanou camtothecinem, ischemií a dopaminem a jaterní tkáni před apoptózou indukovanou endotoxinem (Murphy *et al.*, 2004).

#### 2.4.7 Hematopoetická nádorová linie MOLT-4

Velká část chemoterapeutických látek a ionizující záření indukuje u hematopoetických nádorových buněk programovanou buněčnou smrt. Analýzou molekulárních mechanismů, které regulují apoptózu, se ukázalo, že protinádorové látky simultánně aktivují řadu cest majících pozitivní i negativní vliv na smrtící proces. V této práci byly pro analýzu regulací signální cesty proteinu p53 v protinádorové léčbě použity jako modelová linie buňky MOLT-4.

V roce 1972 Minowada *et al.* izolovali buněčnou linii MOLT-4. Buňky MOLT-4 jsou odvozeny od lidské T lymfocytární leukémie a svým chováním připomínají T-lymfocyty. Na svém povrchu exprimují znaky CD1 (49%), CD2 (35%), CD3 A (26%), CD3 B (33%), CD3 C (34%), CD4 (55%), CD5 (72%), CD6 (22%) a CD7 (77%). Buněčná linie je velmi citlivá k účinkům ionizujícího záření a přes nádorový charakter mají tyto buňky wild typ proteinu p53 (Řezáčová, 2007).

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál a metodika

#### 3.1.1 Kultivace a pasážování buněčné linie MOLT-4

Buňky lidské T-lymfocytární leukémie MOLT-4 jsme získali z Americké sbírky buněčných kultur (ATCC, University Blvd., Manassas, USA). Buňky jsme po rozmražení přenesli pipetou do kultivační lahve s 10 ml Iscovy modifikace Dulbecova média (IMDM, Dulbecco, Sigma, Saint Luis, MS, USA) a inkubovali v řízené atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> a teplotou 37 °C.

**Tab. 1.** Příprava 50 ml kompletního kultivačního media IMDM.

20% fetální telecí sérum [ml]	10
glutamin (20 mM) [ml]	0,5
penicilin + streptomycin (Sigma) [ml]	0,5
médium IMDM (Sigma) [ml]	38,5

Každý druhý den jsme buňky počítali pomocí trypanové modři a ředili kultivačním médiem na výslednou koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk/ml. Používali jsme buňky z maximálně dvacáté pasáže.

#### 3.1.2 Ředění mitoxantronu a inhibitoru pifithrinu- $\alpha$

Z mitoxantronu (MX, MW 517,4 g/mol, rozpustnost ve vodě 5 mg/ml) jsme připravili rozpuštěním 1,3 mg ve 2,5 ml sterilní vody zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l. Zásobní roztok jsme dále ředili sterilní vodou na výslednou koncentraci 1  $\mu$ mol/l. Nespotřebované roztoky MX byly zamrazeny při -20 °C.

Rozpuštěním 5 mg pifithrinu- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ , MW 367,3) v 1,361 ml DMSO jsme připravili zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l. Na jednotlivé skupiny jsme pak pipetovali zásobní roztok v množství odpovídající výsledné koncentraci 20  $\mu$ mol/l v rakvičce (NUNC, 25 cm<sup>2</sup>). Zásobní roztok byl skladován při -20 °C.

### 3.1.3 Viabilita buněk MOLT-4

Buňky jsme vystavovali účinkům různých koncentrací MX (Sigma, Saint Luis, MS, USA) a to jak samostatně, tak v kombinaci s inhibítozem proteinu p53 PFT- $\alpha$  (Calbiochem). Ve stanovených časových intervalech jsme určili viabilitu pomocí trypanové modři. Do zkuševky jsme napipetovali 50  $\mu$ l trypanové modři a 50  $\mu$ l důkladně promíchané buněčné suspenze. Po promíchaní jsme naplnili Bürkerovu komůrku. Trypanová modř neprochází neporušenou buněčnou membránou a živé buňky tak zůstávají bezbarvé. Mrtvé buňky, u nichž je porušena integrita buněčné membrány, se zbarví modře. Počítali jsme buňky v 50 čtvercích. Výsledek byl uváděn jako počet buněk  $\times 10^4$ /ml. Provedli jsem tři nezávislé experimenty, stanovili průměr a tuto hodnotu použili ve výsledném grafu, který představuje závislost počtu buněk na intervalu od nasazení pokusu.

### 3.1.4 Flow-cytometrické metody

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla. Podle směru a úhlu lomu je rozdělen na přímý rozptyl – forward scatter (FSC), který je charakterizován lomem světla o malém úhlu a je úměrný velikosti buňky, a na boční rozptyl - side scatter (SSC), jehož úhel je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury resp. granularity. Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk. Fluorescenční barviva (fluorochromy) absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují část takto absorbovaného světla o odlišné vlnové délce. Je možné přímo barvit specificky určité orgány nebo biomolekuly. Nepřímo lze obarvit i zvolené proteiny v buňce. Analýza byla provedena na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter, Fullerton, USA).

Pro stanovení změn v buněčném cyklu u buněk MOLT-4 v reakci na MX (samostatně nebo v kombinaci s PFT- $\alpha$ ) jsme provedli analýzu obsahu DNA. Aktivací endonukleas v časné fázi apoptózy dochází ke štěpení DNA na krátké fragmenty, které prostupují z buňky ven a vytváří tzv. sub-G1 vrchol. Pro značení jaderné DNA jsme použili propidium jodid (PI), fluorescenční barvivo, jež se specificky a stechiometricky váže na DNA a jehož fluorescence se právě po navázání zvyšuje. Měření obsahu DNA v jednotlivých buňkách poskytuje statistický pohled na buněčný cyklus. Suspenze

kontrolních a ovlivněných buněk v množství  $5 \cdot 10^5$  buněk jsme promyli ledovým fosfátovým pufr (PBS) a alespoň 30 minut permeabilizovali v 70% ethanolu. Po permeabilizaci jsme ethanol odstranili a buňky dvakrát promyli ve 3 ml PBS, na závěr jsme k sedimentu přidali 0,5 ml PBS + 0,5 ml citrát-fosfátového pufru a inkubovali 5 minut při pokojové teplotě. Buňky jsme znovu promyli PBS a k získanému sedimentu jsme napipetovali 0,5 ml Vindelova roztoku a inkubovali 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Obsah jaderné DNA jsme analyzovali pomocí flow-cytometru Cell Lab Quanta SC. V každém vzorku bylo měřeno minimálně 10 000 buněk. Relativní četnost buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze byla stanovena pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA).

**Tab. 2.** Použité roztoky pro stanovení změn v buněčném cyklu.

Citrát-fosfátový pufr pH 7,8	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	192 ml (14,32 g na 200 ml vody)	Po smíchání uložen v lednici, před použitím rozpuštěny vysrážené krystaly.
	0,1 M kys.citronová	8 ml (0,21 g na 10 ml vody)	
Vindelův roztok	1 M TRIS	1 ml (1,2114 g/10 ml)	Doplňeno do 100 ml vodou, uchováváno v lednici ve tmě.
	RNasa	1 mg/1 ml PBS	
	NaCl	60 mg	
	PI	5 mg/5 ml PBS	

K detekci apoptózy byl použit značený Annexin V, který se váže na povrchu buněk na fosfatidylserin. Expozice fosfatidylserinu na vnější stranu membrány je jedním ze znaků časně fáze apoptózy. Současně jsme použili propidium jodid k označení buněk s porušenou membránou. Dvojí značení nám tak umožňuje rozlišení časně a pozdní fáze apoptózy.

Na každou skupinu jsme nasadili  $10^6$  buněk ve 4 ml kompletního média. Buňky jsme po ovlivnění promyli, resuspendovali ve 2 ml roztoku PBS a přidali k nim 90 µl ledového vápenatého pufru (Annexin V-FITC Kit - Apoptest (Dako), 1 díl pufru + 9 dílů destilované vody, připraven vždy čerstvý), 2,5 µl propidium jodidu (Annexin V-FITC Kit, Apoptest, 250 µg rozpuštěno v 1 ml deionizované vody) a inkubovali 10 minut na ledu ve tmě. Po skončení inkubace jsme ke směsi připipetovali 500 µl vápenatého pufru a ihned jsme provedli analýzu na flow-cytometru Cell Lab Quanta SC.



### 3.1.5 Elektroforéza a Western-blott

Elektroforéza patří mezi dělicí metody využívající různé pohyblivosti iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. V tomto pokusu byly buněčné lyzáty podrobeny SDS-PAGE elektroforéze. Během ní jsou jednotlivé proteiny odděleny na polyakrylamidovém gelu pouze v závislosti na molekulové hmotnosti, protože přidaný dodecylsulfát sodný (SDS) dodává proteinům jednotný záporný náboj.

Western-blott je přenos rozdělené směsi proteinů z gelu na membránu a usnadňuje identifikaci konkrétního proteinu ve směsi proteinů. Na membráně se provádí nepřímé značení pomocí protilátek a proteiny jsou detekovány pomocí chemiluminiscence.

Pomocí elektroforézy a Western-blottingu jsme sledovali změny v expresi proteinů:

- p53 a jeho fosforylaci na serinech 15 a 392
- p21<sup>WAF1/CIP1</sup>
- ERK 1/2
- štěpení laminu B.

Jako kontrolu nanášky jsme stanovovali  $\beta$ -aktin.

#### 3.1.5.1 Lýza buněk

Na jednotlivé skupiny jsme nasadili  $10^7$  buněk do 20 ml kompletního média. V požadovaný časový interval jsme buňky promyli 5 ml PBS s 1 mmol/l orthovanadičnanem sodným. K téměř suchému sedimentu jsme připipetovali 0,5 ml ledového lyzovacího pufru a obsah zkumavek důkladně protřepali na vortexu. Během inkubace, která probíhala na ledu 30 minut, jsme zkumavkami intenzivně každých 5 minut třepali na vortexu a na závěr jsme resuspendovali obsah injekční stříkačkou. Zlyzované buňky jsme zcentrifugovali (14000 ot./30 min) a supernatant zamrazili na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. 3.** Příprava lyzovacího pufru.

137 mM NaCl [mg]	800,6
10% glycerol [g]	10
1% octyl- $\beta$ -D-glukopyranosid [ml]	2
50 mM fluorid sodný [mg]	210
Tris 20 mM pH 8,0 [mg/100ml]	242,28

Před použitím byla k lyzovacímu pufru přidána 1 tableta COMPLETE MINI (Roche) a 10  $\mu\text{l}$  orthovanadičnanu sodného (184 mg/ml).

### 3.1.5.2 Stanovení celkové bílkoviny

Pro ekvivalentní nanášku proteinů na gel (20  $\mu\text{g}$ ) jsme v jednotlivých skupinách stanovili celkové množství bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny (WS, BCA-assay, Sigma, pracovní roztok  $\text{CuSO}_4$  : roztok BCA = 1:50). Tato metoda je založena na alkalické redukci měďnatého iontu na měďný proteinem a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení. Absorbance, jež odpovídá množství celkové bílkoviny ve vzorku, byla změřena na TECAN INFINITE M200 při vlnové délce 562 nm.

Koncentrační řada standardů (každý standard v duplikátu) (Protein Standard, Biorad) a vzorky (každý vzorek v tripletu) byly pipetovány přímo do mikrotitrační destičky (TPP) v pořadí voda, vzorek (standard), pracovní roztok (WS).

**Tab. 4.** Pipetování standardů.

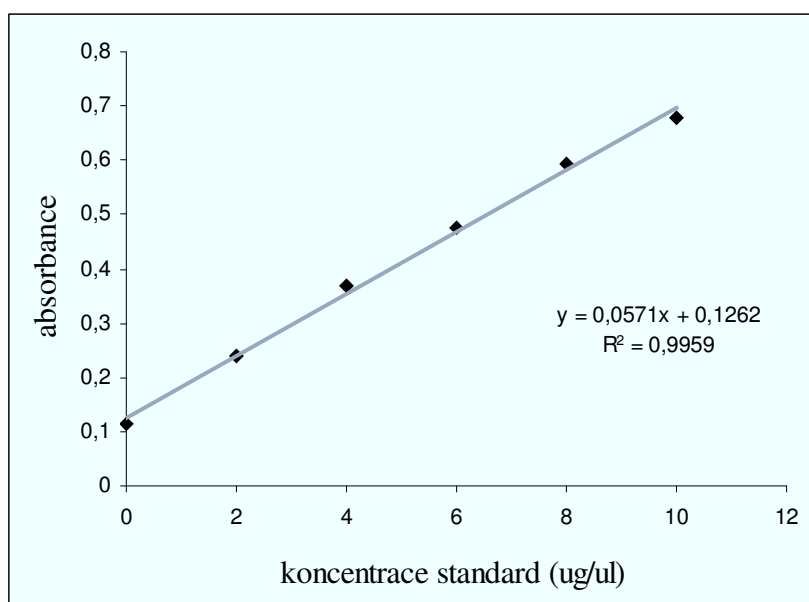
	protein standard [ $\mu\text{l}$ ]	destilovaná voda [ $\mu\text{l}$ ]	WS [ $\mu\text{l}$ ]
S1	0	10	200
S2	2	8	200
S3	4	6	200
S4	6	4	200
S5	8	2	200
S6	10	0	200

**Tab. 5.** Pipetování vzorků.

pipetováno	1 $\mu\text{l}$ vzorku
	9 $\mu\text{l}$ destilované vody
	200 $\mu\text{l}$ WS

Ze získaných hodnot absorbance a známé koncentrace bílkoviny v jednotlivých standardech jsme sestrojili kalibrační křivku. Průměrnou hodnotu absorbance každého vzorku jsme dosadili do rovnice přímky. Získali jsme množství bílkoviny v jednotlivých skupinách a vypočítali nanášky vzorku do jamek 12% polyakrylamidového gelu (viz kap. 3.1.5.3B).

