

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

**Význam inhibice reparace radiačního poškození při indukci apoptózy**

**Bc. Kamila Ďurišová**

**Diplomová práce**

**2012**

**University of Pardubice**  
**Faculty of chemical technology**

**Inhibition of radiation-induced reparation during induction of  
apoptosis**

**Bc. Kamila Ďurišová**

**Diploma thesis**

**2012**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila Ďurišová**  
Osobní číslo: **C10907**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Význam inhibice reparace radiačního poškození při indukci apoptózy**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

- 1) Teoretická část:
  - a. Obecný úvod o účinku ionizujícího záření a poškození DNA
  - b. Rešerše zaměřená na reparační mechanismy, popsání rodiny PI-3 kináz, substráty, buněčná signalizace, indukce apoptózy
  - c. Rešerše zaměřená na možnosti inhibice reparačních enzymů, inhibitory DNA-PK
- 2) Praktická část:
  - a. Zvládnutí základních technik kultivace buněčných linií, příprava vzorků buněčnou lýzou, měření koncentrace celkového proteinu.
  - b. Zavedení SDS-PAGE jednorozměrné elektroforézy s následnou detekcí Western blottingem dle stávajících postupů. Optimalizace ředění nově zaváděných protilátek.
  - c. Zavedení detekce vybraných proteinů pomocí ELISA.
  - d. Zavedení detekce vybraných proteinů mikroskopicky.
  - e. Zhodnocení exprese a post-translačních modifikací substrátů ATM kinasy a DNA-dependentní protein kinasy a dalších proteinů analyzovaných imunodetekčními technikami.
  - f. Adekvátní statistické zpracování naměřených hodnot a vyvození, zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibice reparace radiačního poškození indukci apoptózy s ohledem na potenciaci účinku ionizujícího záření.


Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Aleš Tichý**  
Univerzita Obrany, FVZ, Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**  
Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 23. února 2011

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 04. 05. 2012

Bc. Kamila Ďurišová

## **Poděkování**

Děkuji prof RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. za možnost vypracování diplomové práce na Katedře Radiobiologie, Fakulty Vojenského Zdravotnictví v Hradci Králové. Dále školiteli PharmDr. Aleši Tichému, Ph.D. za odborné rady a připomínky týkající se této práce a v neposlední řadě také Bc. Lence Mervartové a dalším zaměstnancům Katedry Radiobiologie, kteří vytvářeli příjemné prostředí pro provedení praktické části diplomové práce.

## Souhrn

**CÍL:** V naší práci jsme se věnovali studiu účinku inhibitoru NU7441, který specificky inhibuje DNA-dependentní protein kinázu (DNA-PK). Zabývali jsme se jeho efektem na inhibici reparace dvouřetězcových zlomů DNA (DSBs) a indukcí apoptózy v kombinaci s ionizujícím zářením (IZ). Inhibitor jsme použili v koncentraci 1  $\mu\text{M}$  a záření o dávce 1 Gy. Dále jsme provedli doplňkové experimenty k předchozí studii s inhibitorem NU7026, který méně specificky inhibuje DNA-PK a také ATM-kinázu (ATM), ovšem za použití vyšší koncentrace (10  $\mu\text{M}$ ) a pokusili jsme se srovnat účinek obou inhibitorů.

**MATERIÁL A METODY:** Buňky T-lymfocytární leukemické buněčné linie MOLT-4 byly pro experimentální část práce rozděleny do čtyř skupin: kontrolní buňky, buňky ovlivněné inhibitorem NU7441 a v některých (doplňkových) pokusech inhibitorem NU7026, buňky ozářené dávkou 1 Gy a buňky ovlivněné kombinací obou nox. Využili jsme Western blotting a ELISA stanovení pro analýzu proteinů účastnících se reparace DNA a indukce apoptózy a epifluorescenční mikroskopii pro detekci kolokalizace proteinů  $\gamma\text{H2AX}$  a 53BP1; tzv. ložiska indukovaná IZ (ionizing radiation-induced foci; IRIF). Pro zhodnocení apoptózy jsme využili průtokovou cytometrii.

**VÝSLEDKY:** Nepozorovali jsme signifikantní změnu v množství DNA-PK podjednotek Ku70/80. Samotné ozáření vedlo k nárůstu exprese proteinu p53 a jeho fosforylací na pozicích Ser 392 a Ser 15. V důsledku toho byla zvýšena exprese proteinu p21. Pre-inkubace s NU7441 nevedla k inhibici fosforylace p53, jelikož je prováděna současně také ATM. Množství cdc25A mírně kleslo po použití kombinace nox. Inhibitor NU7026 v kombinaci s dávkou 1 Gy tlumil fosforylace některých substrátů ATM a DNA-PK, ovšem výsledná míra apoptózy byla vyšší po použití inhibitoru NU7441. Co se týče indukce apoptózy, tak kombinace IZ a NU7441 vedla ke snížení množství anti-apoptického proteinu Mcl-1 a štěpení poly (ADP-ribóza) polymerázy (PARP), což je známkou probíhající apoptózy. Množství pro-apoptického proteinu Bad kleslo mírně pouze za 72 hod po ozáření po použití kombinace. Detekovali jsme zvýšené množství apoptických buněk 24 i 72 hod po ozáření ve skupině buněk ovlivněných kombinací nox. Množství IRIF bylo také u kombinace zvýšeno.

ZÁVĚR: Kombinace IZ a inhibitoru DNA-PK NU7441 způsobila zvýšení DNA poškození a následně indukci buněčné smrti. Nevedla k snížení exprese proteinu p53, jeho fosforylovaných forem nebo proteinu p21. Došlo ale ke snížení anti-apoptického Mcl-1 a byla významně indukována apoptóza 72 hod po ozáření. Protože jej lze použít v nižších koncentracích než inhibitor NU7026 a vede k intenzivnějšímu pro-apoptickému účinku, hodnotíme inhibitor NU7441 jako perspektivní platformu pro vývoj dalších účinných protinádorových léčiv.

Klíčová slova: DNA-PK, ATM, dvojitě zlomy DNA, inhibitor NU7441, ionizující záření, apoptóza



## Summary

**BACKGROUND:** In this study we describe the effect of NU7441, a specific inhibitor of DNA-dependent protein kinases (DNA-PK), on molecular mechanisms of inhibition of double strand breaks (DSBs) repair and induction of apoptosis triggered by ionising radiation (IR). We studied the effect of pre-treatment with NU7441 (1 $\mu$ M) prior irradiation (1 Gy). We also conducted some complementary experiments to our previous study with inhibitor NU7026, which less specifically inhibits DNA-PK and also ATM-kinase (ATM), however at higher concentration (10  $\mu$ M) and we tried to mutually compare the effect of both inhibitors.

**METHODS:** The experimental design consisted of four groups: control, NU7441 treated, IR-treated, and combination. We used flow-cytometry for apoptosis assessment, Western-blotting and ELISA for detection of proteins involved in DNA repair signalling pathways and epifluorescence microscopy for detection of co-localisation of  $\gamma$ H2AX and 53BP1, i.e. ionising radiation-induced foci (IRIF).

**RESULTS:** We did not observe any significant changes in the amount of DNA-PK subunits Ku70/80. IR alone led to up-regulation of p53 and its phosphorylation at serine 15 and 392 (crucial for DNA-binding and its function as a tumour suppressor). This subsequently resulted in up-regulation of p21. However, the combination did not induce decrease, since phosphorylation of p53 can be performed also by ATM. The amount of cdc25A decreased slightly after combination of IR with NU7441 72 h after irradiation.

In the terms of cell death, combination of IR with NU7441 induced decrease in anti-apoptotic Mcl-1 and a significant hallmark of apoptosis - cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). The amount of pro-apoptotic Bad slightly decreased only 72 h after irradiation and pre-treatment with NU7026. We detected significant increase in apoptotic cells in the group with combination of NU7441 and IR also by flow-cytometry and combination led to substantial increase in the accumulation of IRIF.

**CONCLUSIONS:** Taken together, combination of DNA-PK inhibitor (NU7441) with IR causes accumulation of DNA damage and subsequent cell death. It does not lead to decrease in amount of p53 phosphorylation or p21, but to decrease in anti-apoptotic Mcl-1 and significantly induces apoptosis 72 h after irradiation. Since NU7441 can be used at lower concentration than NU7026 and it is capable of

intensive pro-apoptotic effect, we conclude that NU7441 could provide a perspective platform for development of radio-sensitizers in radiotherapy.

Key words: DNA-PK, ATM, DNA double-strand breaks, inhibitor NU7441, ionising radiation, apoptosis

## Seznam použitých zkratk

53BP1	p53-vazebný protein 1
AIF	apoptický indukční protein
APS	amonium persulfát
A-T	ataxia telangiectasia
ATM	ataxie-telangiektasie-mutovaná kináza
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiektasie a Rad3- příbuzná kináza
ATRIP	ATR interagující protein
BH	Bcl-2 homologní doména
CDK	cyklin dependentní kináza
CLL	chronická lymfocytární leukémie
cyt-c	cytochrom c
DED	efektorová doména smrti
DIABLO	direkt IAP binding protein with Low pI
DISC	smrt indukující signalizační komplex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní protein kináza
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy
DSBs	dvouřetězcové zlomy DNA
EDAR	ektodysplasin A receptor
ER	endoplazmatické retikulum
FADD	protein spojující Fas receptor s doménou smrti
FITC	fluorescein isothiokyanát
Gln	glutamin
Gy	Gray
HR	homologní rekombinace
HtrA2	Omi/high temperature requirement protein A
IAP <sub>s</sub>	inhibitor apoptických proteinů
IRIF	ložiska indukovaná ionizujícím zářením
IZ	ionizující záření
Lig IV	DNA ligáza IV

LMDS	lokální mnohonásobně poškozené oblasti
Mcl-1	protein myeloidní buněčné linie-1
Mdm2	murine double minute protein2
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 komplex
mTOR	mammalian target-of-rapamycin
NGFR	receptor nervového růstového faktoru
NHEJ	nehomologní spojování konců
NU7026	inhibitor DNA-PK (2-(morfolin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-on)
NU7441	inhibitor DNA-PK (8-dibenzothiophen-4-yl-2-morpholin-4-yl-chromen-4-on)
p53	protein kódovaný tumor-supresorovým genem TP53
PARP	poly (ADP –ribóza) polymeráza
PBS	fosfátový pufr v médiu fyziologického roztoku (pH 7,4)
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PIKK <sub>5</sub>	fosfatidylinositol 3-kináza příbuzné protein kinázy
PIP <sub>3</sub>	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
RPA	replikační protein A
SDS	dodecylsírán sodný
Ser	serin
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SSBs	jednořetězcové zlomy DNA
ssDNA	jednořetězcová DNA
TBS	Tris-HCl pufr (pH 7,6)
TBS/T	Tris-HCl pufr s 0,05% Tweenem 20
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylendiamin
Thr	threonin
TNFR1	TNF receptor I
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
TOPBP1	topoizomeráza vázající protein 1
TRADD	protein spojující TNF receptor s doménou smrti
TRAF2	adaptor protein TNF receptor associated faktor 2
wt	wild type
$\gamma$ H2A.X	histon H2A.X fosforylovaný na Ser <sup>139</sup>

# Obsah

<b>1</b>	<b>Předmluva .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>18</b>
2.1	Ionizující záření .....	18
2.2	Poškození DNA – vznik dvouřetězcových zlomů DNA .....	19
2.3	Rodina PI3-K.....	20
2.3.1	ATM kináza a její substráty .....	21
2.3.2	ATR.....	24
2.3.3	DNA-PK.....	25
2.4	Cesty reparace DNA .....	27
2.4.1	Nehomologní spojování konců.....	27
2.4.2	Homologní rekombinace .....	29
2.5	Inhibitory .....	31
2.5.1	Inhibitor NU7441 .....	31
2.5.2	Inhibitor NU7026 .....	32
2.6	Apoptóza.....	33
2.6.1	Vnější cesta apoptózy .....	33
2.6.2	Vnitřní cesta apoptózy .....	35
<b>3</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>38</b>
4.1	Materiál a metody .....	38
4.1.1	Buněčné kultury a kultivační podmínky.....	38
4.1.2	Gama ozáření a přidání inhibitoru.....	38
4.1.3	Lýza buněk .....	39
4.1.4	Stanovení celkové bílkoviny .....	40
4.1.5	Elektroforéza .....	40

4.1.6	Western blotting .....	42
4.1.7	Stripping .....	43
4.1.8	ELISA.....	44
4.1.9	APOPTTEST .....	45
4.1.10	Epifluorescenční mikroskopie .....	46
4.2	Chemikálie a roztoky .....	47
4.2.1	Roztoky použité při stanovení celkové bílkoviny .....	47
4.2.2	Roztoky použité pro lýzu buněk.....	47
4.2.3	Roztoky použité při elektroforéze .....	48
4.2.4	Roztoky použité při Western blottingu.....	49
4.2.5	Roztoky použité při strippingu .....	50
4.2.6	Roztoky použité při ELISE .....	51
4.2.7	Roztoky použité při APOPTTESTU.....	51
4.2.8	Roztoky použité při epifluorescenční mikroskopii.....	51
4.3	Přístrojové vybavení .....	52
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>53</b>
5.1	Stanovení celkové bílkoviny.....	53
5.2	Viabilita buněk MOLT-4 .....	54
5.3	Vliv záření a inhibitoru NU7026 na expresi Mcl-1, Laminu B a Akt-kinázy .....	56
5.4	Vliv záření a inhibitoru NU7441 na expresi proteinů spojených s reparací DNA a indukci apoptózy .....	57
5.4.1	Metoda Western blotting .....	57
5.4.2	Metoda ELISA.....	60
5.4.3	Metoda průtokové cytometrie.....	63
5.4.4	Metoda epifluorescenční mikroskopie .....	69
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>79</b>

<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>81</b>
----------	---------------------------------------	-----------

# 1 Předmluva

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí nejen v ČR ale i ve světě. Proto se význam studií zaměřených na objasnění molekulárních mechanismů v nádorových buňkách neustále zvyšuje. Podle American Cancer Society je chronická lymfocytární leukémie (CLL) nejběžnější formou leukémie západního světa, čítající jenom v USA zhruba 12 000 nových případů a prevalenci 50 000 až 60 000 pacientů ročně. CLL je typickým příkladem lidské malignity způsobené zejména defektní apoptózou a naproti tomu akcelerovaným buněčným dělením; proliferací.