Stanovení celkové bílkoviny jsme provedli ve vzorcích získaných 4 a 24 hodin po přidání MX a PFT- $\alpha$ .



**Obr. 8.** Kalibrační graf standard pro stanovení celkové bílkoviny.

**Tab. 6.** Naměřené hodnoty celkové bílkoviny ve skupinách.

skupina	absorbance A	c [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
kontrola (4 hod)	0,2434	2,052539
0,5 nmol/l MX (4 hod)	0,2717	2,548161
PFT- $\alpha$ (4 hod)	0,2666	2,458844
PFT- $\alpha$ + 0,5 nmol/l MX (4 hod)	0,2412	2,014011
kontrola (24 hod)	0,3001	3,045534
0,5 nmol/l MX (24 hod)	0,2767	2,635727
PFT- $\alpha$ (24 hod)	0,2776	2,651489
PFT- $\alpha$ + 0,5 nmol/l MX (24 hod)	0,2547	2,250438

### 3.1.5.3 Elektroforéza a Western-blott

#### A) Příprava gelu

Připravili jsme 12% rozdělovací gel, který jsme po zpolymerování převrstvili 4% rozdělovacím gelem a do něj jsme vložili 10-jamkový hřebínek pro vytvoření nanášecích jamek pro jednotlivé vzorky a marker molekulové hmotnosti (Prestained SDS-PAGE Standards, The Precision Plus Protein Kaleidoskope standards, BioRad).

**Tab. 7.** Složení rozdělovacího a zaostřovacího gelu.

	12% rozdělovací gel (na 2 gely)	4% zaostřovací gel (na 2 gely)
dH <sub>2</sub> O [ml]	5	3,05
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) [ml]	3,75	—
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) [ml]	—	1,25
Akrylamid [ml]	6	0,65
SDS [μl]	75	75
APS [μl]	37,5	37,5
TEMED [μl]	5	3,75

**B) Příprava vzorků**

Vzorky pro elektroforézu jsme připravili napipetováním příslušného objemu vzorku (množství proteinu na jamku bylo 20 μg), ke kterému jsme přidali 3krát koncentrovaný SDS vzorkový pufr v poměru 2:1. Vzorky jsme protřepali, 5 minut zahřivali na vodní lázni o teplotě 95 °C a zcentrifugovali na krátký impuls na centrifuze MPW.

**Tab. 8.** Příprava vzorků.

skupina	objem pipetovaného vzorku [μl]	objem pipetovaného vzorkového pufru [μl]	celkový objem pipetovaný na gel [μl]
kontrola (4 hod)	9,74	4,87	14,62
0,5 nmol/l MX (4 hod)	7,85	3,92	11,77
PFT-α (4 hod)	8,13	4,07	12,20
PFT-α + 0,5 nmol/l MX (4 hod)	9,93	4,97	14,90
kontrola (24 hod)	6,57	3,28	9,85
0,5 nmol/l MX (24 hod)	7,59	3,79	11,38
PFT-α (24 hod)	7,54	3,77	11,31
PFT-α + 0,5 nmol/l MX (24 hod)	8,89	4,44	13,33

### C) Elektroforetické dělení proteinů

Zdenaturované vzorky a marker molekulové hmotnosti jsme nanесли do jamek zaostřovacího gelu, zalili Running pufrem a spustili elektroforézu v zařízení Mini Protean 3 od firmy BioRad. Dělení proteinu probíhalo přibližně 50 minut při 200 V a 0,24 A.

**Tab. 9.** Příprava Running pufru.

na přípravu	5 l (doplněno deionizovanou vodou)
TRIS (USB) [g]	30
GLYCIN (INC)[g]	144
SDS (FLUKA) [g]	5

### D) Příprava a aktivace PVDF membrán

Již během elektroforetického dělení jsme PVDF membrány aktivovali třepáním 1 minutu v methanolu a pak promývali 2 x 10 minut v Transfer pufru.

**Tab. 10.** Příprava Transfer pufru.

na přípravu	5 l (doplněno deionizovanou vodou)
TRIS (USB) [g]	15,15
GLYCIN (INC)[g]	72
Methanol (Kulich) [ml]	1000

### E) Přenos rozdělených proteinů na membrány

Po skončení elektroforézy jsme gely 10 minut třepali v Transfer pufru a pak společně s aktivovanými PVDF membránami složili na 120 minut do Trans-Blot aparatury pro přenos proteinů (100 V, 0,35 A, 120 minut za intenzivního chlazení). Poté jsme membrány promyli v TBS-Tween 0,05 % a 60 minut blokovali v 10% mléku (Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk (BIO-RAD), TBS-Tween 0,05%).

**Tab. 11.** Příprava 10x koncentrovaného TBS.

TRIS-base (USB) [g]	48,4
NaCl (FLUCA) [g]	160
1 M HCl	na úpravu pH (asi 76 ml)
deionizovaná voda	doplněno do 2 l

**Tab. 12.** Příprava TBS.

10x koncentrovaný TBS	1 díl
deionizovaná voda	9 dílů

**Tab. 13.** Příprava TBS-Tween 0,05%.

Tween 20 [ml]	1
10x koncentrovaný TBS [ml]	200
deionizovaná voda [ml]	1800

## F) Imunodetekce

Po blokaci v mléku jsme membrány 2x5 minut promyli v TBS. Mezitím jsme naředili primární protilátky na požadovanou koncentraci v 5% mléku nebo 5% BSA dle instrukcí výrobce. Každou membránu jsme inkubovali přes noc ve 4 °C za mírného třepání s 1 ml takto naředěné protilátky v pouzdře z parafilmu. Po inkubaci s primární protilátkou jsme membrány promývali 5x10 minut TBS-Tween 0,05% a 1x10 minut v TBS. Po promytí jsme membrány umístili do tub minihybridizéru a 1 hodinu inkubovali při pokojové teplotě ve vhodném objemu sekundární protilátky (Polyclonal Goat, Anti-Mouse Immunoglobulins; Polyclonal Swine, Anti-Rabbit Immunoglobulins; DAKO) naředěné v 5% mléku. Po inkubaci jsme membrány opět hodinu promývali podle stejného schématu.

**Tab. 14.** Primární protilátky.

protilátka	původ	primární	sekundární	kDa	v 5%	výrobce primární protilátky
anti-lamin B	myš	1:100	1:1000	68/48	mléko	Calbiochem
anti-p53	myš	1:750	1:2000	53	mléko	Exbio
anti-p53_ser392	myš	1:500	1:2000	53	mléko	Exbio
anti-p53_ser15	králík	1:1000	1:1000	53	BSA	Calbiochem
anti-p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	myš	1:1000	1:1000	21	mléko	Sigma
anti-Erk 1/2	myš	1:2000	1:2000	42/44	mléko	Calbiochem
anti-β-aktin	myš	1:20000	1:9000	40	mléko	Sigma

### G) Chemiluminiscenční detekce proteinů

Signál jsme vyvinuli pomocí chemiluminiscenčního kitu (ECL roztok, BM Chemiluminiscence - POD, Roche, Mannheim, GER). Složky byly smíchány v poměru 1:100, membrána v nich inkubována 1 minutu a signál exponován na modrocitlivý film (Foma, Hradec Králové). Film byl zpracován pomocí chemikálií Adepo ve vyvolávacím automatu Fomei. Filmy jsme naskenovali a denzitu pruhů hodnotili pomocí programu Bio-Rad Laboratories Quantity One 1-D Analysis Software.

## 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 Viabilita a proliferace

#### 4.1.1 Výběr dávkového schématu mitoxantronu pomocí sledování proliferační aktivity a viability buněk MOLT-4

V této práci jsme jako modelovou linii používali buňky MOLT-4. Buňky jsou odvozeny od T-lymfocytární leukémie, prakticky všechny exprimují znak CD7 a jsou p53 pozitivní. Singh (2000) ve své publikaci uvádí, že mitoxantron (MX) v koncentracích 0,25 až 2  $\mu\text{mol/l}$  indukuje apoptózu v buňkách MOLT-4, avšak neuvádí dobu, po kterou byly buňky cytostatiku vystaveny.

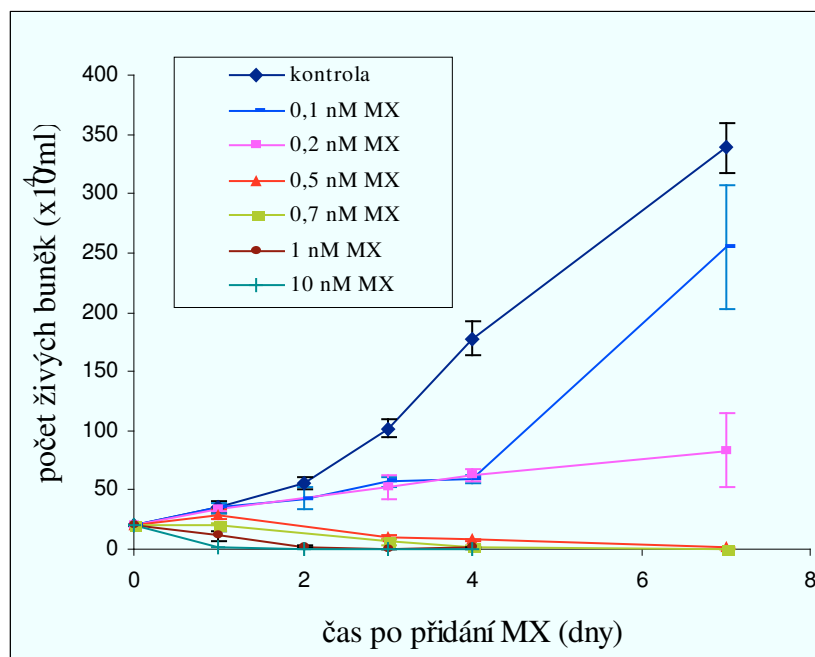
V první fázi výzkumu jsme proto u buněčné linie MOLT-4 provedli studii závislosti proliferační aktivity a viability na koncentraci MX s cílem vybrat dávkové schéma pro další studii. Cytostatikum MX vytváří stabilní komplex s DNA a inhibuje tak replikaci a transkripci. Váže se také k topoisomerase II za vzniku kovalentního komplexu, což má za následek vznik dvouvláknových zlomů DNA a inhibici opravy DNA (Klener, 1996; Faulds et al., 1991).

Buňky vystavené působení různých koncentrací MX (0,1 nmol/l; 0,2 nmol/l; 0,5 nmol/l; 0,7 nmol/l; 1 nmol/l; 10 nmol/l) a buňky kontrolní jsme kultivovali v IMDM mediu při 37 °C v kontrolované atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. V jednotlivých skupinách bylo nasazeno  $2 \times 10^5$  buněk/ml.

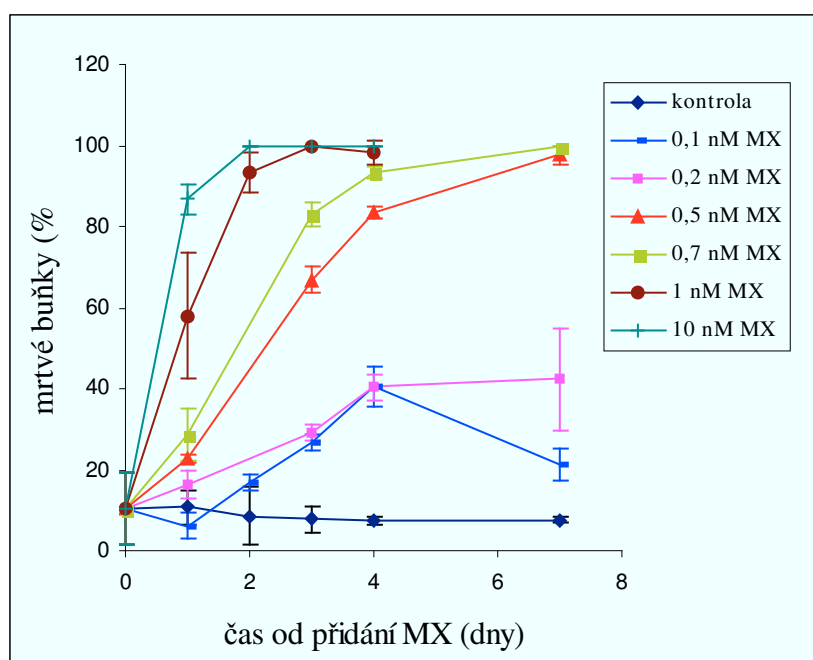
V zadaných časových intervalech (1, 2, 3, 4 a 7 dnů) jsme alikvot buněk z jednotlivých skupin smíchali v poměru 1:1 s roztokem trypanové modři a poměr živých a mrtvých buněk jsme stanovili optickým pozorováním ve světelném mikroskopu v Bürkerově komůrce. Výsledek byl pro živé buňky uváděn jako počet buněk  $\times 10^4/\text{ml}$ . Hodnoty použité v grafech představují průměr s příslušnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů.

Na obrázku 9 je znázorněn efekt MX dávkách 0,1-10 nmol/l na schopnost proliferace buněk MOLT-4, obrázek 10 znázorňuje procentuální zastoupení mrtvých buněk.





**Obr. 9.** Graf závislosti počtu živých buněk na čase po přidání mitoxantronu.



**Obr. 10.** Graf závislosti procent mrtvých buněk na čase po přidání mitoxantronu.

V první sledované skupině, kontrolní, s neovlivněnými buňkami, můžeme sledovat na obrázku 9 logaritmický růst proliferační křivky v čase, což naznačuje, že byly vhodně zvoleny podmínky experimentu.

Z obrázků je patrné, že schopnost buněk proliferovat je závislá jednak na dávce MX a taktéž na délce jeho působení.

Po dávce 0,1 nmol/l MX je až do čtvrtého dne patrný pokles proliferační aktivity buněk a pokles viability vzhledem ke kontrolní skupině. Avšak v časovém intervalu 4 až 7 dnů ukazuje proliferační křivka prudký vzestup počtu životaschopných buněk a rovněž viabilita se sedmý den zlepšuje. Tato nízká koncentrace MX tak pravděpodobně umožňuje buňkám MOLT-4 po 4. dnu od ovlivnění adaptaci a opravu poškození na subcelulární úrovni.

Buňky vystavené působení 0,2 nmol/l MX proliferovaly jen velmi málo, procento mrtvých buněk 7. den dosáhlo ( $42 \pm 13$ )%. Tato dávka působí na buňky spíše cytostaticky.

Jak je patrné z obrázků 9 a 10 koncentrace MX 0,5; 0,7; 1 a 10 nmol/l byly letální a vedly ke smrti všech buněk. Porovnáme-li průběh proliferační křivky a křivky ukazující procenta mrtvých buněk skupiny vystavené působení MX o koncentraci 0,5 nmol/l s křivkami pro 0,7; 1 a 10 nmol/l MX zjistíme, že růst počtu mrtvých buněk je zde pozvolnější, a že ke smrti všech buněk dochází až 7. den, zatímco vyšší koncentrace vedou k eradikaci kultury do 4. dne.

Na základě získaných výsledků jsme pro další experimenty zvolili použití 0,1 a 0,5 nmol/l MX.

#### **4.1.2 Vliv pifithrinu- $\alpha$ na působení mitoxantronu**

Analyzovali jsme efekt MX (0,1 a 0,5 nmo/l), pifithrinu- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ , 20  $\mu$ mol/l) a jejich kombinací na proliferaci a životaschopnost buněk MOLT-4. MX jsme přidávali k buněčné suspenzi 45 minut po přidání PFT- $\alpha$ . Použili jsme stejné podmínky kultivace buněk, způsob počítání buněk a prezentace výsledků jako v experimentu 4.1.1.

Odpovědí na poškození buněčné DNA je aktivace apoptózy závislé na proteinu p53 a poskytnutí možnosti eliminace prekursorů nádorových buněk. Během protinádorové terapie může být však jako vedlejší efekt spouštěna p53-závislá apoptóza i v normálních tkáních a omezuje tak její efektivitu (*Bassi et al., 2002; Walton et al., 2005*).

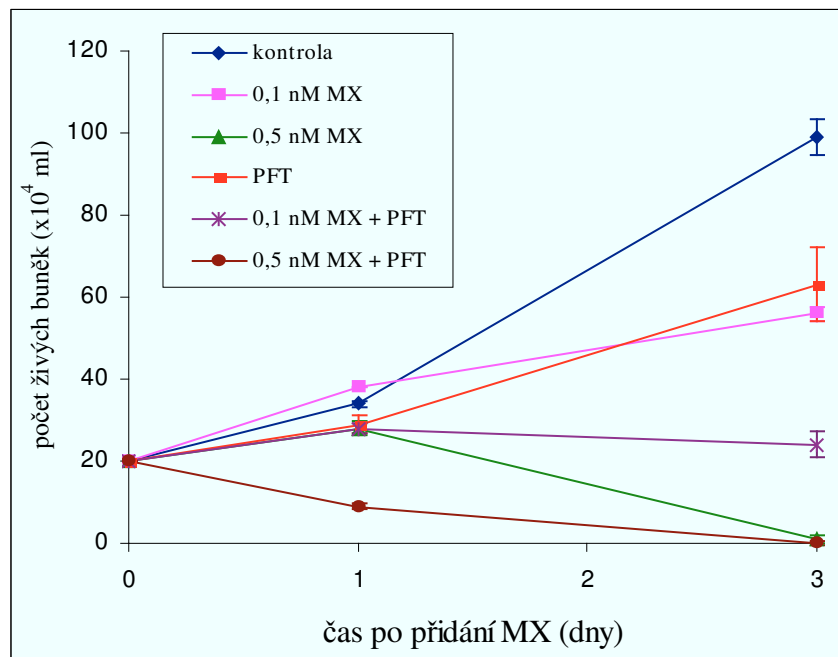
Komarova a Gudkov (2000) publikovali, že dočasné potlačení funkce proteinu p53 in vitro pomocí PFT- $\alpha$  inhibuje v senzitivních buňkách apoptózu indukovanou poškozením DNA a tak zvyšuje množství buněk, které stres přežijí. Tento přístup je vhodný pouze u nádorů, které postrádají funkční p53, protože jejich citlivost k terapii by se neměla měnit v přítomnosti inhibitoru p53 (*Bassi et al., 2002*).

V posledních letech PFT- $\alpha$  umožňuje *in vivo* a *in vitro* zkoumání funkce proteinu p53. PFT- $\alpha$  reverzibilně inhibuje transkripční aktivitu proteinu p53, brání apoptóze spouštěné tímto proteinem, zastavení buněčného cyklu a zablokování syntézy DNA (Rocha *et al.*, 2003). O mechanismu působení PFT- $\alpha$  je známo velmi málo. Zdá se, že jeho efekt spočívá v porušení jaderného transportu proteinu p53 (Komarova a Gudkov, 2000).

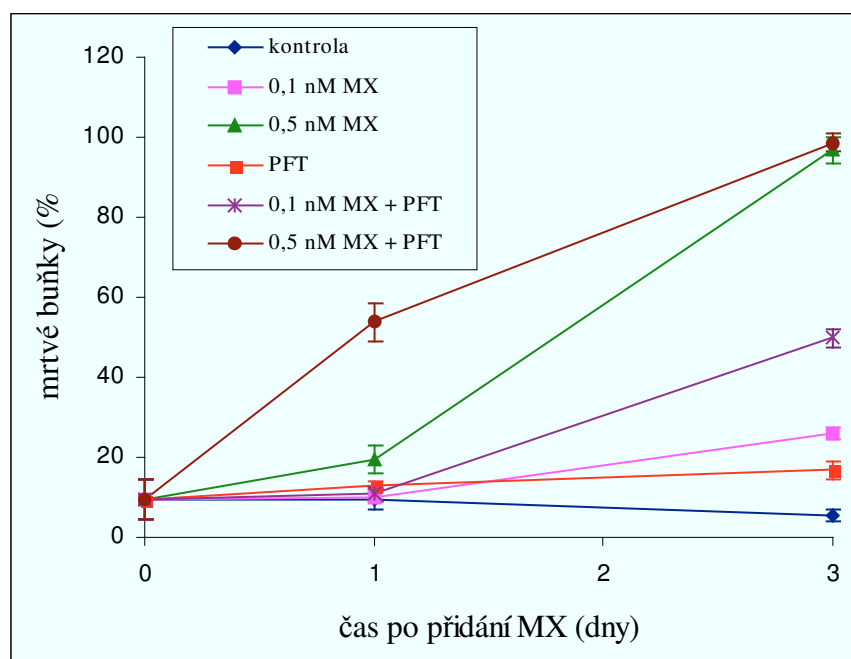
Bylo zjištěno, že 10  $\mu\text{mol/l}$  PFT- $\alpha$  chrání myší C8 buňky před cytotoxickým efektem některých protinádorových látek (Komarov *et al.*, 1999). Kaji *et al.* (2003) však publikovali, že následkem působení PFT- $\alpha$  na myší JB6 buňky je štěpení kaspasy 3, indukce apoptózy a cytotoxicity způsobem závislým na proteinu p53. Počáteční studie působení PFT- $\alpha$  byly uskutečněny v myších modelech, kde není jasně definován molekulární mechanismus vlivu. Walton *et al.* (2005) provedli detailní studii efektu PFT- $\alpha$  na buňkách exprimující p53 wild-typ, A2780 a HCT116. 10  $\mu\text{mol/l}$  (maximální netoxická dávka) a 30  $\mu\text{mol/l}$  PFT- $\alpha$  (maximální použitelná dávka) v tomto případě potencoval cytotoxicitu některých protinádorových látek (cytostatikum etoposid - inhibitor topoisomerasy II, doxorubicin) a neměl vliv na proteinu p53 závislou expresi proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>.

Jakým způsobem PFT- $\alpha$  a inhibice p53 ovlivňují MX indukovanou buněčnou smrt u leukemických buněk MOLT-4 není dosud známo, a objasnění tohoto děje bylo předmětem naší studie.

Proliferační křivka skupiny vystavené působení PFT- $\alpha$  ukazuje na obrázku 11 pokles proliferační aktivity buněk v čase ve srovnání s kontrolní skupinou, v intervalu 3 dny po ovlivnění je tento rozdíl statisticky velmi významný (0,008877) ( $p < 0,01$ ). Přitom procento mrtvých buněk stoupá ve srovnání s kontrolní skupinou pouze mírně (PFT –  $(6 \pm 2)\%$ , ko –  $(17 \pm 2)\%$ ; Obr. 12).



**Obr. 11.** Vliv mitoxantronu a pifithrinu- $\alpha$  na počet živých buněk MOLT-4.



**Obr. 12.** Vliv mitoxantronu a pifithrinu- $\alpha$  na počet mrtvých buněk MOLT-4.

Zaměřili jsme se na posouzení vlivu PFT- $\alpha$  na působení MX. Z obrázků 11 a 12 je patrné, že 0,5 nmol/l MX i jeho kombinace s PFT- $\alpha$  byly 3. den po ovlivnění pro buňky zcela letální. První den po ovlivnění je mezi těmito dvěma skupinami vysoce statisticky významný rozdíl v proliferaci (0,000569) ( $p < 0,001$ ), buněk vystavených kombinaci MX a

PFT- $\alpha$  je signifikantně méně. Obrázek 12 ukazuje, že v tomto intervalu je pro buňky toxičtější kombinace 0,5 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  než působení samotného MX.

Stejně výsledky jsme získali i pro 0,1 nmol/l MX. Proliferace buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MX byla v intervalu 1 den po ovlivnění vyšší než u buněk vystavených samotnému PFT- $\alpha$  a dokonce i vyšší než proliferace buněk v kontrolní skupině. Na obrázku 11 můžeme vidět, že do intervalu 1 den mírně proliferovaly také buňky se skupiny ovlivněné kombinací 0,1 nmol/l MX a PFT- $\alpha$ . Později však proliferace v těchto dvou skupinách byla utlumena. U kombinace 0,1 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  v intervalu 3 dny po ovlivnění je patrný pokles počtu živých buněk ve srovnání se skupinou pro 0,1 nmol/l MX, tento rozdíl je statisticky velmi významný (0,006421) ( $p < 0,01$ ), zároveň ve srovnání s působením samotného MX stoupá procentuální zastoupení mrtvých buněk (Obr. 12).

Tento výsledek je v souladu s výsledky, ke kterým dospěl Walton et al. (2005) a tj., že u p53-wt buněk PFT- $\alpha$  potencuje cytotoxicitu některých protinádorových látek.

## 4.2 Analýza apoptózy pomocí flow-cytometrie

Jednou z významných funkcí p53 je indukce apoptózy po poškození DNA způsobeném cytostatiky. Provedli jsme experimenty s cílem zjistit, zda protein p53 indukovaný mitoxnatronem (MX) a ovlivňovaný pifithrinem- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ) vyvolává v buňkách MOLT-4 odpověď ve formě apoptózy.

### 4.2.1 Analýza AnnexinV/PI a jednoparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events

Důležitými znaky, které rozlišují mrtvé a živé buňky, jsou ztráta transportních funkcí plazmatické membrány, ztráta struktury a integrity plazmatické membrány. Stupeň změn permeability plazmatické membrány se mění se stavem apoptózy, typem buněk a způsobem indukce apoptózy. Pouze porušená cytoplazmatická membrána nekrotických a pozdně apoptických buněk umožňuje vstup propidium jodidu (PI) dovnitř do buněk. PI, fluorescenční barvivo používané při flow-cytometrii, se specificky a stechiometricky váže na DNA.

Časná fáze apoptózy je charakterizována expozicí fosfatidylserinu z vnitřní strany membrány na její vnější stranu, který detekujeme pomocí Annexinu V (A) konjugovaného s fluoresceinem. A je 35-36 kDa velký  $\text{Ca}^{2+}$  závislý protein, který má vysokou afinitu k fosfatidylserinu.

Duální značení buněk pomocí PI a konjugátu Annexin V-FITC je používáno pro cytometrickou detekci jednotlivých stádií apoptózy. Živé buňky jsou negativní na A i PI, časně apoptické buňky jsou A pozitivní a PI negativní, pozdně apoptické buňky a nekrotické buňky jsou A a PI pozitivní, buňky bez membrány jsou pozitivní pouze na PI.

Jednparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events představuje promítnutí dvouparametrické analýzy AnnexinV/PI na jednu osu a měla by poskytovat stejné výsledky. Procenta uvedená v obrázcích 14a-f a 16a-f vyjadřují již bez rozlišení časně apoptických a pozdně apoptických/nekrotických buněk množství apoptických buněk.

#### 4.2.1.1 Analýza 24 hodin po ovlivnění

##### *Analýza AnnexinV/PI*

K znázornění průběhu apoptózy jsme využili dot-plot A-PI. Výsledky jsou tak uvedeny v grafech, které ukazují na rozmístění buněk v jednotlivých kvadrantech a jejich množství.

V kontrolní skupině (Obr. 13a) bylo zanalyzováno 75,4% živých, 13,4% časně apoptických, 10,1% pozdně apoptických/nekrotických buněk a 1,1% buněk bez membrány, nebo-li buněk mechanicky poškozených. Tato kontrola není ideální. Buněčná linie MOLT-4 je však citlivá na zacházení a lze předpokládat, že buňkám nebyl poskytnut dostatečný čas pro regeneraci a optimální proliferaci.