V radioterapii nádorových onemocnění se často využívá nejen efektu samotného záření, ale i kombinace s látkami, které mají schopnost potencovat cytotoxický efekt ionizujícího záření (IZ). Jednou z možností, jak toho dosáhnout, je zablokovat klíčové enzymy (kinázy) regulující reparaci poškození DNA a nádorové buňky eradikovat. Novým přístupem v této oblasti je například chemická inhibice specifickými inhibitory na bázi malých molekul jako je 2-morfolin-4-yl-chromen-4-on, jehož funkční deriváty jsme použili i v této práci.

Porozumění reparačním dějům na molekulární úrovni, sledování exprese proteinů účastnících se zástavy buněčného cyklu či určení způsobu, jakým zmíněné inhibitory indukují apoptózu v lidských nádorových buňkách, může nabídnout nové strategie a racionální přístupy v kombinované terapii nádorů.

Cílem této studie proto bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňuje inhibice reparačních procesů DNA u leukemických buněk indukci apoptózy, stanovit její přesnou míru, zjistit na jaké proteiny má inhibice vliv, vzájemně porovnat účinek inhibitorů NU7026 a NU7441 a zhodnotit jejich možné využití pro radio-sensibilizaci. K posouzení současného vlivu záření a inhibitoru byly buňky vystaveny oběma noxám. U inhibitoru NU7026 se jednalo o doplňkové experimenty k pokusům prováděným v rámci diplomové práce Mgr. Radky Sedlaříkové. Těžiště předkládané diplomové práce však spočívá v experimentech s inhibitorem NU7441.

Jako modelovou buněčnou linii jsme použili buňky MOLT-4 s funkčním proteinem p53, které jsou odvozeny od lidské T-buněčné leukémie, nesoucí imunofenotypické charakteristiky thymocytů s expresí CD1<sup>+</sup> 49 %, CD4<sup>+</sup> 55 %, CD5<sup>+</sup>



72 % a CD7<sup>+</sup> 77 % a jsou vhodným modelem pro studium molekulárních mechanismů zářením indukované apoptózy u T-lymfocytů. [22]

Obecně lze říci, že indukce apoptózy u buněk MOLT-4 (p53-*wild type*; wt) po expozici dávkám do 10 Gy je rychlejší než u buněk, které jsou p53-negativní. Buňky MOLT-4 po expozici zářením umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou a jsou relativně radiosenzitivní.[72]. Při testování klonogenity MOLT-4 byla určena hodnota D<sub>0</sub> jako 0,87 Gy (dávka snižující počet přežívajících buněk na 37 %).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Ionizující záření

Nejčastějším typem IZ, se kterým se setkáváme, je záření gama ( $\gamma$ ). Zdrojem záření  $\gamma$  mohou být radionuklidy beta, méně často alfa, jejichž přeměna vede ke vzbuzeným stavům dceřiného jádra. Absorpce energie záření ve hmotě má kvantový charakter. Nejčastěji dochází k excitacím a ionizacím atomů a molekul. Pro některé druhy záření mohou nastat primárně i jiné jevy např. u  $\gamma$  záření Comptonův jev nebo materializace fotonů. Sekundárně vzniklé částice ztrácí nabytou energii také excitacemi a ionizacemi.[36]

Biologický účinek IZ je zprostředkován absorpcí energie fotonu, resp. částice v živém organismu. Ta se mění v jiné formy energie např. v kinetickou energii elektronů. Po tomto fyzikálním procesu probíhají další fyzikálně-chemické děje. Důsledkem jsou chemické a biologické změny důležitých makromolekul organismu; zejména DNA.[71]

IZ působí na živé organismy dvojitým účinkem. Přímý účinek nastává při bezprostředním přenesení energie záření v kvantech a biologický účinek závisí na zasažení citlivé struktury buňky; tedy DNA. Při nepřímém účinku místem chemické reakce není místo počáteční primární absorpce energie, ale dochází k přenosu energie v rámci molekuly a mezi molekulami. Nepřímý účinek pozorujeme např. při absorpci energie záření vodou u biologických systémů. Radiolýzou vody vznikají nebezpečné radikály: hydroxylový, vodíkový a peroxid vodíku, které reagují s biologickými molekulami. Čím je koncentrace biologicky významných molekul v organismu menší, tím je nepřímý účinek uplatněn ve větší míře.[18,36]

Citlivost buněk vůči přímým a nepřímým účinkům IZ se liší v průběhu buněčného cyklu. Nejcitlivější fází buněčného cyklu je mitóza. Dávky řádově v cGy mohou vyvolat genové nebo chromozomové mutace. Nejsou-li opraveny, může dojít k maligní transformaci buňky.[71]

IZ způsobuje široké spektrum chemicky odlišných typů lézí DNA. Biologicky nejdůležitějšími jsou lokální mnohonásobně poškozené oblasti (LMDS). K LMDS řadíme dvouřetězcové (DSBs) a jednořetězcové zlomy DNA (SSBs). Pokud vzniknou SSBs na opačných řetězcích dvoušroubovice DNA blízko sebe, mohou se snadno vyvinout v DSBs. Další LMDS zahrnují chemickou modifikaci bazí a cukrů. Tyto léze mohou také spět ke vzniku DSBs.[52] Běžné poškození báze neupravuje

strukturu DNA molekuly a cukr-fosfátová kostra je dostupná pro opravu. Cukerné léze narušují cukr-fosfátovou kostru a vytváří SSBs. Jejich souběžný výskyt na protilehlém řetězci v rámci jednoho helikálního otočení pak vede ke vzniku DSBs.[60]

DSBs indukované IZ mohou vzniknout přímo jako následek jednoho nebo více ozáření nebo nepřímo jako následek reparačních procesů, které mají eliminovat bazické nebo cukerné poškození nacházející se v těsné blízkosti na protilehlých řetězcích.[52] K poškození patří i cross-linky neboli příčné spoje uvnitř DNA a lokální denaturace. S rostoucí hustotou ionizace záření klesá výskyt SSBs a stoupá výskyt DSBs. Zlomy DNA mohou vést ke chromozomovým aberacím. V interfázovém jádře lze nejčastěji pozorovat translokace a fragmenty chromozomů. V mitóze pozorujeme chromozomové i chromatidové aberace. Nejčastějšími typy poškození jsou: zlomy chromozomů, interchromozomové a intrachromozomové výměny (dicentrické aberace, translokace, inverze). Chromozomové aberace jsou považovány za jednu z hlavních příčin letálních, ale i kancerogenních účinků záření.[36]

## **2.2 Poškození DNA – vznik dvouřetězcových zlomů DNA**

DSBs jsou typem poškození DNA, které vede k závažným následkům v buňce, pokud nejsou opraveny. Nedostatečná nebo nepřesná oprava může vést k mutacím, genomické nestabilitě a vzniku již zmíněných chromozomálních aberací.[27,52]

DSBs jsou výsledkem působení exogenních faktorů, jako jsou např. IZ, chemoterapeutika nebo endogenních faktorů, jako jsou reaktivní formy kyslíku.[33] Kromě škodlivých faktorů se DSBs mohou objevit i spontánně jako součást fyziologických dějů. Spontánní DSBs mohou vzniknout v jakémkoliv stádiu buněčného cyklu: v buňkách v nedělicím se stavu, během DNA replikace, meiózy nebo jako intermediáty během V(D)J rekombinace při vývoji lymfoidních buněk.[27] Za přirozený výskyt DSBs jsou zodpovědné i enzymy topoizomerázy.[52]

DSBs se vytváří, pokud jsou oba komplementární řetězce dvojité šroubovice DNA zlomeny souběžně v oblastech dostatečně blízko sebe a schopnost bazického párování nebo chromatinová struktura nedostačují k udržení DNA konců u sebe. Následkem jsou dva DNA konce náchylné k odloučení jednoho od druhého. Oprava DNA se tak stává složitou a může dojít k nesprávné rekombinaci s jinými úseky v genomu.[27]

Nejčastěji používaná noxa k vyvolání zlomů je IZ. Vystavení buněčných struktur energii záření (X a gama paprskům) vede během několika mikrosekund k fotonové absorpci a chemickým změnám v buňce, jak již bylo zmíněno.[52]

Dělicí se buňky odpovídají na DSBs zpomalením buněčného cyklu. Pokud se poškození vyskytne v G1 nebo S-fázi, vstup do S-fáze je pozastaven nebo jí buňka prochází pomalu, aby poskytla čas k opravě poškozené DNA. Buňka v G2-fázi se brání vstupu do mitózy a chybnému oddělení chromozomálních fragmentů během cytokineze.[27]

Buňka signalizuje přítomnost DSBs pomocí signální kaskádní dráhy. Poškození DNA je signálem pro proteiny vážící se do oblasti DNA poškození, které pak spouští systém proteinkináz, jež amplifikují signál a dále ho šíří pomocí efektorů odpovídajících na DNA poškození. Jednou z buněčných odpovědí je aktivace reparačních proteinů DNA a jejich přesun do místa poškození.[27]

### **2.3 Rodina PI3-K**

Fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) jsou enzymy fungující jako lipidové a proteinové kinázy, které regulují několik biologických procesů např. přežívání, proliferaci, metabolismus a migraci. PI3K fosforylují fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na třetí pozici inositolu za vzniku fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu (PIP<sub>3</sub>).[12]

PI3K se rozděluje do čtyř skupin: I, II, III a IV. Klasifikace je založena na primární struktuře, katalytických a regulačních podjednotkách spojujících se v heterodimery. Dalším kritériem je jejich substrátová specifita.

Třída I je prostudována nejvíce a dále se rozděluje na: PI3K-IA a PI3K-IB. Jedná se o heterodimerické enzymy skládající se z regulační/adaptorové podjednotky spojené s katalytickou podjednotkou zvanou p110. Třída IA je složena z p110 $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\delta$ - katalytické podjednotky spojené s p85 rodinou adaptorových proteinů.[12] Třída IB se skládá z heterodimerů tvořených p110 $\gamma$  katalytickou podjednotkou a regulační podjednotkou p101 nebo p84.[19,6]

Třída II je na rozdíl od třídy I a III tvořena monomery vytvářejícími 3 katalytické izoformy (C2 $\alpha$ , C2 $\beta$ , a C2 $\gamma$ ) bez regulačních podjednotek. C2 $\alpha$  a C2 $\beta$  jsou exprimovány ve všech buňkách; C2 $\gamma$  pouze v hepatocytech. Třída II se účastní membránového transportu.[17]

Třída III je podobná třídě I. Enzymy se skládají z regulační (p150) a katalytické (Vps34) podjednotky. Fungují v regulaci membránového transportu proteinů a vezikul. [17]

PI3K patřící do skupiny IV jsou známé jako kinázy příbuzné fosfatidylinositol-3 kináze (phosphatidylinositol-3 kinase related kinases: PIKKs). Skupina zahrnuje ATM, ATR, DNA-PK a mTOR. Členové této skupiny jsou serin/threoninové kinázy.[58] Jsou rychle aktivovány v případě DNA poškození. ATM a DNA-PK odpovídají hlavně na DSBs, zatímco ATR je aktivována SSBs a zástavou replikační vidličky.[17] Dále hrají roli v procesu rozvoje nádorových onemocnění.