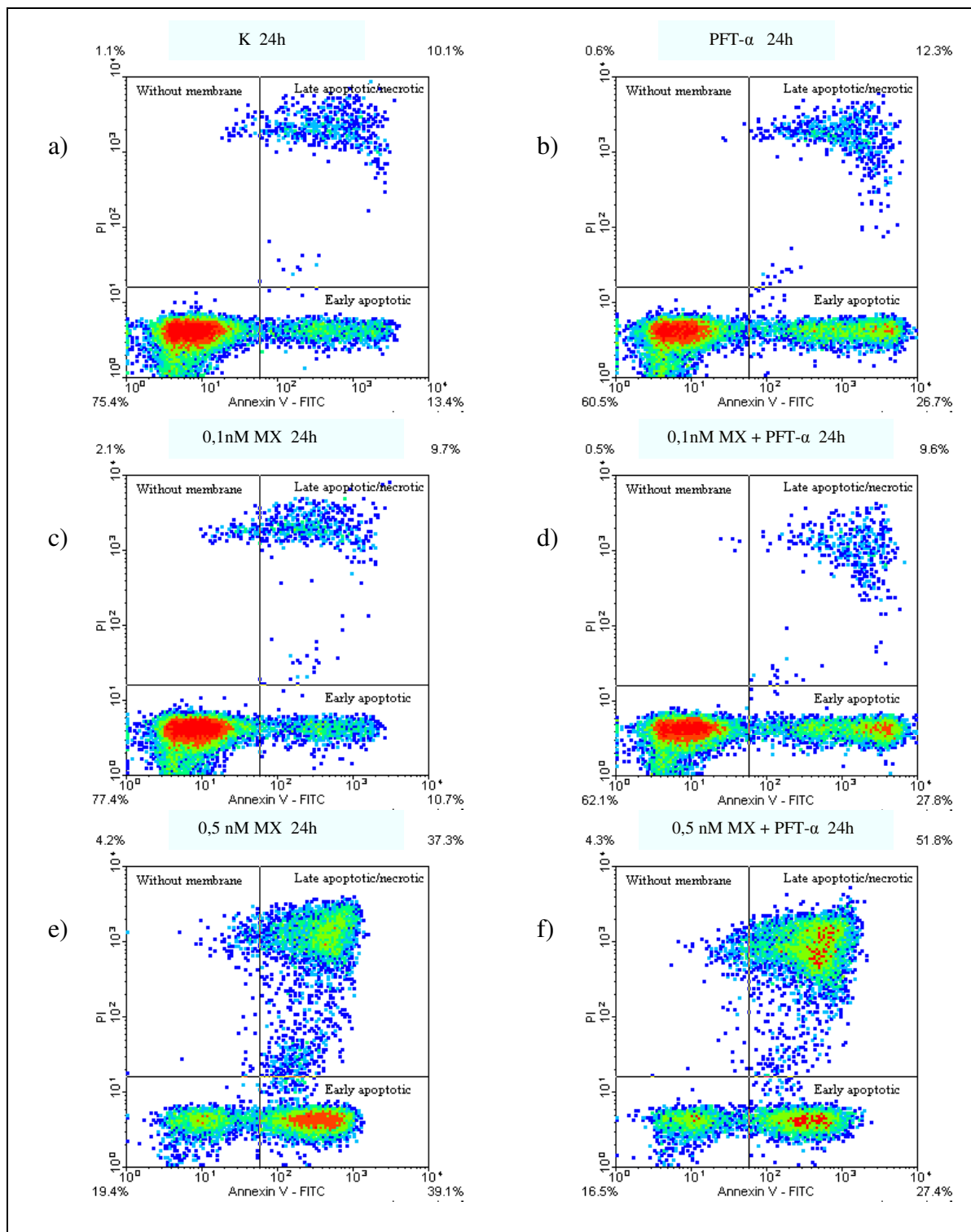
Velmi podobné výsledky jsme získali i pro skupinu, která byla vystavena působení 0,1 nmol/l MX (Obr. 13c). Stejně jako na obrázku 11 i zde jsme potvrdili, že 0,1 nmol/l MX v intervalu 24 hodin proliferaci buněk mírně potencuje, ve srovnání s kontrolou v této skupině přežívá více buněk (77,4%).

Porovnáním kontrolní skupiny (Obr. 13a), skupiny s 0,1 nmol/l MX (Obr. 13c) a s PFT- $\alpha$  (Obr. 13b) jsme zjistili, že PFT- $\alpha$  zvýšil množství buněk v časně fázi apoptózy (26,7%).

Vzhledem ke skupině buněk ovlivněných 0,1 nmol/l MX (77,4% živých buněk, Obr. 13c) poklesla procenta živých buněk v kombinaci 0,1 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  (62,1%, Obr. 13d) a ve skupině pro PFT- $\alpha$  (60,5%, Obr. 13b). PFT- $\alpha$  buňkám MOLT-4 vadí více než 0,1 nmol/l MX. K tomuto závěru jsme dospěli i zhodnocením vlivu PFT- $\alpha$  na MX pomocí sledování proliferační aktivity buněk MOLT-4 (Obr. 11).

MX v koncentraci 0,5 nmol/l indukuje již v tomto intervalu výraznou apoptózu, stoupá jak množství časně apoptických buněk (39,1%), tak buněk ve třetím kvadrantu pro pozdně apoptické/nekrotické buňky. Ve skupině pro 0,5 nmol/l MX tyto buňky tvoří

37,3% (Obr. 13e). Ve skupině pro kombinaci 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  je časně apoptických 27,4% buněk a pozdně apoptických/nekrotických 51,8% (Obr. 13f), ve srovnání s působením samotného MX dochází k posunu ve prospěch pozdních fází buněčné smrti.



Obr. 13a-f. Analýza AnnexinV/PI 24 hodin po ovlivnění.

### ***Jednparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events***

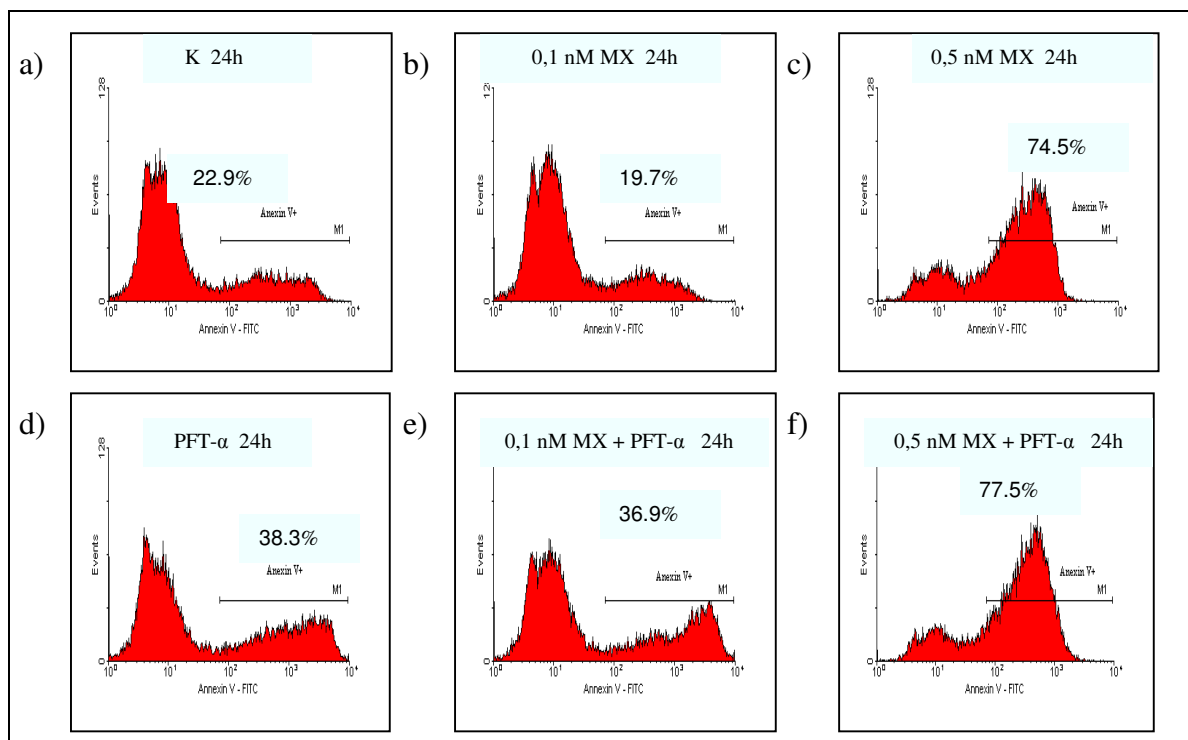
V jednparametrickém histogramu vazby A je na ose x zachycena intenzita fluorescence AnnexinV-FITC a na ose y počet buněk.

V kontrolní skupině bylo detekováno 22,9% apoptických buněk (Obr. 14a). V intervalu 24 hodin po ovlivnění je nejméně apoptických buněk ve skupině pro 0,1 nmol/l MX (19,7%, Obr. 14b). Tuto skutečnost jsme potvrdili i sledováním proliferační aktivity (Obr. 11).

PFT- $\alpha$  indukuje po 24 hodinách apoptózu u 38% buněk (Obr. 14d). Množství apoptických buněk je v této skupině dokonce vyšší než ve skupině, která byla vystavena působení 0,1 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  (36,9%, Obr. 10e). Efekt PFT- $\alpha$  a 0,1 nmol/l MX se nesčítá.

Množství apoptických buněk po působení 0,5 nmol/l MX (Obr. 14c) a kombinace 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  (Obr. 14f) je prakticky stejné. Ve skupině ovlivněné kombinací 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  je pouhé 3% více apoptických buněk (77,5%) než ve skupině pro samotný 0,5 nmol/l MX (74,5%). Vezmeme-li však zároveň v úvahu přesun do pozdějších fází apoptózy zjištěný dvouparametrickou analýzou A-PI a údaje o proliferaci a viabilitě, lze konstatovat že PFT- $\alpha$  24 hodin po ovlivnění potencuje cytotoxicitu 0,5 nmol/l MX. Toto zjištění je v souladu s prací Waltona et al. (2005), kteří prokazují, že inhibitor p53 PFT- $\alpha$  nejen že nemá protektivní efekt vzhledem k indukci apoptózy, ale dokonce potencuje cytotoxické působení doxorubicinu a etoposidu.





**Obr. 14a-f.** Jednparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events 24 hodin po ovlivnění. Množství apoptických buněk bez rozlišení časné a pozdní fáze apoptózy.

#### 4.2.1.2 Analýza 72 hodin po ovlivnění

##### *Analýza AnnexinV/PI*

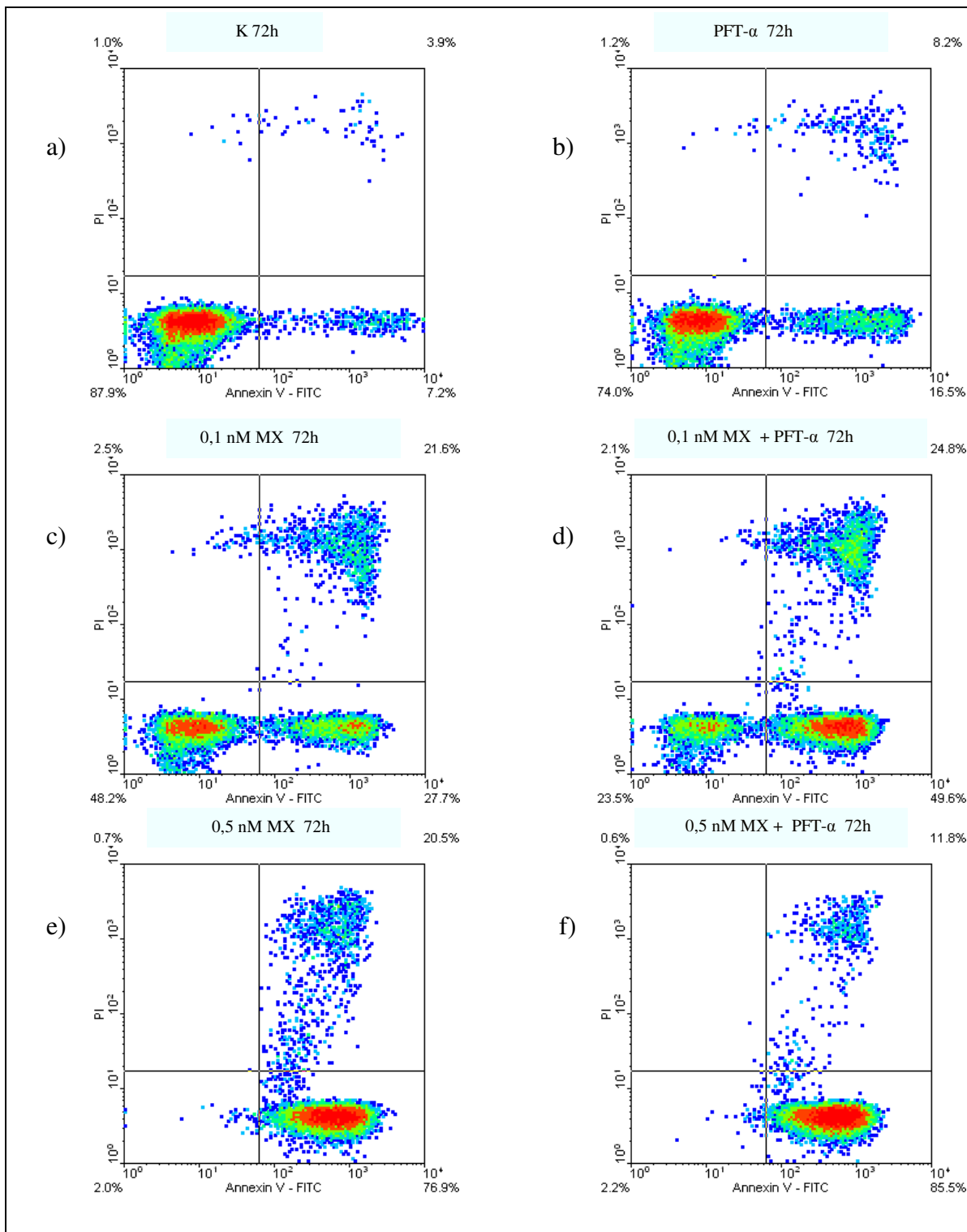
Pomocí analýzy AnnexinV/PI jsme v kontrolní skupině (Obr. 15a) detekovali 87,9% živých, 7,2% časně apoptických, 3,9% pozdně apoptických/nekrotických buněk a 1% buněk bez membrány.

Stejně jako v intervalu 24 hodin i 72 hodinové působení PFT- $\alpha$  snižuje množství živých buněk (74%, Obr. 15b) v porovnání s kontrolou. Stejně i procenta časně a pozdně apoptických/nekrotických buněk oproti kontrole vzrostla a to téměř dvojnásobně (16,5%, resp. 8,2%).

Ve skupině s MX o koncentraci 0,1 nmol/l (Obr. 15c) je po 72 hodinách pouze polovina buněk živých (48,2%) a druhou polovinu tvoří buňky ze zbývajících kvadrantů, které představují buňky mrtvé (27,7% časně apoptických buněk, 21,6% pozdně apoptických/nekrotických buněk, 2,5% buněk bez membrány).

Efekt 0,1 nmol/l MX byl opět potencován PFT- $\alpha$  (Obr. 15d). Buňky se nakupily v kvadrantu pro časně apoptické buňky (49,6%). Množství pozdně apoptických/nekrotických buněk (24,8%) ve srovnání působením samotného 0,1 nmol/l MX (21,6%) výrazně nestouplo. Přesun buněk do kvadrantu časně apoptických buněk jsme pozorovali i v intervalu 24 hodin.

MX o koncentraci 0,5 nmol/l (Obr. 15e) jak samostatně tak v kombinaci s PFT- $\alpha$  (Obr. 15f) byly pro buňky MOLT-4 zcela letální, což jsme potvrdili sledováním proliferační aktivity (Obr. 11 a 12) a DNA analýzou (Obr. 19c a 19f).



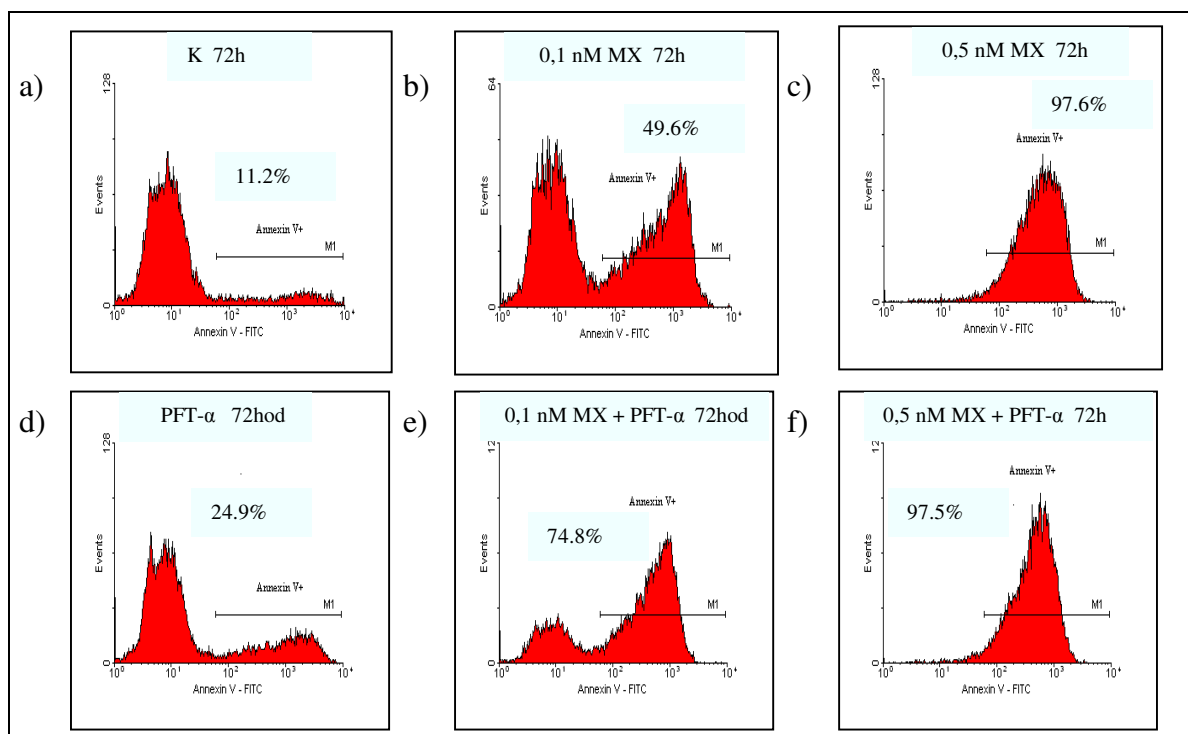
**Obr. 15a-f.** Analýza AnnexinV/PI 72 hodin po ovlivnění.

### Jednparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events

Pro interval 72 hodin jsme nejméně apoptických buněk detekovali v kontrolní skupině (11,2%, Obr. 16a).

0,1 nmol/l MX (Obr. 16b) oproti intervalu 24 hodin indukuje u buněk MOLT-4 apoptózu mnohem výrazněji než PFT- $\alpha$  (Obr. 16d). Sečtením procent apoptických buněk ve skupině pro 0,1 nmol/l MX (49,6%) a ve skupině pro PFT- $\alpha$  (24,9%) se velmi přesně dostáváme na procenta apoptických buněk ve skupině vystavené působení jejich kombinaci (74,5%~74,8%, Obr. 16e). Zdá se, že v intervalu 72 hodin po ovlivnění se efekt 0,1 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  sčítá.

Na obrázku 16c a 16f je opět vidět zcela letální účinek 0,5 nmol/l MX (97,6%) a kombinace 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  (97,5%) na buněčnou linii MOLT-4.



**Obr. 16a-f.** Jednparametrická analýza AnnexinV-FITC/Events 72 hodin po ovlivnění. Množství apoptických buněk bez rozlišení časně a pozdní fáze apoptózy.

### 4.2.2 Dvoupametrická analýza Side-scatter/objem

Kromě detekce fluorescence procházejících buněk umožňuje průtoková cytometrie sledování parametrů lomu a rozptylu světla, které poskytují informace o velikosti a

strukturu buňky. Příímý rozptyl – forward scatter (FSC) je charakterizován lomem světla o malém úhlu a je úměrný velikosti buňky. U flowcytometru CellLab Quanta tomuto parametru odpovídá hodnota elektronického objemu (EV). Boční rozptyl - side scatter (SSC), jehož úhel je 90°, je indikátorem vnitřní buněčné struktury resp. granularity.

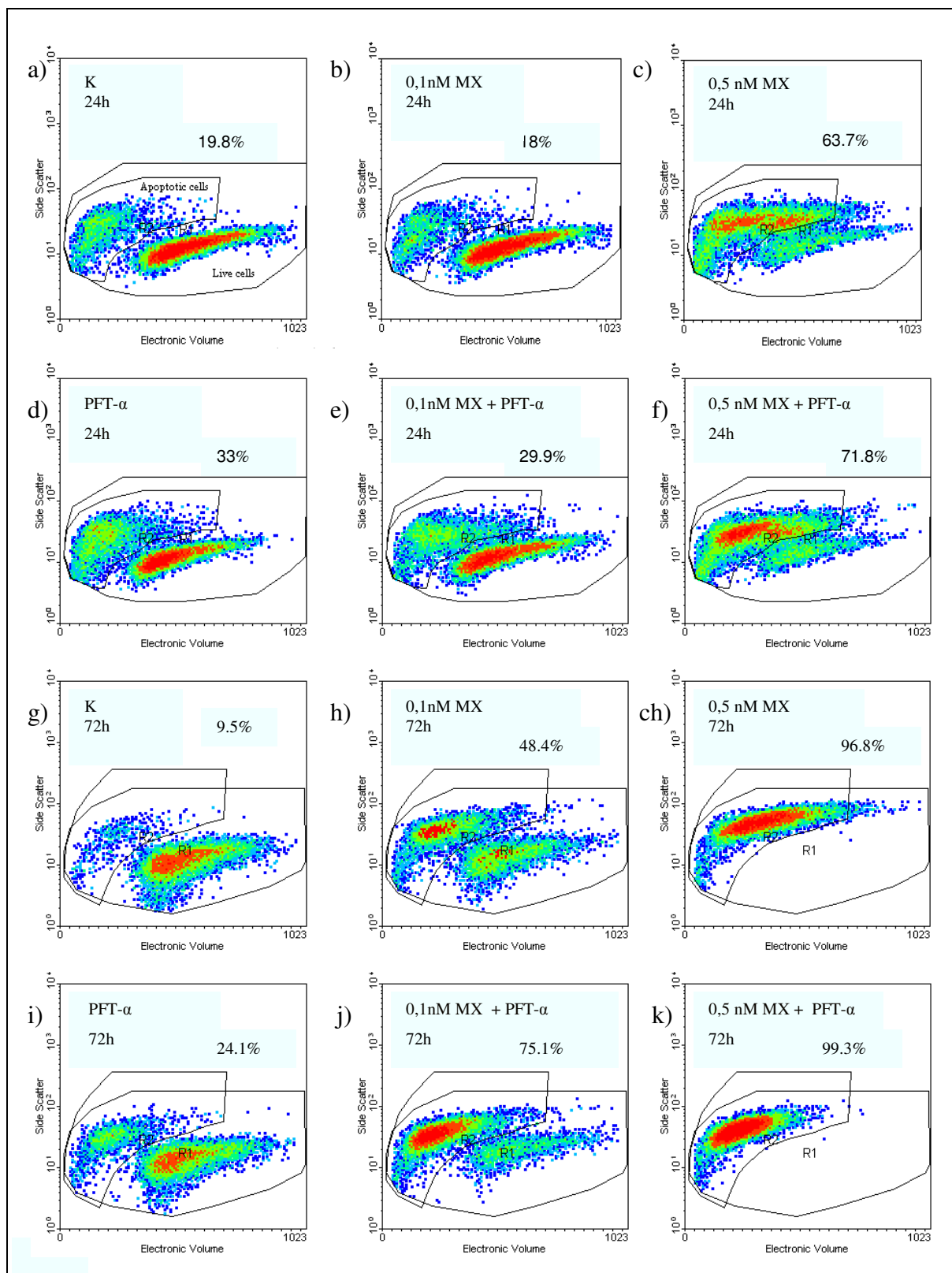
Během apoptózy se buňky smršťují a jaderná DNA je fragmentována, což se projeví jako snížení FSC (pokles objemu), zvýšení SSC (nárůst granularity) oproti živým buňkám. Změny světelného rozptylu nejsou pro apoptózu specifické, avšak mohou kontrolovat a doplnit více specifické zkoušky. Proto jsme analýzu Side-scatter/objem použili jako doplňkovou metodu k ostatním metodám detekujícím apoptózu. Výsledky uvádíme společně pro oba intervaly.

Údaje o počtu apoptických buněk jsou uvedeny v grafech, které vyjadřují závislost granularity na objemu buněk.

Analýza side-scatter/objem poskytla výsledky se stejným trendem jako analýzy předcházející.

V intervalu 24 hodin po ovlivnění nejméně apoptických buněk obsahuje skupina vystavená působení 0,1 nmol/l MX (18%, Obr. 17b). V kontrolní skupině jsme detekovali 19,8% apoptických buněk (Obr. 17a). Skupina pro 0,5 nmol/l MX (Obr. 17c) a skupina pro kombinaci 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  (Obr. 17f) mají největší nárůst počtu apoptických buněk vůči kontrole (63,7%, resp. 71,8%), efekt 0,5 nmol/l MX je potencován PFT- $\alpha$ .

V intervalu 72 hodin po ovlivnění buněk MOLT-4 nejméně apoptických buněk obsahuje kontrolní skupina neovlivněných buněk (9,5%, Obr. 17g). Nejmenší nárůst apoptických buněk vůči kontrole je viditelný u skupiny, ve které na buňky působil PFT- $\alpha$  (24,1%, Obr. 17i). Ve skupině pro 0,1 nmol/l MX (Obr. 17h) je 48,4% apoptických buněk. Opět jsme potvrdili, že po 72 hodinách je kombinace 0,1 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  účinnějším induktorem apoptózy než samotný MX či PFT- $\alpha$  (75,1%, Obr. 17j). Po 72 hodinách je 0,5 nmol/l MX (Obr. 17ch) a jeho kombinace s PFT- $\alpha$  (Obr. 17k) letální (96,8%, resp. 99,3%).