### **2.3.1 ATM kináza a její substráty**

Ataxia telangiectasia (A-T) je vzácné, pleiotropní, autozomálně recesivní onemocnění charakterizované progresivní neurologickou degenerací, růstovou retardací, předčasným stárnutím, specifickými imunodeficiencemi, atrofií gonád, genomickou nestabilitou, defektivním metabolismem telomer a zvýšenou predispozicí k vývinu rakoviny. Buňky odvozené od A-T vykazují hypersenzitivitu k IZ, cytoskeletální defekty, vyšší požadavky na sérové faktory. Gen mutovaný u onemocnění A-T byl nazván ATM (A-T mutated).[50]

ATM kóduje proteinovou kinázu o velikosti 370 kDa.[1] V nepoškozených buňkách tvoří neaktivní dimer nebo multimer. Vznik DSBs vyvolá relaxaci chromatinové struktury, což vede k intermolekulární fosforylaci ATM na Ser 1981. Autofosforylace ATM způsobí rozpad dimeru na aktivní monomer. Následuje fosforylace na Ser 367 a Ser 1893.[68]

Na indukci ATM kinázové aktivity se podílí také MRN komplex složený z proteinů Mre11, Nbs1 a Rad50. Konzervativní C terminální doména Nbs1 je nezbytná pro navázání ATM k MRN komplexu a pro úspěšnou aktivaci ATM.[62] Nbs1 slouží k přenesení aktivované ATM na postižené místo a podporuje tak fosforylaci dalších molekul pomocí ATM.[17] MRN komplex je schopen vázat DNA bez účasti aktivní ATM. Je tedy senzorem pro DSBs. Rad50 z MRN komplexu funguje jako protektivní chromozomální faktor. Brání rychlému zkracování telomer a spojování konců sesterských chromatid. Proteiny MRN komplexu regulují sebe navzájem. Nbs1 přitahuje Mre11 do jádra, zatímco Mre11 zvyšuje stabilitu Nbs1. Mre11 vykazuje specifickou endonukleázovou aktivitu k DNA v DSBs a naopak Rad50 jeho endonukleázovou aktivitu inhibuje.[70]

ATM fosforyluje mnoho proteinů souvisejících s regulací kontrolních bodů buněčného cyklu, opravami DSBs a apoptózou. Fosforylace těchto proteinů je významná pro jejich správnou aktivaci.[62]

Mezi tyto proteiny patří: Brca1, p95/Nbs1, p53, mdm2, Chk1, Chk2, Rad17, Blm, Smc1, 53BP1 a Mdc1.[68,1]

ATM reguluje kontrolní body buněčného cyklu. V kontrolním bodě S-fáze Chk2 (která je aktivována ATM) fosforyluje cdc25A fosfatázu, což vyústí ve vazbu s 14-3-3 proteinem a její následnou degradaci.[66] Proteinkináza Chk2 je fosforylována a aktivována v odpovědi na DNA poškození IZ, UV radiací a zastavení replikace hydroxymočovinou. Fosforylace Chk2 je ATM-dependентní po ozáření IZ, zatímco po expozici UV záření nebo hydroxymočoviny nikoliv. ATM fosforyluje Ser-Gln/Thr-Gln (SQ/TQ) oblasti. Chk2 obsahuje devět SQ/TQ oblastí. Sedm z nich je lokalizováno na N konci a dvě jsou v její kinázové doméně. Thr 68 je hlavní in vitro fosforylací.[40] Chk2 se skládá ze tří domén: doména bohatá na SQ/TQ motivy, tzv. hlavová (head-associated) doména a kinázová doména. Chk2 také fosforyluje produkt genu BRCA1.[1]

ATM se rovněž podílí na regulaci G2/M kontrolního bodu, který je nezbytný pro úspěšnou opravu poškození u buněk ozářených v G2-fázi. Procesy v tomto kontrolním bodě jsou Chk1/Chk2-dependентní; jejich aktivní forma může inhibovat cdc25C fosfatázu.[66] In vitro Chk2 fosforyluje cdc25C na Ser 216.[40] Cdc25C fosfatáza je důležitá pro aktivaci dalších proteinů: cyklinu B1 a cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) a pro progresi buněčného cyklu.[50]

G1/S kontrolního bodu se ATM účastní ve spolupráci s proteiny p53, Chk2 a mdm2. Poslední dvě molekuly jsou p53-dependентní a rozhodují o jeho stabilitě a aktivitě.[66] ATM reguluje transkripční aktivitu p53 přímo přes fosforylaci Ser 15 a nepřímo, kdy podporuje stabilitu p53 přes fosforylaci proteinů Chk2 a mdm2.[51] Tumorový supresor p53 je v normálních buňkách přítomen v latentní formě s nízkou afinitou ke specifickým sekvencím DNA, ale po genotoxickém stresu se jeho aktivita zvyšuje.[66] Aktivace p53 je doprovázena zvýšením jeho množství i transkripční aktivity. Při zvýšení hladiny p53 se uplatňuje jeho snížená degradace a fosforylace na Ser 20.[40] Po aktivaci p53 rozhoduje o osudu buňky. Tento protein je schopný iniciovat zastavení buněčného cyklu, stárnutí i apoptózu.[66]

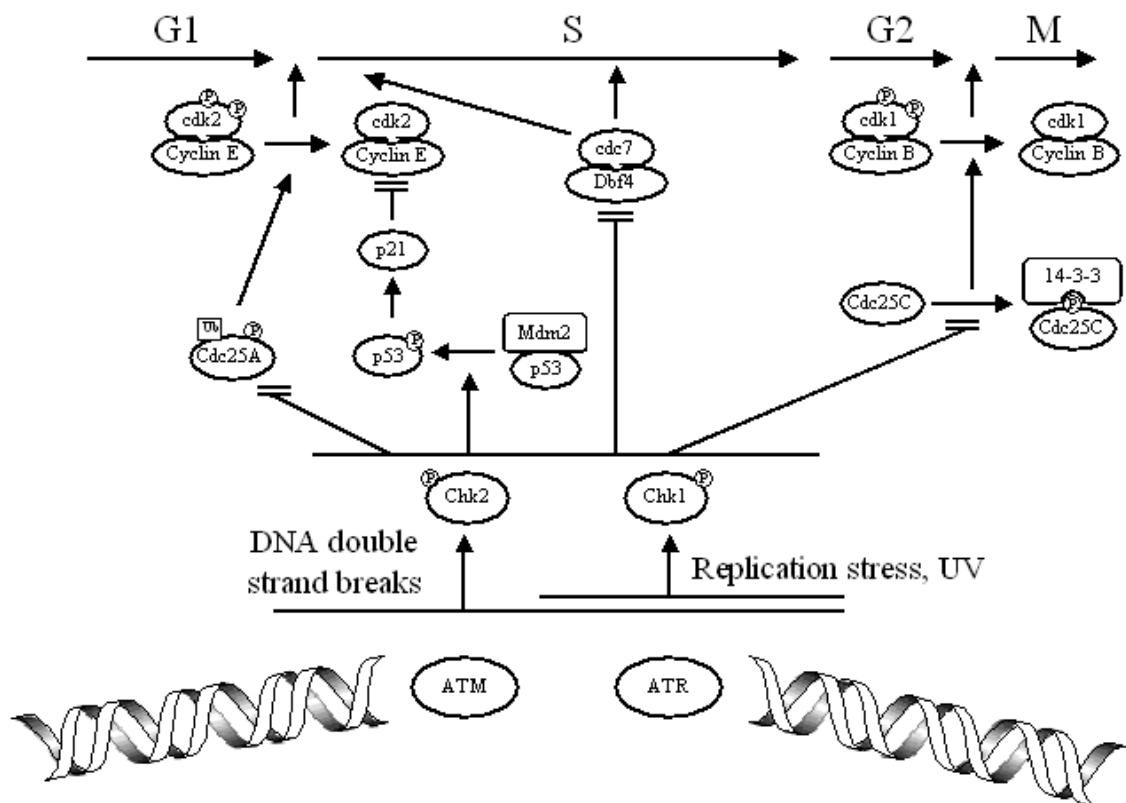
Lidský protein p53 se skládá z 393 aminokyselin a v roztoku tvoří tetramer. Jeho centrální doména je zodpovědná za vazbu ke specifickým sekvencím DNA. C-terminální doména vytváří stabilní komplexy s nesespecifickými sekvencemi jako SSBs nebo DSBs nebo nesprávně spárované DNA. Fosforylace na Ser 392 na této doméně usnadňuje vazbu p53 k těmto sekvencím.[66]

Regulace p53 je možná několika způsoby: změnou jeho subcelulární lokalizace, proteolytickou degradací ubiquitinem a alosterickou modifikací na hlavní DNA vazebné doméně. P53 působí v jádře. Aby mohl být přemístěn do cytoplazmy, ATM fosforyluje mdm2, který je E3 ubiquitinovou ligázou. Mdm2 je nepostradatelný pro efektivní p53 degradaci a je ATM kinázou fosforylován na Ser 166 a 395.[66] Jestliže je buňka vystavena stresu jako je IZ, vazba mezi mdm2 a p53 je přerušena, p53 je fosforylován a blokuje tak efekt mdm2. P53-mdm2 model je kontrolován ATM přímo fosforylací p53 na Ser 15 a nepřímo přes fosforylaci Ser 20, která je řízena Chk2.[50] Chk2 kináza je aktivována ATM na Thr 68.[1]

Transkripční aktivita p53 je podporována 53BP1. 53BP1 obsahuje C-terminální doménu pro navázání p53 a další doménu zodpovědnou za vázání fosforylovaného histonu H2AX, který je nezbytný k udržení 53BP1 v místě DSBs. Zastavení buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě je způsobeno indukcí transkripce inhibitoru cyklin dependentních kináz p21<sup>CIP1/WAF1</sup>. [40] P21 spolu s p27 a p57 vytváří rodinu proteinů sdílejících schopnost inhibovat cyklin dependentní kinázy a mohou tak zastavit buněčný cyklus.[66]

ATM se také uplatňuje u homologní rekombinace (HR) (viz kap. 2.4.2.). Reguluje tento proces fosforylací a asociací s produktem genu BRCA1. Brca1 protein je fosforylován ATM nepřímo přes Chk2, aby mohl vázat Rad51.[66]

Univerzálnost ATM dokládá i to, že během časně odpovědi na DNA poškození dochází k fosforylaci histonu subtypu H2A, třídy H2AX, což je proces, který může být vykonán dvěma kinázami: DNA-PK a ATM.[66] Protein  $\gamma$ H2AX je důležitý k retenci některých proteinů účastnících se DNA oprav.[50] Více se popisu této fosforylace věnujeme v kapitole 2.3.3.



**Obr. č. 1:** ATM/ATR a jejich substráty

Převzato z <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=585>

### 2.3.2 ATR

ATR kináza (ATM and Rad3-related) kontroluje a koordinuje DNA replikaci, stabilitu replikační vidličky, kontrolní body buněčného cyklu a opravy DNA. Schopnost aktivovat ATR má mnoho typů DNA poškození, jako jsou: DSBs, bazické adukty, cross-linky.[48] ATR je nejčastěji aktivována faktory, které inhibují DNA replikaci, jako jsou UV a hydroxymočovina, které blokují syntézu nukleotidových prekurzorů a způsobují tak replikační stres.[25] ATR na rozdíl od ATM a DNA-PK je nezbytná v replikujících se buňkách.[48]

V odpovědi na stres ATR reguluje stabilitu replizomu a zabraňuje předčasnému vstupu do mitózy. Při replikačním stresu vzniká často jednořetězcová DNA (ssDNA). Na ssDNA se váže replikační protein A (RPA). Komplex ssDNA-RPA je signálem pro navázání ATR a podporuje její přemístění do poškozené oblasti spolu s dalšími faktory. ATR se přemísťuje díky svému specifickému vazebnému proteinu ATRIP, který má na svém C-terminálním konci specifickou evolučně zastaralou oblast sloužící k interakci s ATR a sám o sobě se váže přímo na RPA.[17]



Následuje nezávislé přemístění svorky kontrolního bodu, zahrnující Rad9-Rad1-Hus1 komplex. Jedná se o heterotrimer kruhového tvaru, jehož struktura a sekvence je podobná s replikativní posuvnou svorkou PCNA. Rad9-Rad1-Hus1 komplex přináší k ATR aktivační faktor TOPBP1. Přenos je závislý na C-terminálním konci Rad9, který je fosforylován na Ser 387. Tato fosforylace vytváří rozpoznávací místo pro BRCT doménu I a II v TOPBP1 proteinu, čímž ji přináší k ATR. TOPBP1 obsahuje ATR aktivující doménu, která se nachází mezi BRCT doménami IV a VII.[9] Po přemístění a navázání těchto faktorů nastává pomocí TOPBP1 aktivace ATR a fosforylace ATR substrátů. TOPBP1 váže plochy obou proteinů: ATR i ATRIP.[48]

Primární funkcí ATR je regulace progresu buněčného cyklu do G2-fáze. To zahrnuje G2 kontrolní bod, který předchází fázi mitózy v přítomnosti poškození DNA přes regulaci cdc25 fosfatázy.[48] Kinázy S-fáze způsobují zahájení tvorby nového replikonu a jsou kontrolovány cdc25A fosfatázou. Během normální S-fáze ATR aktivuje Chk1.[25] Chk1 vyžaduje aktivaci fosforylací pomocí ATR na Ser 317 a Ser 345. Po fosforylaci je Chk1 uvolněna z chromatinu k fosforylaci vlastních substrátů jako je cdc25 fosfatáza. Lidské buňky mají tři cdc25 proteiny, které regulují přechody v buněčném cyklu. Fosforylace cdc25 inhibuje její aktivitu a preventivně i aktivitu CDK. To je prevence vstupu do mitózy.[9] Tento proces je potřebný k správné koordinaci DNA replikace. Inhibice ATR nebo Chk1 vede k akumulaci cdc25A proteinu, zvýšení počtu replikonů a vzniku zlomů DNA řetězce.[25]

ATR také fosforyluje další proteiny, které regulují rekombinaci: Brca1, WRN a BLM.[9]

### **2.3.3 DNA-PK**

DNA-PK je serin/threoninová kináza skládající se z katalytické podjednotky DNA-PK<sub>CS</sub> o molekulové hmotnosti 460 kDa a DNA-vázajícího heterodimeru Ku70/Ku80 s molekulovou hmotností 70 a 86 kDa. C-terminální oblast DNA-PK<sub>CS</sub> obsahuje katalytickou doménu patřící k PI3-K nadrodině (PIKK<sub>S</sub>).[68] DNA-PK<sub>CS</sub> protein se skládá ze symetrického vrcholu vytvarovaného do koruny, který je oddělený od kruhového dna. Vrchol slouží ke spojení s dvouřetězcovou DNA.[10] Ku70 a Ku80 sdílí podobnou krystalovou strukturu s vytvarovanými prstenci, které obklopují DNA. Ku heterodimer se nenachází v kontaktu s DNA bázemi, ale interaguje s cukr-fosfátovou kostrou a usnadňuje orientaci DNA helixu v proteinovém prstenci.[68]