**Obr. 17a-k.** Analýza Side-scatter/objem 24 (a-f) a 72 (g-k) hodin po ovlivnění. Množství apoptických buněk.

### 4.3 Analýza buněčného cyklu

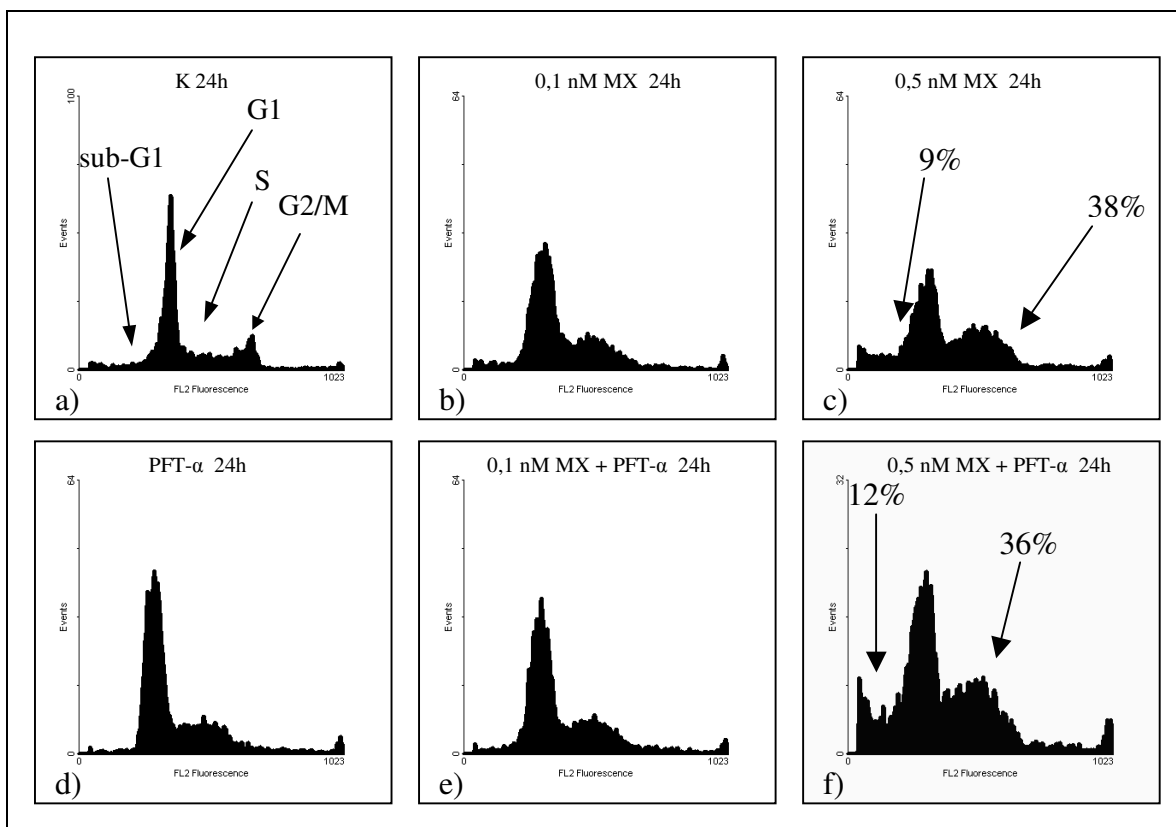
Jedním z časných dějů při apoptóze je aktivace endonukleas, které preferenčně štěpí DNA v internukleosomální (spojovací) sekci. Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství DNA v buňce a z tohoto důvodu vznik tzv. “sub-G1 vrcholu”, který tvoří apoptické buňky. Vedle apoptických buněk sub-G1 vrchol může však zahrnovat i buňky mechanicky poškozené nebo buňky s odlišnou strukturou chromatinu, které mohou mít také nižší obsah DNA. Za sub-G1 vrcholem je G1 vrchol. Nejvyšší obsah DNA mají buňky s diploidním množstvím chromozomů nacházející se v G2/M fázi. Mezi G1 a G2/M fází se nachází S fáze.

Pro stanovení obsahu DNA a změn v buněčném cyklu u buněk MOLT-4 v reakci na samotný MX nebo jeho kombinaci s PFT- $\alpha$  jsme provedli analýzu obsahu DNA 24 a 72 hodin po ovlivnění. Podíl buněk nacházejících se v jednotlivých fázích buněčného cyklu jsme určovali flow-cytometricky na základě stanovení obsahu DNA značené propidium jodidem. Výsledkem je histogram vyjadřující závislost množství buněk na obsahu DNA. Měření obsahu DNA v jednotlivých buňkách poskytuje statistický pohled na buněčný cyklus.

#### 4.3.1 DNA analýza buněk 24 hodin po ovlivnění

MX se řadí z hlediska buněčného cyklu mezi fázově nespecifická cytostatika, s určitou převahou inhibice ve fázi G2/M (*Klener, 1996; Faulds et al., 1991*).

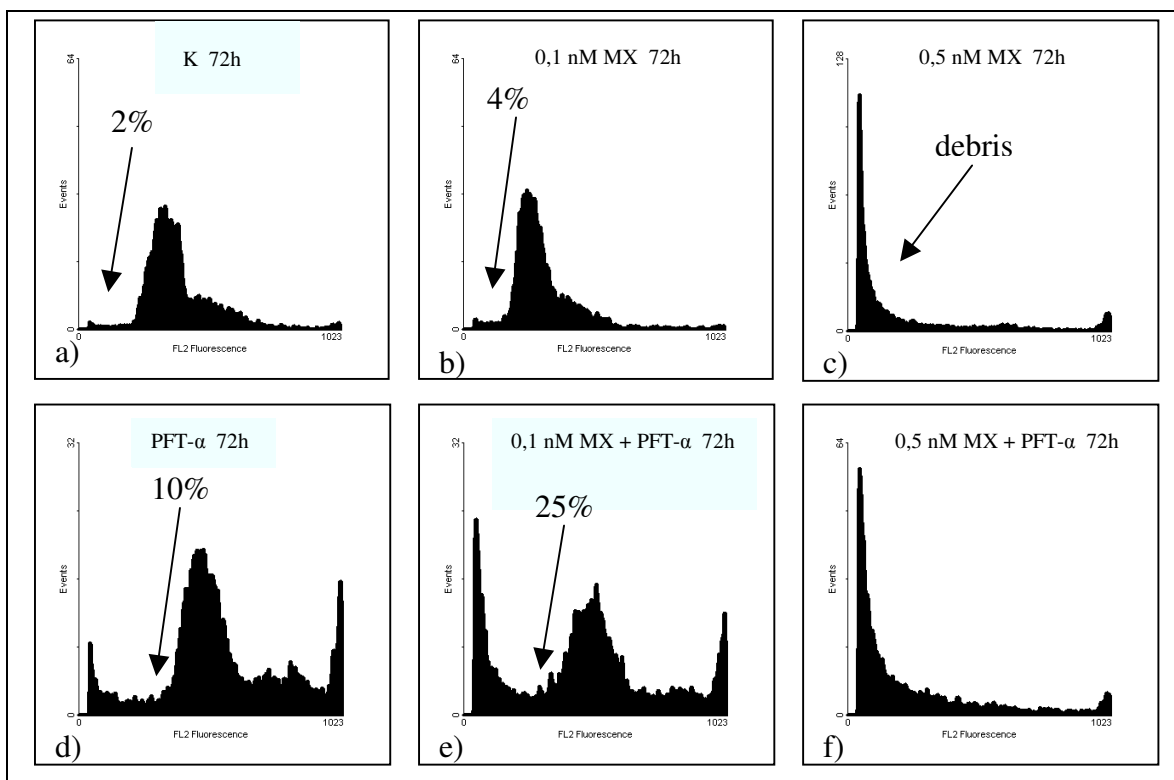
V porovnání s kontrolou (Obr. 18a) způsobuje 0,1 nmol/l mírnou zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi (obr. 18b). Ve skupině, na kterou 24 hodin působil 0,5 nmol/l MX (Obr. 18c), je tento efekt výraznější, detekováno 38% buněk v G2/M fázi. Blok buněk v G2/M fázi není ovlivněn PFT- $\alpha$  (36%, obr. 18f). Jak ukazuje i obr. 18e, zdá se být jeho indukce nezávislá na proteinu p53. Množství buněk v sub-G1 vrcholu ve skupině pro 0,5 nmol/l MX (9%) a pro kombinaci 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  (12%) opět naznačuje potenciaci cytotoxického účinku MX v přítomnosti PFT- $\alpha$ .



**Obr. 18a-f.** DNA analýza v intervalu 24 hodin po ovlivnění.

#### 4.3.2 DNA analýza buněk 72 hodin po ovlivnění

Ve skupině kontrolních neovlivněných buněk jsou detekovány 2% buněk v časném stádiu buněčné smrti (Obr. 19a). U buněk vystavených působení 0,1 nmol/l MX (Obr. 19b) došlo k nárůstu apoptických buněk na 4%. PFT- $\alpha$  v kombinaci s 0,1 nmol/l MX (Obr. 19e) množství buněk v sub-G1 vrcholu výrazně zvýšil (25%). Množství apoptických buněk, v porovnání s kontrolou, je mírně vyšší i u skupiny pro PFT- $\alpha$  (10%, Obr. 19d). Tyto údaje korelují s výsledky předchozích experimentů a potvrzují, že inhibitor p53 PFT- $\alpha$  potencuje cytotoxický účinek MX. Buňky, které jsme po dobu 72 hodin vystavili působení 0,5 nmol/l MX (Obr. 19c) a jeho kombinaci s PFT- $\alpha$  (Obr. 19f), již zcela podlehly sekundární nekróze a tvoří debris.



Obr. 19a-f. DNA analýza v intervalu 72 hodin po ovlivnění.

#### 4.4 Elektroforéza a Western-blott

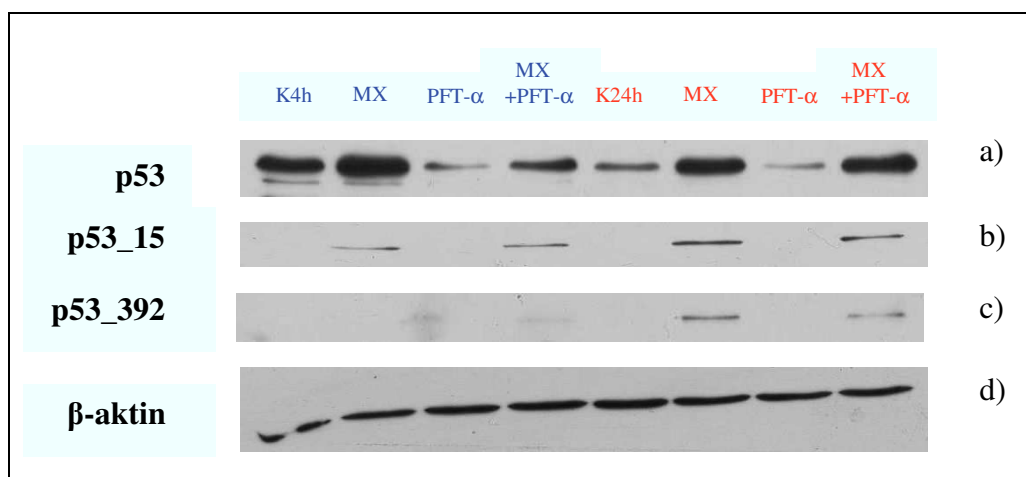
Pro určení změn hladiny sledovaných proteinů jsme použili elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, westernový přenos a selektivní detekci pomocí příslušných protilátek značených peroxidasou. Peroxidasová aktivita byla vizualizována chemiluminiscenčně a zachycena na fotografickém filmu. Námi detekované proteiny vyžadují různou dobu expozice.

Vzniklé fotografické snímky jsme analyzovali pomocí programu Bio-Rad Laboratories Quantity One 1-D Analysis Software. U jednotlivých skupin buněk jsme tak zjistili integrovanou optickou denzitu (IOD, integrated optical density) proteinů, která kvantifikuje míru exprese jednotlivých proteinů. Získané údaje o optické denzitě jednotlivých proteinů jsme zanesli do sloupcových grafů, které názorně ukazují zastoupení a kvantitu proteinů v testovaných skupinách buněk a zhodnocují chování buněk po ovlivnění.

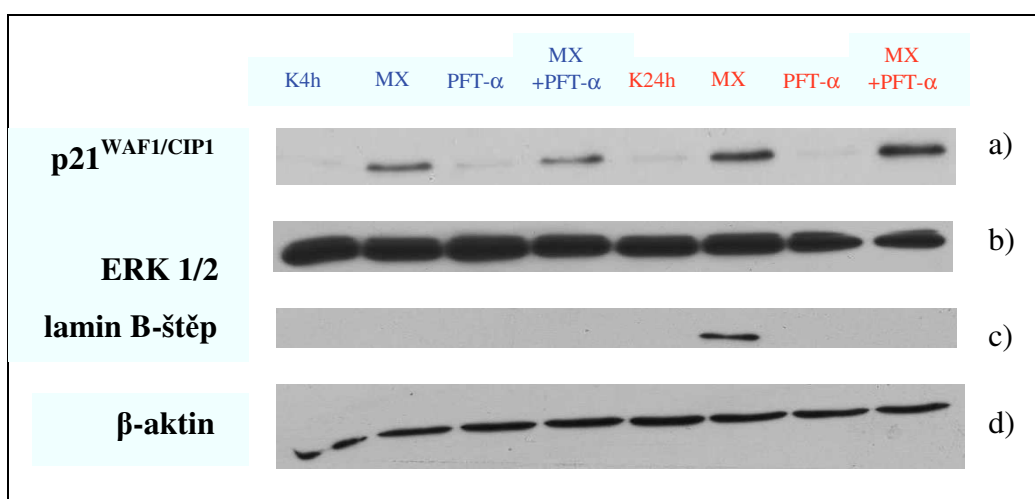
Sledovali jsme expresi proteinů, která byla ovlivněna působením MX o koncentraci 0,5 nmol/l a to jak samostatně, tak v kombinaci s PFT- $\alpha$ . Mohli jsme tak posoudit vliv PFT- $\alpha$  na působení MX v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění.



V následujících pokusech jsme pomocí monoklonálních protilátek detekovali protein p53, jeho posttranslačně modifikované formy a štěpení laminu B. Tyto proteiny se podílejí na indukci apoptózy a jejich množství vzrůstá v závislosti na míře poškození buňky. Dále nás zajímala exprese proteinů zapojených v signálních cestách regulujících buněčný cyklus, přežití a proliferaci buněk, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a ERK1/2. Výsledky všech experimentů byly třikrát potvrzeny.



**Obr. 20a-d.** Fotografické snímky z western blottingu. Změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem p53<sub>15</sub> a p<sub>392</sub> v buňkách MOLT-4 v důsledku působení mitoxantronu a pifithrinu- $\alpha$  po dobu 4 a 24h. Stanovení  $\beta$ -aktinu pro kontrolu nanášky.

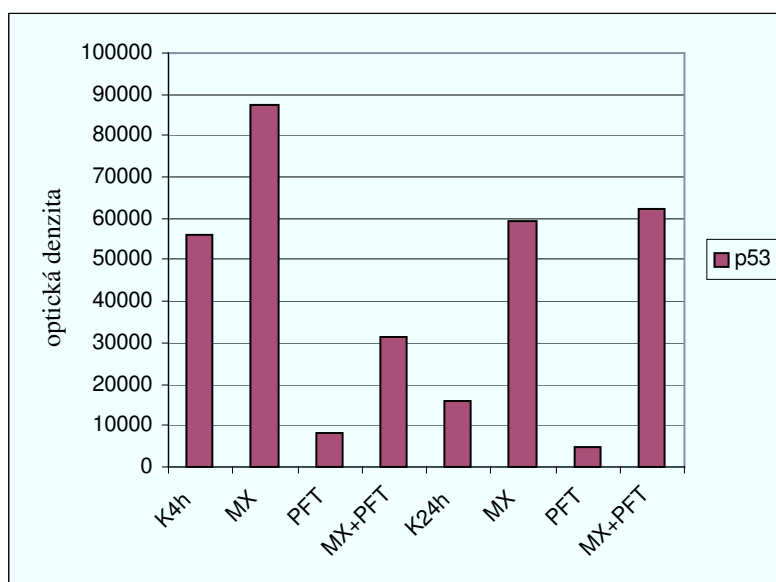


**Obr. 21a-d.** Fotografické snímky z western blottingu. Změny v expresi proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ERK 1/2 a štěpu laminu B v buňkách MOLT-4 v důsledku působení mitoxantronu a pifithrinu- $\alpha$  po dobu 4 a 24h. Stanovení  $\beta$ -aktinu pro kontrolu nanášky.

Pro kontrolu nanášky proteinů jsme stanovovali množství  $\beta$ -aktinu, strukturálního proteinu buňky, který je součástí cytoskeletu. Jak znázorňuje obrázek 20d a 21d., všechny experimentální skupiny obsahují stejné množství proteinu.

#### 4.4.1 Exprese proteinu p53 v buňkách MOLT-4

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.4.1, je za normálního stavu hladina proteinu p53 v buňkách nízká až nedetekovatelná, což je způsobeno rovnováhou mezi syntézou a degradací p53. V důsledku poškození DNA (UV nebo ionizující záření, syntetická chemoterapeutika) dochází k fosforylaci p53 ATM/ATR kinasami, zvýšení hladiny proteinu a jeho aktivity (*Prives a Hall, 1999; Komarova a Gudkov, 2000*).



**Obr. 22.** Integrovaná optická denzita v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění.

Expres proteinu p53.

Jak je vidět na obrázku 20a a 22, obsahuje kontrolní skupina buněk v intervalu 4 hodiny větší množství proteinu p53 než kontrolní skupina pro interval 24 hodin, ve které je malé množství proteinu p53, což odpovídá skutečnosti, že se jedná o kontrolní skupinu buněk, které nebyly vystaveny působení stresových stimulů.

Nejnižší exprese proteinu p53 byla zaznamenána po ovlivnění buněk PFT- $\alpha$ . Množství bylo dokonce nižší než u skupin kontrolních. Tento výsledek podporuje všeobecně přijímané tvrzení tj. , že PFT- $\alpha$  je inhibítozem proteinu p53.

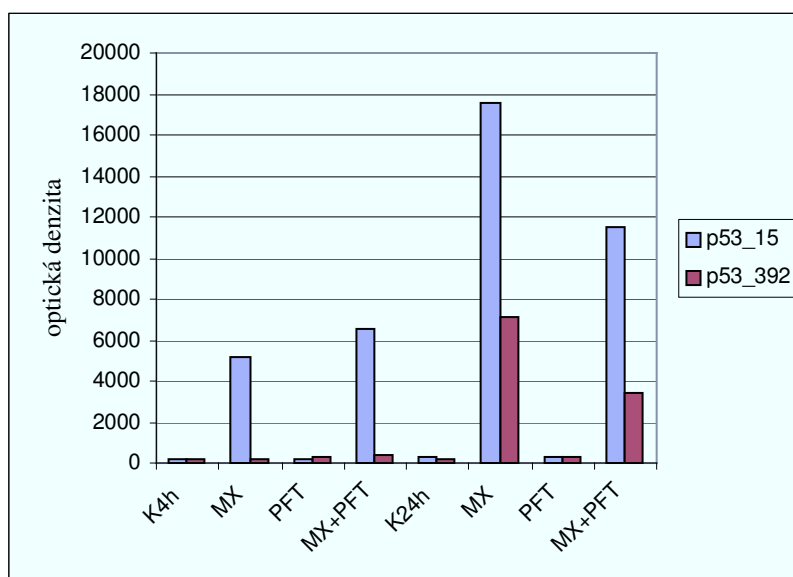
Ve skupinách vystavených působení samotného 0,5 nmol/l MX došlo k výraznému zvýšení množství proteinu p53 oproti kontrolním buňkám, a to již za 4 hodiny inkubace s MX. Tento vzestup je ještě více patrný v intervalu 24 hodin po ovlivnění.

V intervalu 4 hodiny po nasazení pokusu mají buňky vystavené vlivu kombinace 0,5 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  významně nižší množství proteinu než skupina buněk s 0,5 nmol/l MX. V intervalu 4 hodiny tedy PFT- $\alpha$  snižuje množství proteinu p53 indukovaného v buňkách 0,5 nmol/l MX.

Ve skupinách pro 0,5 nmol/l MX a 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  po 24 hodinách působení již není významný rozdíl v množství exprimovaného proteinu p53. Toto zjištění koreluje s výsledky z analýz apoptózy (viz kap. 4.2) a tj., že množství apoptických buněk po působení 0,5 nmol/l MX a kombinace 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  je prakticky stejné, a celkově (Obr. 12) je pozorován významně vyšší podíl mrtvých buněk ve skupině 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$ .

#### 4.4.2 Posttranslační modifikace proteinu p53

Posttranslační modifikace mají významný vliv na stabilitu a transkripční aktivitu proteinu p53. Proto jsme analyzovali i míru fosforylace důležitých serinů proteinu p53, Ser15 a Ser392, po působení zkoumaného cytostatika a PFT- $\alpha$ .



**Obr. 23.** Integrovaná optická denzita v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění.

Fosforylace proteinu p53 na Ser15 a Ser392.

Fosforylace Ser15 (p53<sub>15</sub>) na N-konci proteinu p53, při odpovědi na působení ionizujícího záření nebo chemických látek, zabraňuje degradaci p53 prostřednictvím MDM2 a stabilizuje jej v jádře (*Lavin a Gueven, 2006; Shieh et al., 1997; Yap et al., 2004*).

Fosforylaci Ser15 jsme prokázali u skupin ovlivněných 0,5 nmol/l MX a kombinací 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  v obou časových intervalech (Obr. 20b a 23), a to ve srovnatelné míře. Přestože tedy celková hladina MX-indukovaného p53 je 4 hodiny po ovlivnění nižší v přítomnosti PFT- $\alpha$ , není tento pokles způsoben inhibicí fosforylace serinu 15.

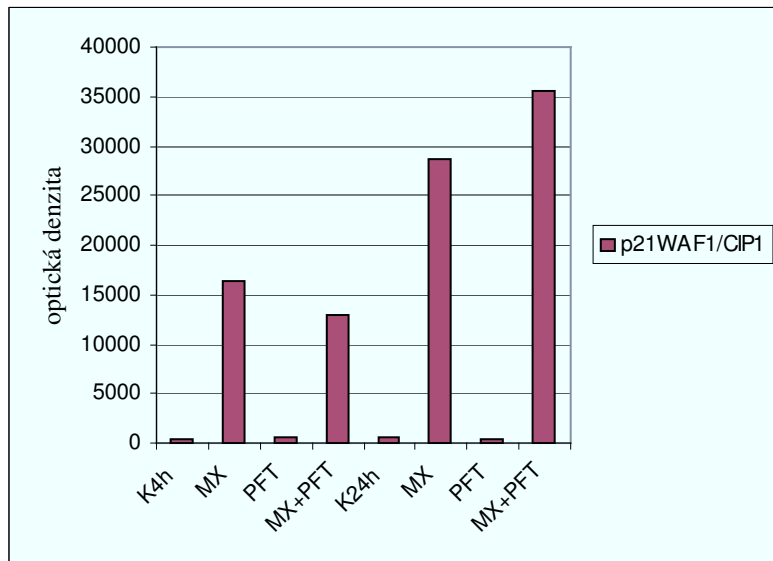
Pro indukci p53 cílových genů je důležitá nejen hladina tohoto proteinu, ale i jeho transkripční aktivita. Schopnost proteinu p53 vázat se ke specifickým úsekům DNA a působit jako transkripční faktor je výrazně ovlivněna fosforylací C-koncového Ser392 (p53<sub>392</sub>) komplexem, který obsahuje kasein-kinasu II (*Yap et al., 2004*).

K dobře detekovatelné fosforylaci Ser392 u buněk MOLT-4 došlo až v intervalu 24 hodin po ovlivnění ve skupinách, které byly vystaveny působení 0,5 nmol/l MX a kombinace 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$ . V tomto intervalu jsme prokázali stejný trend jako u fosforylace Ser15. V ostatních skupinách nebyla hladina fosforylovaného proteinu p53 na Ser 392 prokazatelná.

#### 4.4.3 Exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

Funkčnost indukovaného p53 jsme posuzovali na základě exprese CDK inhibitoru p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Transkripce genu kódujícího protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup> je dána působením proteinu p53 jako transkripčního faktoru a ve svém důsledku způsobuje zástavu buněčného cyklu v G1 fázi (*Pospíšilová a Vojtěšek, 2000; Bai a Zhu, 2006*).

Existují však další mechanismy zodpovědné za indukci exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, které jsou na proteinu p53 nezávislé. Na proteinu p53 nezávislá exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> může být vyvolána řadou chemických látek. Např. doxorubicin, chemoterapeutikum, které vyvolává apoptózu a indukci genu WAF1/CIP1 p53 závislým způsobem, je ve skutečnosti schopný také ve vyšších dávkách indukovat WAF1/CIP1 v buňkách, které nemají funkční protein p53 (*Michieli et al., 1994*).



**Obr. 24.** Integrovaná optická denzita v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění. Exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>.

Na obrázku 21a je zachycena exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Detekovatelná exprese se projevila ve skupinách pro 0,5 nmol/l MX a 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  v intervalu 4 i 24 hodin (Obr. 24).

Ve skupinách vystavených působení 0,5 nmol/l MX a 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  po dobu 4 hodiny nebyla prokazatelná hladina fosforylovaného proteinu p53 na Ser 392 (Obr. 20c a 23), hladina p53 však byla zvýšená a již v těchto skupinách jsme detekovali zvýšené množství proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> v porovnání s kontrolní skupinou.

V intervalu 24 hodin po ovlivnění je exprese p21<sup>WAF1/CIP1</sup> detekována opět po působení 0,5 nmol/l MX a 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  a koreluje s fosforylací Ser392, která stabilizuje působení proteinu p53 jako transkripčního faktoru.

Walton et al. (2005) podobně prokazují, že u buněk exprimujících p53 wild-*typ*, A2780 a HCT116, PFT- $\alpha$  nedokáže zabránit indukci p21 UV zářením. UV záření však na rozdíl od MX indukuje převážně jednovláknové zlomy DNA. Existuje tedy dvojí možné zdůvodnění pozorovaného jevu: Exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ve skupinách pro kombinaci 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$ , který je inhibítoem funkce proteinu p53, a skutečnost, že jsme v intervalu 4 hodiny detekovali zvýšené množství proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ve skupinách, ve kterých nebyla prokazatelná hladina fosforylovaného proteinu p53 na Ser 392, by mohly za daných podmínek MX řadit mezi látky působící jak p53 závislou tak p53 nezávislou cestou, nebo jak naznačují Walton et al. (2005) nedokáže PFT- $\alpha$  zcela potlačit transkripční

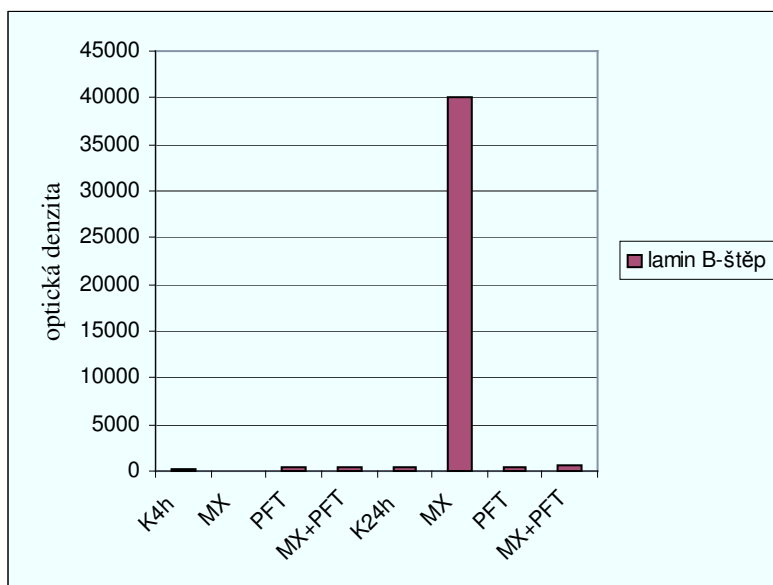
aktivitu p53, eventuelně jde o kombinaci obou jevů. Z našich výsledků se jeví, že PFT- $\alpha$  snižuje u buněk MOLT-4 indukci p53 a následnou indukci p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 0,5 nmol/l mitoxantronem pouze v časném intervalu (4 hodiny), v pozdější fázi převáží potenciace cytotoxického působení MX, provázená již srovnatelným vzestupem p53 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>.