Aktivace DNA-PK je důležitá pro efektivní opravu radiací indukovaných DSBs během nehomologního spojování konců (NHEJ).[17] Objevuje se jako spouštěcí mechanismus apoptózy v odpovědi na neopravitelné nebo nadměrné poškození DNA.[43] Tato kináza je také kritickým enzymem u V(D)J rekombinace. U buněk s nedostatkem DNA-PK<sub>CS</sub> nebo Ku heterodimeru je tato rekombinace poškozená.[68] DNA-PK je aktivována přímým navázáním na DNA konce a její aktivace se zvyšuje v závislosti na množství poškození DNA.[43]

Heterodimer Ku70/80 je schopen se navázat k volným dvouřetězcovým koncům DNA, které vznikly díky DSBs a dalším nesrovnalostem v DNA a navádí katalytickou podjednotku DNA-PK<sub>CS</sub> k sobě do místa poškození DNA ke zformování aktivního DNA-PK komplexu.[17,44] Ku80 obsahuje vysoce konzervativní C-terminální oblast homologickou s koncem Nbs1 nebo ATRIP, které slouží pro ATM resp. ATR. Tyto PIKK interagující proteiny zprostředkovávají přemístění příslušných proteinů PIKKs k poškozené DNA. Tento proces je závislý na PIKK interagujících proteinech a delece nebo mutace těchto oblastí vede k porušení jejich interakce, konkrétně u Ku80 s DNA-PK<sub>CS</sub>. Při styku DNA-PK<sub>CS</sub> s konci DNA dojde k její aktivaci a autofosforylaci na několika Ser/Thr oblastech, zvláště na Ser 2056 a Thr 2609.[43] DNA-PK<sub>CS</sub> fosforyluje také Ku70 na Ser 6 a Ku80 na Ser 577, 580, 579 a Thr 715.[10]

Aktivní DNA-PK komplex je schopen fosforylovat velké množství proteinů obsahujících Ser/Thr-Gln. DNA-PK fosforyluje Ku70, Ku80, XLF, Artemis, DNA ligázu IV (Lig IV), DNA-PK<sub>CS</sub> a p53 in vitro. Je známo, že DNA-PK také fosforyluje XRCC4 u buněk ozářených paprsky X. Předpokládá se, že fosforylace těchto proteinů je důležitá pro NHEJ in vivo.[68]

DNA-PK je zodpovědná za fosforylaci H2AX během apoptózy v nepřítomnosti ATM. Masivní fragmentace DNA během apoptózy může vést k výskytu vysokého množství aktivované DNA-PK, kdy se z ní stává dominantní H2AX kináza. DNA-PK<sub>CS</sub> je aktivována v apoptických buňkách. Důkazem je autofosforylace na Ser 2056, předtím než je inaktivována štěpením. DNA-PK<sub>CS</sub> autofosforylace a  $\gamma$ H2AX indukce se objevují pouze u buněk s apoptickými jádry s charakteristickou chromatinovou kondenzací. DNA-PK<sub>CS</sub> je inaktivována štěpením na 240,150 a 120 kDa fragmenty CPP32 proteázou během konečných fází apoptózy k zastavení oprav DNA.[43]

## 2.4 Cesty reparační DNA

Jak již bylo řečeno, DSBs jsou nejnebezpečnějším typem poškození DNA. Pokud nejsou opraveny nebo jsou opraveny nesprávně, může dojít k ztrátě velkého množství genetické informace, genomickému přeskupení nebo buněčné smrti. DSBs jsou opravovány dvěma cestami: NHEJ a HR. Tyto cesty se odlišují svou přesností a použitým templátem.[39]

### 2.4.1 Nehomologní spojování konců

NHEJ je jednou z cest reparační poškozené DNA u savčích buněk.[68] NHEJ přímo znovu spojuje dva zlomené konce DNA, a proto nepotřebuje homologní sekvence DNA na rozdíl od HR. NHEJ pracuje nezávisle na buněčném cyklu a je dominantní cestou opravy u savců.[77] Mechanismus NHEJ je nutný také pro V(D)J rekombinaci. U zvířat defektních v NHEJ se proto rozvíjí těžká kombinovaná imunodeficeience. Inaktivace genů pro NHEJ proteiny vede ke zvýšené radiosenzitivitě buňky.[27, 68]

Nejjednodušším typem NHEJ je opětovné spojení kompatibilních zlomených konců DNA. Mechanismus přímého spojování může obnovit pouze dva kompatibilní konce přímou ligací. Originální sekvence jsou obnoveny, jestliže DSBs vede ke dvěma komplementárním nebo tupým koncům, které mohou být precizně religovány. Typ produktu, který je formován, záleží na struktuře konců DNA, které mají být spojeny. Vzniká buď inzert nebo překryv. Inzert se tvoří při spojování sousedících konců, zatímco překryv se tvoří mezi dvěma převisy se stejnou polaritou. Při NHEJ se však mohou spojit i nekomplementární konce bez ohledu na jejich sekvence a strukturu, což má za následek zvýšené riziko pro vznik mutací. Jestliže vzniknou dva nekomplementární konce DNA, musí být nejdříve transformovány na struktury schopné ligace pomocí enzymatických modifikací.[52] MRN komplex je složen z exonukleáz, endonukleáz a rozvolňovacích faktorů, které mohou být pro tento proces použity.[27]

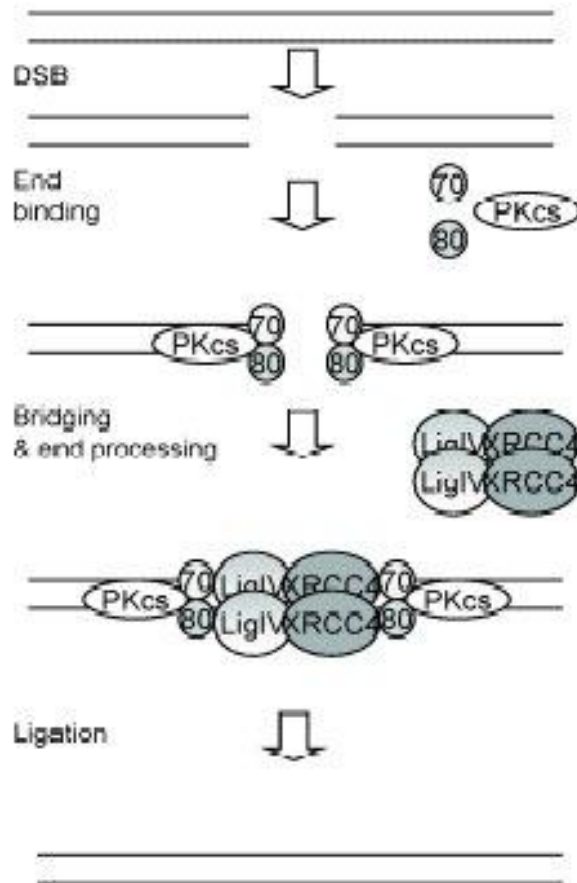
Klíčovou komponentou pro NHEJ je Ku protein. Jedná se o heterodimer skládající se ze dvou podjednotek: Ku70 a Ku80. Ku protein se váže k DNA v závislosti na výskytu DSBs. Má extrémně vysokou afinitu k DNA koncům. Je schopen se rychle navázat na nově vzniklé DSBs a slouží tak jako signál v NHEJ cestě.[77] Protein formuje otevřenou prstencovitou strukturu. Jedna část prstence

formuje podpěru, která chrání jednu stranu dvojité šroubovice DNA, zatímco druhá strana je více otevřená a dovoluje dalším faktorům NHEJ přístup k DSBs.[27]

DNA-PK<sub>CS</sub> má afinitu k DNA koncům a její aktivace se objevuje po její interakci s jednořetězcovou DNA oblastí odvozenou od DSBs.[27] DNA-PK<sub>CS</sub> se spojuje s Ku proteinem a tvoří funkční DNA-PK enzym. Komplex Ku/DNA-PK<sub>CS</sub> se váže a je aktivován DSBs in vitro. Předpokládá se, že jako primární složka rozpoznává DSBs také in vivo a poté ulehčuje přemístění a aktivaci dalších komponent NHEJ.[33] DNA-PK aplikuje svou Ser/Thr kinázovou aktivitu s preferencí k shodným sekvencím Ser/Thr-Gln v místě zlomených konců DNA.[77, 27]

Další NHEJ faktor je Lig IV, která spojuje volné konce DNA a spolupracuje v komplexu s XRCC4.[27] Komplex XRCC4 a Lig IV katalyzuje opětovné spojení dvou kompatibilních DNA konců. XLF má stimulační aktivitu pro XRCC4/Lig IV komplex v ligaci nekompatibilních a nevhodně spárovaných konců.[77]

V první fázi dochází k přemístování proteinů. Po navázání Ku proteinu k DSBs, jsou přemístěny nezávisle další faktory: DNA-PK<sub>CS</sub>, XRCC4/Lig IV a XLF. Tyto tři faktory mohou reagovat navzájem. Po prvotní přemístovací fázi vytvoří faktory velký komplex. Interakce mezi Ku a DNA-PK<sub>CS</sub> a mezi Ku a XLF jsou důležité k zajištění přemístění proteinů indukovaných DSBs a jejich shromáždění; jsou DNA-dependentní.[77]



**Obr. č. 2:** Princip NHEJ: Po vzniku DSBs se na konce vláken DNA naváže Ku protein. Ku protein poté reaguje s DNA-PK<sub>CS</sub> za vzniku aktivní DNA-PK. V další fázi Lig IV spolupracuje s XRCC4, naváže se na vlákna a dochází k obnově řetězců (ligaci). Převzato z [http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004\\_7/Page2.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_7/Page2.htm)

### 2.4.2 Homologní rekombinace

HR je nezbytná k udržení genomické stability. Je vyžadována pro přesnou chromozomovou segregaci během meiózy a představuje klíčovou cestu k opravě DSBs, DNA mezer a meziřetězcových křížení. Používá se k obnově poškozených replikačních vidliček.[59] HR se běžně objevuje ve frekvenci  $1:10^5-10^7$  postižených buněk. Tato nízká frekvence pravděpodobně odráží průměrnou nízkou frekvenci rekombinace v každé buňce. Příčinou může být vysoká frekvence náhodné nehomologní integrace, která se objevuje  $1:10^2-10^4$  ozářených buněk.[70] HR je nejvíc aktivní v S-fázi buněčného cyklu, v G2/M-fázi aktivita klesá.[39]

HR využívá jako templát nepoškozenou DNA na sesterské chromatidě nebo homologním chromozomu.[39] Během HR vstupuje poškozený chromozom do spojení s nepoškozenou DNA molekulou, s kterou sdílí rozsáhlou homologii.[27]

Při HR působí RAD52-epistatická skupina proteinů. Tyto proteiny mohou být rozděleny do dvou podskupin podle jejich biochemických vlastností. První podskupina: Rad51, Rad52, Rad54 a Rad57 zahrnuje proteiny spojené s reakcemi, během nichž dochází k přenosu řetězců DNA. Druhá podskupina: Mre11, Rad50 a Nbs1 jsou proteiny vyžadované pro jejich nukleázovou aktivitu. Proteiny MRN komplexu kontrolují modifikaci zlomených DNA konců a vytváří jednořetězcový konec, který se stává substrátem pro přemísťování řetězce za pomoci Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 a Rad57. Rad52 váže jednořetězcovou DNA na jejím konci a spolupracuje s RPA, což je eukaryotický jednořetězcový vázající protein pro přípravu řetězce k efektivnímu vázání (vzájemné nasedání komplementárních sekvencí) na Rad51. Rad51, stejně jako jeho bakteriální homolog RecAp se naváže na jednořetězcovou DNA k vytvoření vláken, které katalyzují řetězcovou výměnu. Rad51 zformuje vlákno na 3' nebo 5' konci a přemístí řetězec bez ohledu na polaritu. Rad55 a Rad57 pomáhají Rad51 upevnit se na jediný řetězec. Rad54, který patří do skupiny SNF2/SW12 rodiny DNA-dependentních ATPáz se účastní remodelace chromatinové struktury. Působí na duplexu DNA a stimuluje Rad51 zprostředkovanou řetězcovou výměnu.[70]

U savců jsou dále zahrnuty Brca1 a Brca2 proteiny.[68] Rad51 a Brca2 reagují přímo, zatímco spojení Brca1 a Rad51 je vytvořeno nepřímo, nejspíš prostřednictvím Brca2. Buňky myši deficitní v Brca1 a Brca2 podléhají embryonální smrti. Takové buňky jsou hypersenzitivní k DNA poškozujícím faktorům a vyvíjí se spontánní chromozomální aberace. Brca2 interaguje s proteinovým komplexem MRN a stimuluje výměnu Rad51 za RPA.[33]

HR je iniciována komplexem MRN, díky kterému vznikne procesem nukleotické resekce jednořetězcový 3'přesahující konec. Na vytvořenou jednořetězcovou DNA se naváže RPA. Rad51 poté nahradí RPA na 3' konci jednořetězcové DNA v procesu doprovázeném dalšími proteiny jako jsou Rad52 a Rad54. Nukleoprotein následně interaguje s nepoškozenou DNA a při nalezení homologního úseku Rad51 katalyzuje výměnu řetězců, ve které poškozená molekula vstoupí do nepoškozeného DNA duplexu a vytěsňuje jeden řetězec jako vytěsňenou smyčku (D-smyčka). Reakci stimuluje Rad54. 3'konec poškozené DNA je natažen DNA polymerázou, která kopíruje informaci z nepoškozené DNA a konce jsou poté spojeny DNA ligázou I.[27] 3'konce těchto řetězců slouží jako primery pro opravnou

syntézu. Výsledná spojená molekula obsahuje heteroduplexní oblast ohraničenou dvěma rozvětvenými strukturami nazývanými v anglické literatuře jako „holliday junctions“, které nejsou v místě fixovány a mohou migrovat. Endonukleázami pak vznikají produkty s či bez vyměněné DNA.[52]

## **2.5 Inhibitory**

Inhibice reparace DNA je nově vznikající strategie v léčbě rakovinových onemocnění. Cílem je zvýšení citlivosti buněk vůči IZ nebo chemickým látkám.