#### 4.4.4 Exprese ERK 1/2

V souvislosti s aktivací signálních cest podporujících přežití a proliferaci buněk jsme analyzovali expresi ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase), také označované jako mitogeny aktivovaná proteinkinasa p44/p42MAPK (mitogen-activated protein kinase). ERK1/2 je nejlépe charakterizovanou MAPK. MAPK, kaskáda proteinkinás, má významnou roli v signální transdukci a je aktivována jako odpověď na řadu růstových faktorů a dalších signálních molekul. Nejlépe poznanými isoformami proteinu ERK jsou ERK1 ( $M_r$  44 kDa) a ERK2 ( $M_r$  42 kDa). ERK1/2 patří do proteinové rodiny serin-threoninových kinás a jsou důležité v signalizaci buněčné proliferace na podnět růstových faktorů (*Ortiz et al., 1995; Masopust a Průša, 2003*). Zjistili jsme, že nedochází k významným změnám hladiny tohoto proteinu u žádné skupiny sledovaných buněk (Obr. 21b).

#### 4.2.4 Epresa laminu B

Štěpení laminu B patří k metodám detekující apoptózu. Lamin B je strukturní protein o velikosti 68 kDa, který se nachází v blízkosti jaderné membrány. Proteolytické štěpení laminu v důsledku působení různých stresových stimulů je odpovědné za kondenzaci chromatinu v apoptických buňkách a bylo popsáno u různých buněčných linií. Při aktivaci apoptických drah v buňce se lamin B štěpí kaspasami na fragmenty o několika různých velikostech, v našem případě na fragment o velikosti 26 kDa.



**Obr. 25.** Integrovaná optická denzita v intervalu 4 a 24 hodin po ovlivnění. Štěp laminu B.

V buňkách, které byly 24 hodin vystaveny působení 0,5 nmol/l MX, dochází ke spuštění apoptotického procesu, k aktivaci kaspas a vzniku odpovídajícího štěpu laminu B (Obr. 21c a 25). K rozvoji apoptózy dochází i u skupiny pro kombinaci 0,5 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  (viz kap. 4.2), avšak fragmenty laminu B zde nebyly detekovány. Nepřítomný fragment by mohl naznačovat, že působení 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  může u buněk MOLT-4 vyústit v buněčnou smrt indukovanou nezávisle na kaspasách.

## 5 Závěr

Náplní této práce bylo studium molekulárních změn vyvolaných mitoxantronem (MX) a inhibítorem proteinu p53, pifithrinem- $\alpha$  (PFT- $\alpha$ ). Zabývali jsme se podrobněji efektem PFT- $\alpha$  na protinádorové působení MX. K tomuto účelu byly použity metodické přístupy, jako jsou SDS-elektroforéza, Western blotting s následnou imunodetekcí a flow-cytometrie. Pracovali jsme na lidské leukemické T-lymfocytární buněčné linii MOLT-4 mající funkční protein p53.

V první fázi výzkumu jsme u buněčné linie MOLT-4 provedli studii závislosti proliferační aktivity na koncentraci MX. Buňky jsme rozdělili do skupin, které jsem vystavili působení různých koncentrací MX (0,1 nmol/l; 0,2 nmol/l; 0,5 nmol/l; 0,7 nmol/l; 1 nmol/l; 10 nmol/l). V intervalech 24, 28, 72, 96 a 168 hodin po ovlivnění jsme stanovili viabilitu a schopnost proliferace buněk. MX způsobil ve všech testovaných skupinách inhibici proliferace, která se prohlubuje se zvyšující se koncentrací MX a délkou jeho působení. Nejnižší pokles schopnosti proliferace buněk se projevil u 0,1 nmol/l MX. V intervalu 96-168 hodin se v této skupině výrazně zvýšila procenta životaschopných buněk. 0,2 nmol/l MX působil na buňky MOLT-4 spíše cytostaticky. Koncentrace v rozmezí 0,5-10 nmol/l MX byly pro buňky 168 hodin po ovlivnění letální. 0,1 nmol/l a 0,5 nmol/l MX jsme vybrali pro další experimenty.

Zvolené koncentrace MX jsme následně použili pro studium efektu PFT- $\alpha$  na jeho protinádorové působení. Pomocí sledování proliferační aktivity v intervalech 24 a 72 hodin po ovlivnění jsme zjistili, že 20  $\mu$ mol/l PFT- $\alpha$  ve srovnání s kontrolou snižuje proliferační schopnost a zvyšuje procento mrtvých buněk. Ve skupinách, které jsme vystavili působení kombinací MX s PFT- $\alpha$ , jsme pozorovali vyšší inhibici proliferace a pokles viability, než ve skupinách ovlivněných samotným MX. V intervalu 72 hodin je 0,5 nmol/l MX i jeho kombinace s PFT- $\alpha$  pro buňky MOLT-4 zcela letální.

V dalších pokusech jsme se zaměřili na zjištění množství apoptických buněk a detekci obsahu DNA v buňce. Výsledky duálního značení Annexinem V a PI, analýzy AnnexinV-FITC/Events a Side-scatter/objem potvrdily, že PFT- $\alpha$  sám vzhledem kontrole zvyšuje množství apoptických buněk, zejména časně apoptických, a v kombinaci s MX potencuje jeho účinek. Při analýze obsahu DNA jsme potvrdili MX indukovaný blok buněk v G2/M fázi, který není ovlivněn PFT- $\alpha$ . Za předpokladu, že PFT- $\alpha$  inhibuje funkci proteinu p53, zdá se být indukce zástavy cyklu v G2/M fázi na proteinu p53 nezávislá.



Následně jsme studovali expresi a posttranslační modifikace proteinu p53 a dalších proteinů podílejících se na rozvoji apoptózy a na regulaci buněčného cyklu (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ERK, lamin B). V intervalu 4 hodiny snižuje PFT- $\alpha$  množství proteinu p53 indukovaného v buňkách 0,5 nmol/l MX. Zároveň jsme pro tento interval detekovali v kombinaci 0,5 nmol/l MX a PFT- $\alpha$  inhibici exprese proteinu p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, který je po poškození DNA primárním zprostředkovatelem na proteinu p53 závislého zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Pro daný časový interval a koncentraci MX se PFT- $\alpha$  skutečně jeví jako inhibitor proteinu p53. Ve skupinách pro 0,5 nmol/l MX a 0,5 nmol/l MX v kombinaci s PFT- $\alpha$  po 24 hodinách působení není významný rozdíl v množství exprimovaného proteinu p53 ani p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, což velmi dobře koreluje se zjištěním, že množství apoptických buněk po působení 0,5 nmol/l MX a kombinace 0,5 nmol/l MX s PFT- $\alpha$  je v tomto intervalu prakticky stejné. I když dochází k apoptóze i ve skupině pro kombinaci 0,5 nmol/l MX a PFT- $\alpha$ , detekovali jsme štěp laminu B pouze po působení 0,5 nmol/l MX.

Souhrnně lze říct, že PFT- $\alpha$  snižuje u buněk MOLT-4 indukci p53 a následnou indukci p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 0,5 nmol/l MX pouze v časném intervalu (4 hodiny), v pozdější fázi převáží potenciace cytotoxického působení MX a indukce apoptózy, provázená již srovnatelným vzestupem p53 i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. MX indukovaná zástava buněčného cyklu v G2/M fázi není inhibicí p53 ovlivněna.

## 6 Seznam literatury

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.

Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K. Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):27886-92.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):255-60.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.

Bai L, Zhu WG. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J. Cancer Mol*. 2006;2(4):141-153.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.

Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5):421-9.

Bassi L, Carloni M, Fonti E, Palma de la Peña N, Meschini R, Palitti F. Pifithrin- $\alpha$  an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro. *Mutat Res*. 2002 Feb 20;499(2):163-76.

Bayascas JR, Yuste VJ, Benito E, Garcia-Fernández J, Comella JX. Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Evolutionary considerations for vertebrate caspases. *Cell Death Differ*. 2002 Oct;9(10):1078-89.

Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB. Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):597-608.

Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 Jan;39(11):615-47.

Böttger V, Böttger A, Garcia-Echeverria C, Ramos YF, van der Eb AJ, Jochemsen AG, Lane DP. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene*. 1999 Jan 7;18(1):189-99.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 ( Pt 1):1-16.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.

- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8590-607.
- Doctor KS, Reed JC, Godzik A, Bourne PE. The apoptosis database. *Cell Death Differ*. 2003 Jun;10(6):621-33.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Dec 29;266(3):699-717.
- Faulds D, Balfour JA, Chrisp P, Langtry HD. Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs*. 1991 Mar;41(3):400-49.
- Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*. 2000 Dec;10(6):649-55.
- Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, Reed JC, Kinoshita S, Nolan GP. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*. 1998 Apr;8(4):461-71.
- Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-1706s.
- Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J*. 2000 Nov 15;352 Pt 1:1-17.
- Cho SG, Choi EJ. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol*. 2002 Jan 31;35(1):24-7.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994 Jul 15;265(5170):346-55.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986 Mar 6-12;320(6057):84-5.
- Kaji A, Zhang Y, Nomura M, Bode AM, Ma WY, She QB, Dong Z. Pifithrin- $\alpha$  promotes p53-mediated apoptosis in JB6 cells. *Mol Carcinog*. 2003 Jul;37(3):138-48.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2001 Dec;11(12):526-34.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995 Nov 15;14(22):5579-88.

Klein C, Vassilev LT. Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer.* 2004 Oct 18;91(8):1415-9.

Klener P. Protinádorová chemoterapie. Galén (Praha), 1996. 614 s. ISBN: 80-85824-36-1.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* 1999 Sep 10;285(5434):1733-7.

Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jan;65(1):41-8.

Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV. p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15465-8.

Kotala V, Uldrijan S, Nenutil R, Vojtěšek B. Protein p53 a protinádorová terapie. *Klinická onkologie.* 2002; 15(3):98-101.

Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie.* Nucleus HK, 2004; 941 s. ISBN-10: 80-86225-50-X.

Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7644-55.

Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol.* 1986 May;6(5):1379-85.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):941-50.

Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):589-98.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):479-89.

Masopust, J. *Patobiochemie buňky.* Praha. UK. 2003.  
[http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141\\_1387.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1387.html)

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2794-804.

Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 1994 Jul 1;54(13):3391-5.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* 1998 Aug 1;26(15):3453-9.

Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001 Jul;488(3):211-31.

Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB. Pifithrin- $\alpha$  inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16;279(29):30195-201.

Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci.* 1995 Feb;15(2):1285-97.

Pospíšilová Š, Vojtěšek B. protein p21<sup>WAF1</sup> a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. *Klinická onkologie* 13, 13-16 (2000).

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol.* 1999 Jan;187(1):112-26.

Rocha S, Campbell KJ, Roche KC, Perkins ND. The p53-inhibitor pifithrin- $\alpha$  inhibits firefly luciferase activity in vivo and in vitro. *BMC Mol Biol.* 2003 Sep 11;4:9.

Řezáčová M. BIDOZO. Hradec Králové: LF UK, 2007.

Řezáčová M. Regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy u nádorových buněk. Hradec Králové: LF UK, 2004.

Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 1997 Aug 18;15(8):887-98. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):10964-7.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):528-37.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1541-8

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.

Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jul;31(7):402-10.

Singh NP. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):328-37.

Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999 Nov 1;18(45):6145-57.

Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg*. 1998 Nov;85(11):1460-7.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

Tichý A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2006;49(1):13-8.

Uldrijan S, Kotala V, Vojtěšek B. Regulace stability nádorového supresuru p53. *Chem. Listy* 96, 145-149 (2002).

van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 9;304(3):487-97.

Vávrová J, Stulík J, Mareková M, Vokurková D. Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. Učební texty Vojenské lékařské akademie Jana Evangelisty Purkyně v Hradci Králové, 2002; svazek 333; vydání 1.; 44 s. ISBN 80-85109-23-9.

Walton MI, Wilson SC, Hardcastle IR, Mirza AR, Workman P. An evaluation of the ability of pifithrin- $\alpha$  and - $\beta$  to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005 Sep;4(9):1369-77.

Walton MI, Wilson SC, Hardcastle IR, Mirza AR, Workman P. An evaluation of the ability of pifithrin- $\alpha$  and -beta to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005 Sep;4(9):1369-77.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980 Apr 10;284(5756):555-6.

Yap DB, Hsieh JK, Zhong S, Heath V, Gusterson B, Crook T, Lu X. Ser392 phosphorylation regulates the oncogenic function of mutant p53. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4749-54.

Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*. 2000 Sep;10(3):161-7.

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2(1):67-71.