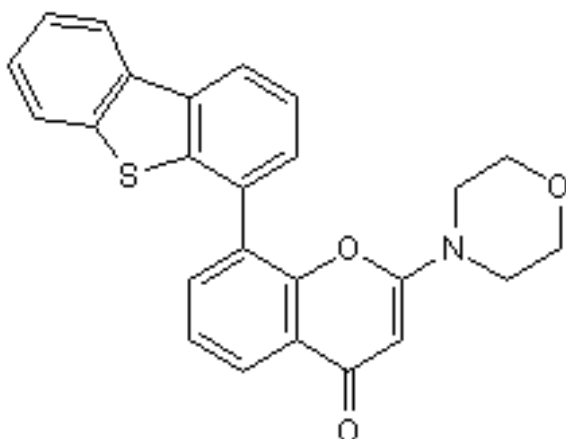
Jedním z cílů inhibitorů jsou ATM a DNA-PK kinázy, jež jsou, jak jsme v předchozí části textu popsali, klíčové kinázy zodpovědné za signalizaci a opravu DSBs skrz NHEJ a HR. [57]

Buňky s nedostatkem těchto proteinů jsou defektní a reparace DNA nemůže probíhat. Buňky jsou pak více senzitivní k IZ, inhibitorům topoizomerázy II a dalším látkám.[78]

### **2.5.1 Inhibitor NU7441**

Inhibitor NU7441 (8-dibenzothiofen-4-yl-2-morfolin-4-yl-chromen-4-on) byl identifikován jako potencionální a specifická ATP kompetitivní molekula pro inhibici DNA-PK s  $IC_{50}$  14 nmol/l. Předpokládá se, že tento inhibitor je přibližně 100krát více selektivní vůči DNA-PK než jiné inhibitory v téže rodině.[57] Inhibitor NU7441 zvyšuje radiosenzitivitu a mírně snižuje aktivitu HR.[64] Koncentrace NU7441 nutné k inhibici DNA-PK jsou nižší než u inhibitoru NU7026. Nízké, netoxické koncentrace (1  $\mu$ mol/l) 3-4krát redukuje použité dávky IZ potřebné k zabití 90% buněk.[78]

Podle dosavadních výzkumů je NU7441 schopen zamezit autofosforylaci DNA-PK<sub>CS</sub> na Ser 2056.[75] Nepotlačuje fosforylaci ATM na Ser 1981, p53 na Ser 15, H2AX na Ser 139 a DNA-PK na Thr 2609.[57] NU7441 umocňuje přetrvávání  $\gamma$ H2AX ohniska po ozáření a prodlužuje G2/M-fázi buněčného cyklu.[78]

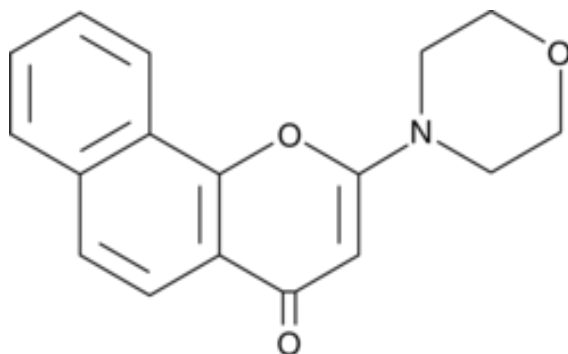


**Obr. č. 3:** Struktura inhibitoru NU7441  
Převzato z <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=239420>

### 2.5.2 Inhibitor NU7026

Inhibitor NU7026 (2-(morfolin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-on) je malá selektivní molekula umožňující inhibovat DNA-PK s  $IC_{50}$ :  $0.23 \mu M$  pro DNA-PK,  $13 \mu M$  pro fosfatidylinositol 3-kinázu,  $>100 \mu M$  pro ATM a ATR na embryonálních myších fibroblastech nebo ovariálních buňkách křečka.[49] Kombinace inhibitoru spolu s IZ (dávkou 4 Gy) vede k zvýšenému podílu polyploidie buněk. Dále zvyšuje výskyt multientrosomů, multipolárních vřeten a jejich dalších aberantních forem a mnohojaderných buněk.[58] Dle další studie inhibitor v kombinaci s dávkou 1 Gy významně zvyšuje podíl chromatidových zlomů. Množství zlomů je až 4krát vyšší; v průměru 15-18 zlomů na buňku. Sám inhibitor tyto změny není schopen způsobit.[4]

Inhibitor zamezuje fosforylaci Chk2 na Thr 68 indukované zářením.[58] Umocňuje inhibici růstu u idarubicinu, daunorubicinu, doxorubicinu, etoposidu, mAMSA a mitoxantronu. NU7026 s přidavkem etoposidu zadržuje buňky v G2-fázi buněčného cyklu. Sám inhibitor tento efekt nevykazuje.[74]



**Obr. č. 4:** Struktura inhibitoru NU7026  
Převzato z <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/13308>



## 2.6 Apoptóza

Apoptóza je evolučně starý proces vedoucí k smrti buněk. Apoptóza zastává kritickou roli v embryonálním vývoji, homeostáze, remodelaci, přežití a obraně proti vnějším agens.[13] Jedná se o přísně regulovaný buněčný proces, který se objevuje za fyziologických i patologických podmínek. Apoptický proces je za fyziologických podmínek aktivován, když poškození převyší kapacitu reparačního mechanismu.[23] Mechanismus apoptózy je velice komplexní. Defekt v signalizaci se může objevit kdekoli. Dysregulace apoptózy vyústí v přílišnou nebo naopak nedostatečnou smrt buněk a tím vzniku onemocnění.[13] Může vést k maligní transformaci buněk, přispívá k metastázím tumorů a odolnosti vůči protirakovinové léčbě.[76]

Apoptický proces v buňce zahrnuje jak morfologické, tak biochemické změny buňky. Morfologické změny zasahují jádro i cytoplazmu. V jádře se jedná o chromatinovou kondenzaci a nukleární fragmentaci, buňka zmenšuje svůj objem a ztrácí membránovou integritu. Biochemicky pozorujeme čtyři hlavní změny: aktivaci kaspáz, rozpad DNA a proteinů, membránové změny a rozpoznání buňky fagocytujícími buňkami.[76] Apoptóza je vykonávána dvěma hlavními cestami, které jsou vysoce geneticky konzervované: vnitřní využívající mitochondrie nebo endoplazmatické retikulum (ER) a vnější.[13]

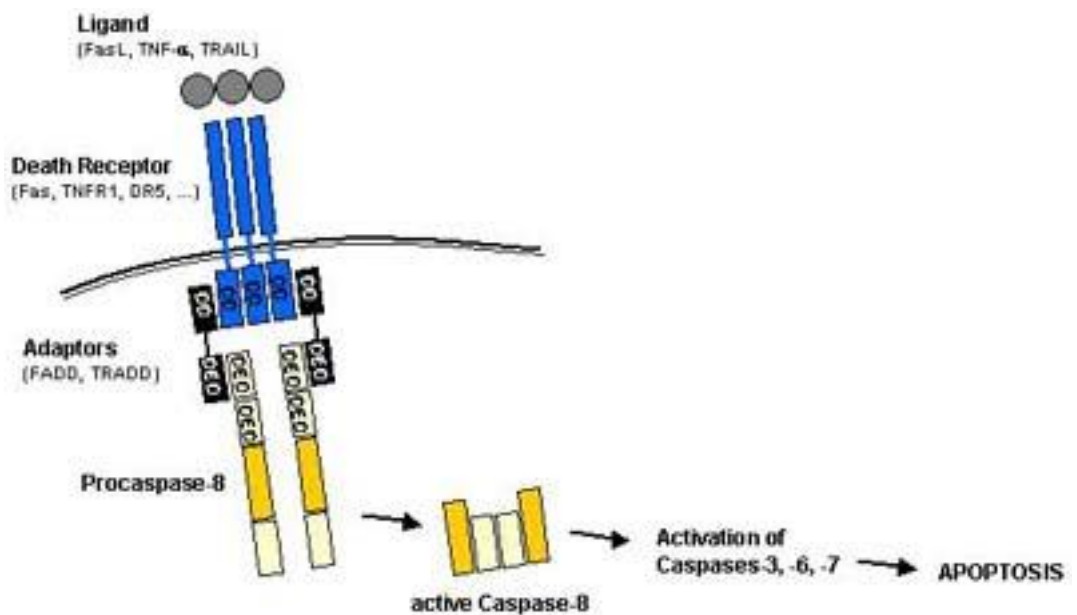
### 2.6.1 Vnější cesta apoptózy

Vnější cesta je zprostředkována pomocí tzv. receptorů smrti a jejich ligandů. Ligand se naváže ke svému specifickému receptoru. Ligandem může být například integrální protein membrány na povrchu druhé buňky (Fas ligand) nebo solubilní extracelulární protein (tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ).[13] Fas ligand je typ II membránového proteinu, který může být proteolyticky přemístěn do intracelulárního prostoru jako solubilní forma, která je méně potentní v indukci apoptózy než membránově vázaná forma.[23]

Bylo popsáno několik receptorů. Nejznámější je TNF receptor typ 1 (TNFR1) a příbuzný protein nazývaný Fas (CD95/APO-1). Dalšími z nich jsou: DR3 (APO-3), DR4 (TRAIL-1/APO-2), DR5 (TRAIL-2), DR6, ektodysplasin A receptor (EDAR) a receptor nervového růstového faktoru (NGFR).[13,76] Tyto receptory mají tzv. doménu smrti, která přitahuje adaptorové proteiny jako jsou protein spojující TNF

receptor s doménou smrti (TRADD) a protein spojující Fas receptor s doménou smrti (FADD). Specifické adaptorové proteiny FADD nebo TRADD se váží přes jejich vlastní domény smrti k doménám smrti receptorů.[23] Celý komplex ligand-receptor-adaptorový protein je znám jako smrt indukující signální komplex (DISC).[76] FADD nese efektorovou doménu smrti (DED) a přitahuje DED doménu prokaspázy-8.[23]

Navázání prokaspázy -8 k DISC vede k její aktivaci.[76] Prokaspáza-8 se aktivuje vytvořením dimeru. Aktivovaná forma kaspázy 8 je iniciační kaspázou, která iniciuje apoptózu štěpením dalších kaspáz. Štěpí a aktivuje efektorovou prokaspázu-3 a Bid (pro-apoptický Bcl-2 protein), který spojuje vnější a vnitřní cestu apoptózy.[13]



**Obr. č. 5:** Vnější cesta apoptózy: Na receptor smrti se naváže specifický ligand. Receptor smrti obsahuje doménu smrti, na kterou se naváží adaptorové proteiny. Vzniká smrt indukující signální komplex (DISC). Komplex přitahuje prokaspázu-8. Ta se aktivuje vytvořením dimeru. Aktivovaná kaspáza-8 aktivuje kaspázy-3,-6,-7 a nastává apoptóza. Převzato z <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>

Kaspázy jsou cysteinové proteázy, které štěpí své substráty v oblastech obsahujících aspartát.[23] Jsou syntetizovány jako velké neaktivní prokaspázy obsahující N-terminální doménu a C-terminální katalytickou doménu skládající se z 20kDa (p20) a 10 kDa (p10) poddomén.[13] Kaspázy mohou být rozděleny do dvou tříd: 1) kaspázy podobné kaspáze-1 (kaspáza-1, -4, -5, -13, -14), které sehrávají významnou úlohu v zánětlivém procesu a 2) kaspázy-2, -3, -8, -9 a -10, které mají klíčovou roli v apoptóze. Druhá skupina může být dále rozdělena na iniciační kaspázy -2, -8, -9, -10, které jsou zodpovědné za iniciaci apoptózy a efektorové kaspázy-3, -6, -

7, které jsou zodpovědné za štěpení buněčných komponent během apoptózy.[76] Iniciační kaspázy jsou aktivovány dimerizací. Efektorové kaspázy jsou aktivovány proteolytickým štěpením iniciačními kaspázami. Po aktivaci efektorové kaspázy proteolyticky ničí buňky.[13] Aktivují také DNAázu, která následně degraduje nukleární DNA.[76]

### **2.6.2 Vnitřní cesta apoptózy**

Vnitřní stimuly, jako jsou neopravitelné genetické poškození, hypoxie, extrémně vysoké koncentrace cytosolického  $Ca^{2+}$ , UV nebo gama ozáření, chemoterapeutika, ukončení cytokineze, růstové faktory a další jsou schopny spustit vnitřní cestu apoptózy.[67,76]

Vnitřní cesta je iniciována uvnitř buňky a probíhá v mitochondriích nebo ER. Mitochondrie je organela složená ze dvou definovaných kompartmentů: matrix, který je obklopen vnitřní membránou a intermembránového prostoru, který je obklopen vnější membránou.[23] Mechanismus aktivace vnitřní cesty je založen na zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, která se tak stane propustnou pro některé pro-apoptické molekuly mitochondriálního intermembránového prostoru, které se poté účastní aktivace kaspáz.[67,76]

Centrální úlohu v tomto procesu má Bcl-2 rodina proteinů. Proteiny dělíme na ty, které podporují apoptózu (pro-apoptické) a ty, které ji potlačují (anti-apoptické). U člověka bylo identifikováno více než 20 členů této rodiny.[23] Mezi anti-apoptické proteiny řadíme: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10 a Bcl-B. Pro-apoptické dále dělíme na BH3-only: Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim<sub>L</sub>/Bod, Bad, Bid, Noxa, puma/Bbc3, Bmf a Bax-podobné faktory: Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-x<sub>s</sub>. [67]

Funkce těchto proteinů je odvislá od jejich struktury. Proteiny jsou složeny z Bcl-2 homologních domén (BH). U anti-apoptických proteinů se vyskytují BH1, 2, 3 i 4. BH3-only proteiny se skládají pouze z BH3. Každý Bcl-2 anti-apoptický faktor obsahuje 3 až 4 BH domény. BH1 – BH3 formují hydrofobní kapsu a N-terminální BH4 stabilizuje proteinovou strukturu ze zadní části.[67] Velké množství z těchto proteinů působí jako agonisté a antagonisté na sebe navzájem.[23]

Bcl-2 proteiny ovlivňují apoptózu permeabilizací vnější nebo vnitřní membrány mitochondrie, vedoucí k uvolnění cytochromu c (cyt c) a apoptického indukčního faktoru (AIF) nebo naopak stabilizací bariérové funkce.[23] Pokud po

narušení mitochondriální membrány dojde k uvolnění pro-apoptických molekul, jsou kaspázy aktivovány ihned.[67]

Během apoptózy mitochondrie podstoupí remodelační proces, ve kterém je spojení krist rozšířeno z 19 na 57 nm. Kristy jsou tak lépe propojeny. Tyto změny usnadňují redistribuci cyt c do intermembránového prostoru, takže po permeabilizaci může být uvolněn.[13] Narušení membrány mitochondrie nejspíš zahrnuje tvorbu kanálků v membráně. Na tvorbě kanálků se podílí protein Bax. Kanálek je transnitní pór, který dovoluje průchod molekul o velikosti 1,5 kDa. Bax tuto velikost zvyšuje a kanálem může projít i cyt c.[67]

Uvolnění cyt c do cytosolu vede k aktivaci proteinu Apaf-1 a prokaspázy-9. Aktivace Apaf-1 probíhá přes navázání na WD-40 opakující se doménu tohoto proteinu.[23,67] V reakci s Apaf-1 se uplatňuje i ATP/dATP, který se váže na jeho nukleotidovou vazebnou doménu.[13] Tyto proteiny formují holoenzymový komplex zvaný apoptosom. Apoptosomální komplex má molekulovou hmotnost 1,4 MDa.[23,67] Tento komplex vede k efektivní aktivaci kaspáz-3 a -7.[67] Kaspáza-3 poté štěpí inhibitor deoxyribonukleázy, čímž je fakticky zodpovědná za indukci nukleární apoptózy.[76]

Další apoptické faktory, které jsou uvolněny z intermembránového prostoru mitochondrie do cytoplazmy jsou: AIF, Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), DIABLO (direkt IAP binding protein with Low pI) a HtrA2 (Omi/high temperature requirement protein A). Smac/DIABLO nebo Omi/HtrA2 usnadňují aktivaci kaspáz navázáním se na inhibitory apoptických proteinů (IAPs), což vede k rozrušení interakce mezi IAPs a kaspázami-3 a -9.[76]

Vnitřní cesta probíhající přes ER je méně prozkoumána. Předpokládá se, že je závislá na kaspáze-12 a naopak nezávislá na mitochondriích. Jakmile je ER stimulováno buněčným stresem (jako je hypoxie nebo volné radikály), dochází k oddělení TRAF2 proteinu (adaptor protein TNF receptor associated faktor 2) od prokaspázy-12 a tím k její aktivaci a následné indukci apoptózy.[76]

### 3 Cíle práce

Cíle naší práce byly definovány takto:

- Stanovit zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibice reparačního procesu DNA inhibitorem NU7441 indukci apoptózy u leukemických buněk.
- Stanovit přesnou míru apoptózy po použití inhibitoru NU7441 a zhodnotit možné využití pro radio-sensibilizaci.
- Zjistit na jaké proteiny má inhibitor NU7441 vliv.
- Porovnat účinek inhibitorů NU7026 a NU7441.

## **4 Experimentální část**

### **4.1 Materiál a metody**

#### ***4.1.1 Buněčné kultury a kultivační podmínky***

Pro všechny metody byly použity lidské buňky T-lymfocytární leukémie MOLT-4, získané z ATCC (American Type Culture Collections – Manassas, VA, USA). Buňky byly kultivovány v Ivskovského modifikovaném Dulbecco-médiu (Sigma, St. Louis, MS, USA) – přidáno 20% fetální bovinní sérum, 0,05% L-glutamin, 150 UI/ml penicilin, 50µg/ml streptomycin) ve vlhčeném inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

Kultury byly rozděleny každý druhý den ředěním na koncentraci  $2 \times 10^5$  bb/ml. Za pomoci hemocytometru byly buňky spočítány a integrita jejich buněčné membrány byla stanovena technikou barvení Trypanovou modří. V této práci byly použity buňky, které prošly maximálně 20 pasážemi.

#### ***4.1.2 Gama ozáření a přidání inhibitoru***

Exponenciálně rostoucí buňky byly suspendovány v koncentraci  $2 \times 10^5$  bb/ml. Alikvoty 10 ml buněčné suspenze byly v lahvičkách (Nunc - 25 cm<sup>2</sup>) ozářeny při pokojové teplotě za použití zářiče <sup>60</sup>Co s dávkovým příkonem 0,631 Gy/min ze vzdálenosti 100 cm od zdroje. Po ozáření byly lahvičky umístěny do inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a alikvotní části byly odebrány 2, 24 a 72 hod po ozáření. Pro následnou analýzu byly buňky spočítány a viabilita byla určena metodou barvení Trypanovou modří.

V experimentech s medikamentózním ovlivněním byl 120 min před ozáření do kultivačních nádob s buňkami přidán inhibitor NU7441 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) nebo NU7026 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). NU7441 byl rozpuštěn v čerstvém médiu těsně před experimentem tak, aby finální koncentrace byla 1 µmol/l a NU7026 tak, aby finální koncentrace byla 10 µmol/l.

### **4.1.3 Lýza buněk**

Pro elektroforézu, Western blotting a ELISU je nutné buňky zlyzovat. Na lýzu bylo použito  $10^7$  buněk v objemu 20 ml. Centrifugace byla provedena na centrifuze Jouan CR 312 (Trigon plus, CZ) s rotorem o poloměru 13 cm. Mikrozkušavky byly stočeny na centrifuze JOUAN BRYi (Trigon plus, CZ) s rotorem o poloměru 5,5 cm.

#### **4.1.3.1 Postup lýzy buněk pro elektroforézu**

1. Zkušavky s buňkami byly stočeny po dobu 10 min při 1 300 otáčkách ve 4 °C.
2. K sedimentu bylo přidáno 5 ml PBS s 1 mM orthovanadanem sodným.
3. Zkušavky byly stočeny po dobu 10 min při 1300 otáčkách ve 4 °C.
4. K sedimentu bylo přidáno 0,5 ml ledového lyzovacího pufru. Obsah zkumavek byl promíchán na Vortexu.
5. Zkušavky byly inkubovány 30 min na ledu, každých pět minut byly promíchány na Vortexu.
6. Obsah zkumavek byl resuspendován 2 ml injekční stříkačkou a přenesen do mikrozkušavky.
7. Mikrozkušavky byly stočeny po dobu 30 min při 14000 otáčkách ve 4 °C.
8. Supernatant byl slit do označených kryozkumavek. Vzorky byly zamraženy v -80 °C.

#### **4.1.3.2 Postup lýzy buněk pro ELISU**

1. Zkušavky s buňkami byly stočeny po dobu 10 min při 1 300 otáčkách ve 4 °C.
2. K sedimentu bylo přidáno 5 ml PBS s 1 mM orthovanadanem sodným.
3. Zkušavky byly stočeny po dobu 10 min při 1300 otáčkách ve 4 °C.
4. K sedimentu bylo přidáno 0,5 ml lyzovacího pufru s 1 mM PMSF. Obsah zkumavek byl promíchán na Vortexu.
5. Zkušavky byly inkubovány 5 min na ledu. Každou minutu byly promíchány na Vortexu.

6. Obsah zkumavek byl resuspendován 2 ml injekční stříkačkou a přenesen do mikrozkušavky.
7. Mikrozkušavky byly stočeny po dobu 30 min při 14000 otáčkách ve 4 °C.
8. Supernatant byl slit do označených kryozkušavek. Vzorky byly zamrazeny v -80 °C.

#### **4.1.4 Stanovení celkové bílkoviny**

Nejpoužívanější metodou pro stanovení celkové bílkoviny je Biuretova reakce, při níž prokážeme přítomnost peptidové vazby. Peptidové vazby vytváří s měďnatými ionty v alkalickém prostředí komplexní sloučeniny modrofialové barvy. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. Komplexy se stanovují spektrofotometricky.

V této práci byla použita modifikovaná Biuretova reakce ve formě Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma, Saint Luis, MS, USA). Díky tomu jsme mohli z každého vzorku odebrat shodné množství proteinu pro další experimenty.

##### **4.1.4.1 Postup stanovení celkové bílkoviny**

1. Pomocí standardy (BSA) byla připravena kalibrační řada.
2. Vzorky byly naředěny v poměru 1:9 (tzn. 5  $\mu$ l vzorku a 45  $\mu$ l destilované vody). Vzorky byly připraveny v tripletu.
3. Ke každému vzorku i kalibrační řadě byl přidán 1 ml činidla (Bicinchoninová kys., síran měďnatý v poměru 50:1).
4. Vzorky i kalibrační řada byly inkubovány 30 minut při 37 °C v termostatu.
5. Na spektrofotometru byla při vlnové délce 562 nm proměřena nejprve kalibrační řada, poté vzorky.
6. U každého vzorku byla vypočítána průměrná hodnota bílkoviny. Pomocí kalibrační řady byl vypočítán potřebný objem vzorku k elektroforéze nebo ELISA stanovení.

#### **4.1.5 Elektroforéza**

Elektroforéza je separační metoda, která rozděluje molekuly na základě jejich velikosti povrchového náboje, velikosti molekuly a koncentraci v roztoku ve



stejnoseměrném elektrickém poli. V této práci byla použita SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza. SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen podle molekulové velikosti.

#### 4.1.5.1 Postup elektroforézy

1. Skla byla přetřena lihem, podložní sklo (1 mm) bylo přiloženo ke krycímu sklíčku. Sestavená skla byla vložena do plastových stojánek a upevněna do držáků. Naspod držáků byla vložena guma.
2. Do odsávací baňky byl připraven 12 % rozdělovací gel (quantum satis). Hotový roztok byl nalit do skel těsně pod spodní hranu stojánku, zbytek byl přelit do kádinky pro vizuální kontrolu zatuhnutí gelu. Každý gel byl převrstven 650  $\mu$ l butanolu. Polymerace trvala cca 60 min.
3. Po zatuhnutí byl butanol vymyt destilovanou vodou a zbytek vody byl odstraněn filtračním papírem. Do odsávací baňky byl připraven 4 % zaostřovací gel v množství na 4 gely. Gel byl nalit mezi skla a byl do něj vložen 15-ti jamkový hřebínek pro tvorbu jamek pro vzorky. Polymerace trvala cca 30 min.
4. Byl připraven vzorkový pufr. K třikrát koncentrovanému vzorkovému pufru byl přidán  $\beta$ -merkaptoetanol v poměru 85:15. Do předem připravených mikrozkumavek bylo přidáno potřebné množství vzorkového pufru a patřičného vzorku. Mikrozkumavky se vzorky byly promíchány na Vortexu, stočeny na centrifuze MPW (cca 5 s) a 5 min zahřáty v blokové lázni při 95 °C. Poté bylo zopakováno stočení na centrifuze MPW.
5. Byl sestaven Protean3. Ze zatuhlých gelů byly vyndány hřebínky a byla uvolněna skla ze stojánek. Stříčkou s rozdělovacím pufrem byly propláchnuty jamky gelu a okraje skel. Skla byla umístěna do stojánek s platinovým drátkem, kratším sklem k těsnění. Stojánky se skly byly vloženy do držáků a s nimi pak do komory. Rozdělovací pufr byl v komoře nalit až po okraj, ve vnějším prostoru do poloviny. Z pod komory byly vyhnány vzduchové bubliny.
6. Na Protean3 byl umístěn nanášecí hřeben pro 15 jamek. Byl nanesen molekulový marker v objemu 3,9  $\mu$ l, poté vzorky po 30  $\mu$ g. Po nanesení

vzorků byl dolit rozdělovací pufr do komory i do vnějšího prostoru pár milimetrů pod okraj.

7. Protean3 byl přiklopen víkem a konektory byly zapojeny do zdroje. Komora byla vložena do boxu s ledem. Napětí bylo nastaveno na 200 V a proud na 240 mA. Elektroforéza probíhala cca 60 min.

#### **4.1.6 Western blotting**

Western blotting je technika užívána k detekci proteinů. Po rozdělení proteinů gelovou elektroforézou, jsou proteiny přeneseny na polyvinylidfluoridové (PVDF) membrány, kde jsou označeny protilátkami proti cíleným proteinům.

##### **4.1.6.1 Postup Western blottingu**

1. Během elektroforézy byly na čistém podkladu nastříhány a popsány PVDF membrány. Membrány byly aktivovány ve skleněné misce s methanolem po dobu 10 min třepáním na třepáčce.
2. Methanol byl nalit zpět do nádoby a k membránám byl nalit transfer pufr, se kterým byly třepány na třepáčce 15 min. Po této době byl transfer pufr přelit do misky a k membránám byl nalit nový.
3. Do misky s transfer pufrém byly připraveny blotovací kazety, vycpávky a filtrační papíry.
4. Po skončení elektroforézy byl Protean3 vyndán z ledu a komora byla rozložena. Zeleným plastovým kráječem byla od sebe oddělena skla a gely byly přeneseny do skleněné misky s transfer pufrém.
5. Byly sestaveny blokovací sendviče: na kazetu byla položena vycpávka, na ni filtrační papír, poté gel (s molekulovým markerem vlevo) a na něj příslušná membrána. Na membránu byl umístěn filtrační papír a vycpávka. Po položení každé vrstvy byly odstraněny vzduchové bubliny. Připravené kazety byly uzavřeny a vloženy do nosičů s elektrodami.
6. Nosiče s elektrodami byly vloženy do plastových nádob, zality transfer pufrém až po okraj a byla k nim vložena ledítka. Nádoby byly postaveny do boxu s ledem, přiklopeny víkem a zapojeny do zdroje. Přístroj byl nastaven na napětí 100 V a proud 250 mA. Western blotting probíhal 120 min.

7. Během blottingu bylo připraveno 5 % mléko v TBS s Tweenem 20 dle počtu membrán. Bylo-li třeba pro použití primární protilátky použít 5% BSA, byl tento roztok připraven místo mléka.
8. Po blottingu byly kazety rozloženy, membrány vloženy do misky s TBS/T a třepány se na třepačce 3×5 min. Roztok byl vyměňován po každém třepání.
9. Membrány byly blokovány v mléku 60 min třepáním na třepačce.
10. Po blokaci v mléku byly membrány promyty 3×10 min v TBS/T. Roztok byl vyměňován po každém třepání.
11. Byly připraveny tuby na protilátky. Do každé tuby bylo napipetováno 5 ml 5 % mléka nebo BSA a k tomu přidána patričná protilátka dle daného ředění.
12. Membrány byly vloženy do tuby popiskem dovnitř a inkubovány přes noc za stálého otáčení v 8 °C.
13. Druhý den byly membrány promyty 3×10 min v TBS/T. Roztok byl vyměňován po každém třepání.
14. Do plastových tub bylo napipetováno potřebné množství 5 % mléka a sekundární protilátka anti-myší nebo anti-králičí (Dakocytomation, Denmark). Membrány byly vloženy popiskem dovnitř a inkubovány 60 min za stálého otáčení.
15. Po inkubaci byly membrány promyty 3×10 min TBS/T a poté 3×10 min TBS.
16. Membrány byly inkubovány alespoň 1 min s ECL roztokem (Roche diagnostics, Germany), byly vloženy do fotografické kazety a byl k nim přiložen film (Foma Bohemia, CZ).
17. Exponovaný film byl vložen do vývojky (Foma Bohemia, CZ) na 10-20 s, poté do vody na 5 s a do ustalovače (Foma Bohemia, CZ) na alespoň 20 s.

#### **4.1.7 Stripping**

Stripping je termín popisující odstranění primární a sekundární protilátky z western blotových membrán. Používá se pro stanovení více než jednoho proteinu na stejné membráně. Výhodou je ušetření množství použité vzorku, materiálu a času.

Stripping lze provést jako lehký nebo těžký, podle šetrnosti použitého agens vůči proteinům. V této práci byl použit lehký.

#### **4.1.7.1 Postup lehkého strippingu**

1. Membrány byly vloženy do nádoby se stripping pufrem na třepačku po dobu 10 min.
2. Stripping pufr byl vylit a nahrazen novým. Krok 1 se opakoval.
3. Membrány byly promyty 2×5 min TBS, poté 2×5 min TBS/T.
4. Membrány byly připraveny na blokaci v 5 % mléku.

#### **4.1.8 ELISA**

ELISA je imunologická metoda založená na principu interakce antigenu s protilátkou. Na protilátce je navázán enzym, který katalyzuje chemickou přeměnu přidaného substrátu. Vzniklý produkt je barevný a stanovuje se spektrofotometricky. Množství produktu je přímo úměrné koncentraci antigenu.

##### **4.1.8.1 Postup ELISY**

1. Po ekvilibraci mikrotitrační destičky na pokojovou teplotu byl odlomen patřičný počet jamek a umístěn do držáku.
2. Rozmražené vzorky byly v potřebném poměru smíchány s diluentem.
3. Pipetou bylo nanášeno 100  $\mu$ l každého zředěného buněčného lyzátu do patřičné jamky.
4. Proběhla inkubace v 8  $^{\circ}$ C přes noc.
5. Obsah destičky byl odstraněn a jamky byly promyty 4×200  $\mu$ l promývacím pufrem. Po každém promytí byla destička vyklepána na filtrační papír.
6. Do každé jamky bylo nanášeno 100  $\mu$ l detekční protilátky. Destička byla inkubována jednu hodinu v 37  $^{\circ}$ C.
7. Byl zopakován promývací krok dle bodu 5.
8. Do každé jamky bylo nanášeno 100  $\mu$ l HRP- sekundární protilátky. Destička byla inkubována 30 min při 37  $^{\circ}$ C.
9. Byl zopakován promývací krok dle bodu 5.
10. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l TMB substrátu. Destička byla inkubována 30 min při pokojové teplotě.

11. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l STOP roztoku. Destička byla lehce protřepána.
12. Byla změřena absorbance do 30 min po přidání STOP roztoku při 450 nm.

#### **4.1.9 APOPTEST**

APOPTEST slouží k měření apoptózy za pomoci průtokového cytometru. Princip metody je založen na sledování fosfatidylserinu (PS), který je u živých buněk lokalizován uvnitř buňky. U buněk apoptických se nachází na povrchu. APOPTEST využívá vlastnosti Annexinu V konjugovaného s fluoresceinem (FITC) vázat PS v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Druhým sledovaným kritériem je propidium jodid (PI), který je schopen se přes porušenou membránu u apoptických buněk dostat k DNA a nespecificky se na ni navázat.

##### **4.1.9.1 Postup APOPTESTU**

1.  $10\times$  koncentrovaný vazebný pufr byl zředěn  $10\times$  deionizovanou vodou a umístěn na led.
2. PI byl rozpuštěn v 1 ml deionizované vody na výslednou koncentraci 250 $\mu$ g/ml.
3. Testované buňky byly opláchnuty ledovým PBS a byla připravena suspenze buněk o koncentraci  $5\times 10^5$  buněk.
4. Vzorky byly stočeny při 1100 ot. na centrifuze JOUAN BRYi (Trigon plus, CZ) o poloměru 9 cm, po dobu 10 min ve 4°C.
5. K odsátému supernatantu bylo přidáno 50  $\mu$ l vazebného pufru. Vzorky byly důkladně protřepány.
6. Obsah zkumavek byl přenesen do zkumavek na ledu a ke každému vzorku bylo přidáno 0,5  $\mu$ l Annexinu V s FITC.
7. Zkumavky byly inkubovány 10 min ve tmě.
8. Po inkubaci bylo ke každému vzorku přidáno 125  $\mu$ l vazebného pufru.
9. Těsně před měřením bylo ke vzorku přidáno 1,25  $\mu$ l PI a vzorek byl změřen.

#### **4.1.10 Epifluorescenční mikroskopie**

Fluorescenční mikroskopie je založena na principu absorpce excitačního záření a následném vyzáření emitovaného záření. Excitační paprsek uvádí molekulu fluorochromu do vzbuzeného stavu. Výsledkem reakce je emise paprsku o delší vlnové délce, než je vlnová délka paprsku excitačního. U epifluorescenčního mikroskopu excitační světlo prochází objektivem, dopadá na preparát a emisní světlo se vrací zpět do objektivu.

##### **4.1.10.1 Postup epifluorescenční mikroskopie**

1. Den před nanesením vzorků byla sklíčka opláchnuta v ethanolu, opálena a pokryta poly-L-lysinem.
2. Vzorky ve zkumavkách byly stočeny na centrifuze JOUAN BRYi (Trigon plus, CZ) o poloměru 9 cm, při 1100 otáčkách po dobu 5 min.
3. Suspenze buněk byla nanesena na prekoutavané sklíčka a sklíčka byla inkubována 15 min v termostatu při 37 °C.
4. Sklíčka byla promyta 2×2 min zahřátým 1×PBS (37 °C).
5. Sklíčka byla inkubována s 4% paraformaldehydem po dobu 10 min.
6. Sklíčka byla promyta 4× v 1×PBS, první oplach pouze lehkým zatřepáním, následující 3×5 min.
7. Na sklíčka byl aplikován permeabilizační roztok. Inkubace probíhala 17 min.
8. Po inkubaci byl zopakován promývací krok dle bodu 6.
9. Na otřená sklíčka byl aplikován blokační roztok. Inkubace probíhala 30 min.
10. Na otřená sklíčka bylo aplikováno 200 µl primární protilátky v blokačním roztoku. Sklíčka byla inkubována s primární protilátkou přes noc v chladničce.
11. Následující den byl opět zopakován promývací krok dle bodu 6.

12. Na otřená sklíčka byl aplikován blokační roztok s donkey sérem. Inkubace probíhala 30 min.
13. Na otřená sklíčka bylo aplikováno 200  $\mu$ l sekundární protilátky v blokačním roztoku. Inkubace probíhala 1 hod ve tmě.
14. Sklíčka byla opět promyta dle bodu 6.
15. Sklíčka byla opláchnuta v 4 $\times$ SSC a na okraj bylo aplikováno 10  $\mu$ l DAPI ve Vectashieldu. Na povrch podložního sklíčka bylo položeno krycí sklíčko.

#### ***4.1.11 Statistické vyhodnocení***

K určení významnosti rozdílu dat byly získané údaje analyzovány testem podle Mann-Whitneyho, za použití programu SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., Erkhart, Německo).

## **4.2 Chemikálie a roztoky**

### ***4.2.1 Roztoky použité při stanovení celkové bílkoviny***

Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma, St. Louis, MI, USA)

- Činidlo A: Roztok bicinchoninové kyseliny (uhličitan sodný, vitan sodný, hydrogenuhličitan sodný v 0,1 M hydroxidu sodném, výsledné pH 11,25)
- Činidlo B: pentahydrát síranu měďnatého (4% roztok)
- Proteinový standard (Bovinní sérum albumin-BSA)
- Deionizovaná voda

### ***4.2.2 Roztoky použité pro lýzu buněk***

Lyzovací pufr

- 137 mmol/l NaCl (800,6 mg)
- 10% Glycerol (10 g)
- 1% Octyl-B-D Glukopyranosid (2 ml)
- 50 mmol/l NaF (210 mg)
- 20 mmol/l TRIS base ph 8,0 (242,28 mg)

- 1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (184 mg/1 ml destilované vody)
- Complete<sup>TM</sup> Mini (tabletky)

#### PBS

- NaCl (8,2 g/l)
- KCl (0,201 g/l)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,204 g/l)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (2,328 g/l)
- Deionizovaná voda

#### PBS s Tweenem 20

- NaCl (8,2 g/l)
- KCl (0,201 g/l)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,204 g/l)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (2,328 g/l)
- Tween 20 (0,05 g/100 ml PBS)
- Deionizovaná voda

### 4.2.3 *Roztoky použité při elektroforéze*

Rozdělovací (12%) a zaostřovací gel (4%)

	<b>12% rozdělovací gel (na 4 gely)</b>	<b>4% zaostřovací gel (na 4 gely)</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	10 ml	6,1 ml
<b>Pufir 1,5M/0,5M</b>	7,5 ml	2,5 ml
<b>Acrylamid</b>	12 ml	1,3 ml
<b>SDS</b>	150 µl	150 µl
<b>APS</b>	75 µl	75 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	7,5 µl

**Tabulka č. 1:** Složení rozdělovacího a zaostřovacího gelu



1,5M TRIS-HCl rozdělovací pufr (pH 8,8)

- TRIS base (36,33 g)
- TRIS-HCL (11,82 g)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 200 ml)

0,5 M TRIS-HCl zaostřovací pufr (pH 6,8)

- TRIS base (6,05 g)
- HCl na úpravu pH
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 100 ml)

3×koncentrovaný SDS pufr (vzorkový pufr)

- 0,5M TRIS-HCl (7,5 ml)
- Glycerol (6 ml)
- SDS (1,38 g)
- Bromidová modř 0,1 % (0,6 ml)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 17 ml)

Rozdělovací pufr (pH 8,3)

- TRIS-base (30 g)
- Glycin (144 g)
- SDS (5 g)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 5000 ml)

#### ***4.2.4 Roztoky použité při Western blottingu***

Methanol

Transfer pufr

- TRIS-base (15,15 g)
- Glycin (72 g)
- Methanol (1000 ml)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 5000 ml)

5% mléko

- potřebný objem TBS-0,05% Tween 20

- 5 % sušeného mléka

5% BSA

- potřebný objem TBS-0,05% Tween 20
- 5 % BSA

10× koncentrovaný TBS (pH 7,6)

- TRIS-base (48,4 g)
- NaCl (160 g)
- 1 M HCl (76 ml)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 2000 ml)

TBS

- ze zásobního roztoku 10× koncentrovaného TBS v poměru TBS:dH<sub>2</sub>O = 1 : 9

TBS-0,05% Tween 20

- 10×TBS (200 ml)
- Tween 20 (1 ml)
- Deionizovaná voda (1800 ml)

ECL

- činidlo A : činidlo B = 100 : 1

Vývojka

Ustalovač

#### **4.2.5 Roztoky použité při strippingu**

Stripping pufr (pH 2,2)

- glycin (7,5 g)
- SDS (0,5 g)
- Tween 20 (5 ml)
- Deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 0,5 l)

#### **4.2.6 Roztoky použité při ELISE**

Vzorkový diluent

Promývací pufr

TMB substrát

STOP roztok

#### **4.2.7 Roztoky použité při APOPTESTU**

1×PBS

- NaCl (8,2 g/l)
- KCl (0,201 g/l)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,204 g/l)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (2,328 g/l)
- Deionizovaná voda

Vazebný pufr

#### **4.2.8 Roztoky použité při epifluorescenční mikroskopii**

1×PBS

- NaCl (8,2 g/l)
- KCl (0,201 g/l)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,204 g/l)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (2,328 g/l)

4% paraformaldehyd

- paraformaldehyd (4 g)
- 1 M NaOH (150  $\mu\text{l}$ )
- 10×PBS (10 ml)
- deionizovaná voda (90 ml)

Permeabilizační roztok

- 1×PBS (70 ml)
- 0,2% Triton-X (140  $\mu\text{l}$ )

Blokační roztok

- FCS (7%)
- BSA (2%)
- $\text{NaN}_3$  (0,02%)
- 1×PBS (dle potřeby)

#### Blokační roztok s oslím sérum

- Donkey (oslí) sérum (5%)
- $\text{NaN}_3$  (0,02%)
- 1×PBS (dle potřeby)

#### 4×SSC

- 20×SSC (80 ml)
- Nonidet (0,4 ml)
- deionizovaná voda (320 ml)

### 4.3 Přístrojové vybavení

- Inkubátor INNOVA CO – 48 (Biotech, Praha, CZ)
- Centrifuga JOUAN CR 312 (Trigon plus, Říčany u Prahy, CZ)
- Centrifuga JOUAN BR 4 (Trigon plus, Říčany u Prahy, CZ)
- Centrifuga JOUAN BRYi (Trigon plus, Říčany u Prahy, CZ)
- Centrifuga MPW-52 (MPW, Varšava, PL)
- Protean3 (Biorad, Praha, CZ)
- Minihybridizér (Boekel Scientific, Pensylvánie, USA)
- UV-VIS Spectrophotometr Helios Alpha (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter, Fullerton, USA)
- Třepačka KS 130 basic (IKA, Staufen, GE)
- Vortex MS2 Minishaker (IKA, Staufen, GE)
- váhy KERN 474-32 (Kern & Sohn GmbH, GE)
- Zahřívací blok VLM LS2 (VLM GmbH, Bielefeld, GE)

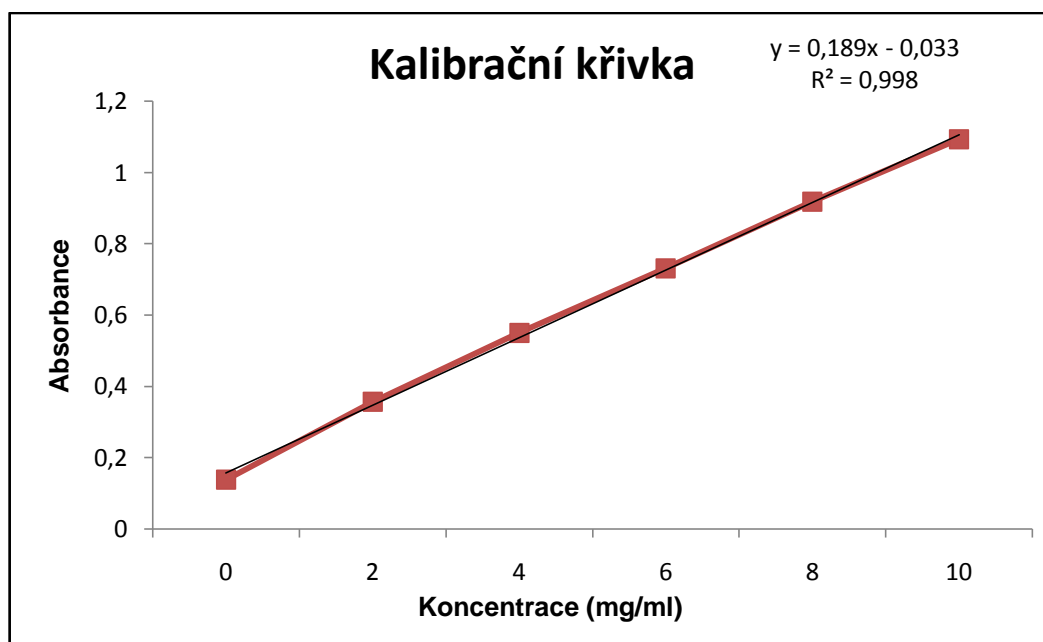
## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení celkové bílkoviny

Pro elektroforézu, Western blotting a ELISU jsme jednotlivé skupiny buněk zlyzovali a změřili jejich koncentrace celkové bílkoviny spektrofometrickým stanovením (kit pro Stanovení celkové bílkoviny bicinchoninovou kyselinou, Sigma, Saint Luis, MS, USA). Každou skupinu buněk jsme proměřili třikrát. Z výsledků jsme vypočítali průměrnou hodnotu celkové bílkoviny a dopočetili vhodnou nanášku vzorku tak, aby množství proteinu bylo ve všech skupinách shodné. Jako sekundární kontrolu nanášky pro elektroforézu jsme navíc použili detekci integrálního cytoskeletálního proteinu  $\beta$ -aktinu, která byla provedena před započítáním dalších experimentů.

skupina	1.měření (mg/ml)	2.měření (mg/ml)	3.měření (mg/ml)	průměr (mg/ml)
2h kontrola	3,001	2,817	2,765	2,861
2h 1 $\mu$ M NU7441	3,023	2,745	2,787	2,852
2h 1Gy	3,058	2,962	3,165	3,062
2h 1Gy + 1 $\mu$ M NU7441	3,099	2,887	3,101	3,029
24h kontrola	4,069	4,133	3,926	4,043
24h 1 $\mu$ M NU7441	3,742	3,536	3,708	3,662
24h 1Gy	2,836	2,778	3,036	2,883
24h 1Gy + 1 $\mu$ M NU7441	2,421	2,518	2,488	2,476
72h kontrola	8,952	8,295	8,577	8,608
72h 1 $\mu$ M NU7441	8,090	7,891	8,738	8,240
72h 1Gy	5,444	5,335	5,352	5,377
72h 1Gy + 1 $\mu$ M NU7441	2,852	2,728	2,817	2,799

**Tabulka č. 2:** Příklad měření a výpočtu průměru koncentrace celkové bílkoviny v jednotlivých skupinách (ELISA)



**Graf č. 1:** Reprezentativní kalibrační křivka

skupina	průměr (mg/ml)	nanáška vzorku (μl)
2h kontrola	2,861	17,476
2h 1 μM NU7441	2,852	17,532
2h 1Gy	3,062	16,330
2h 1Gy + 1 μM NU7441	3,029	16,506
24h kontrola	4,043	12,368
24h 1 μM NU7441	3,662	13,654
24h 1Gy	2,883	17,342
24h 1Gy + 1 μM NU7441	2,476	20,197
72h kontrola	8,608	5,809
72h 1 μM NU7441	8,240	6,068
72h 1Gy	5,377	9,299
72h 1Gy + 1 μM NU7441	2,799	17,864

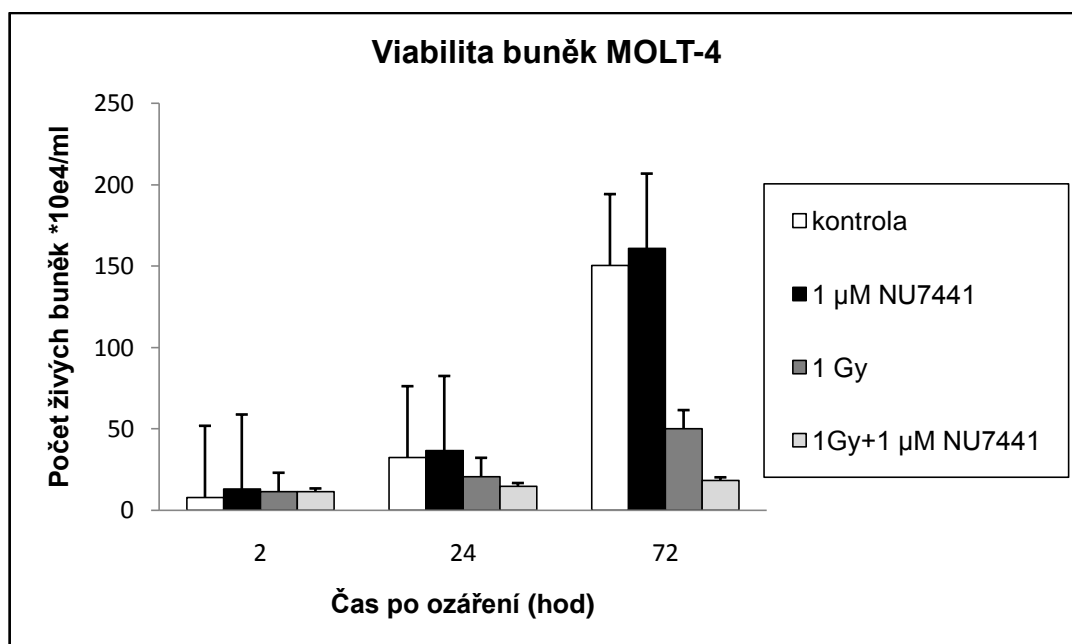
**Tabulka č. 3:** Dopočítání nanášky vzorku pro ELISU

## 5.2 Viabilita buněk MOLT-4

V této práci byly použity buňky T lymfocytární leukémie (MOLT-4), které byly získány z Americké sbírky buněčných kultur. Buňky byly během pokusu rozděleny do čtyř skupin. První z nich sloužila jako kontrola a nebyla ovlivněna žádným stimulem. Druhá skupina byla vystavena účinku samotného inhibitoru

NU7441 o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Třetí skupina byla ozářena dávkou 1 Gy, která není pro buňky cytotoxická. Poslední ze skupin byla vystavena vlivu obou nox, tedy záření o dávce 1 Gy a inhibitoru NU7441 v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Buňky byly následně inkubovány v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Viabilita buněk byla hodnocena po 2, 24 a 72 hod po ozáření.

V grafu č. 2 je vyjádřena závislost počtu živých buněk na době inkubace buněk po ozáření. Původní množství buněk bylo  $1,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ . U 2 hod intervalu nepozorujeme významné změny v počtu buněk od počátečního stavu. Po 24 hod inkubace dochází k nárůstu živých buněk ve všech skupinách kromě poslední skupiny, která je ovlivněná kombinací záření a inhibitoru. V této skupině zůstává počet buněk přibližně shodný s předchozím časovým intervalem. Největší množství buněk se nachází u skupiny ovlivněné pouze inhibitorem. V intervalu 72 hod po ozáření dochází k masivnímu nárůstu buněk u kontrolní skupiny a skupiny s inhibitorem. U skupiny ozářené dávkou 1 Gy dochází také k nárůstu buněk oproti předchozímu intervalu. Ve srovnání s kontrolou nebo skupinou s inhibitorem je ale nárůst buněk podstatně nižší. Nejmenší proliferaci buněk pozorujeme u skupiny ovlivněné kombinací obou nox, kde se množství buněk příliš nezvýšilo oproti předchozímu časovému intervalu. Skupiny buněk vystavené účinkům jak záření, tak inhibitoru mají tedy v průběhu všech časových intervalů přibližně stejný počet živých buněk. Při kombinaci těchto nox dochází k útlumu proliferace buněk MOLT-4; naproti tomu samotný inhibitor takovýto účinek nevykazuje.



**Graf č. 2:** Viabilita buněk MOLT-4 po expozici inhibitoru NU7441, IZ a kombinaci obou nox. V časovém intervalu 2 hod po ozáření se množství buněk ve skupinách příliš neliší. Po 24 hod dochází k menšímu nárůstu u kontroly a buněk s inhibítorem. U buněk analyzovaných 72 hod po ozáření dochází k útlumu proliferace buněk ozářených a ovlivněných kombinací, přičemž množství buněk ovlivněných kombinací stagnuje ve všech časových intervalech.

### 5.3 Vliv záření a inhibitoru NU7026 na expresi Mcl-1, Laminu B a Akt-kinázy

Buňky MOLT-4 byly v tomto experimentu vystaveny působení inhibitoru NU7026 v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  nebo záření o dávce 1 Gy. K posouzení současného vlivu záření a inhibitoru byly buňky vystaveny oběma noxám. Na obr. č. 6 jsou vyobrazeny snímky proteinů analyzovaných metodou Western blotting.

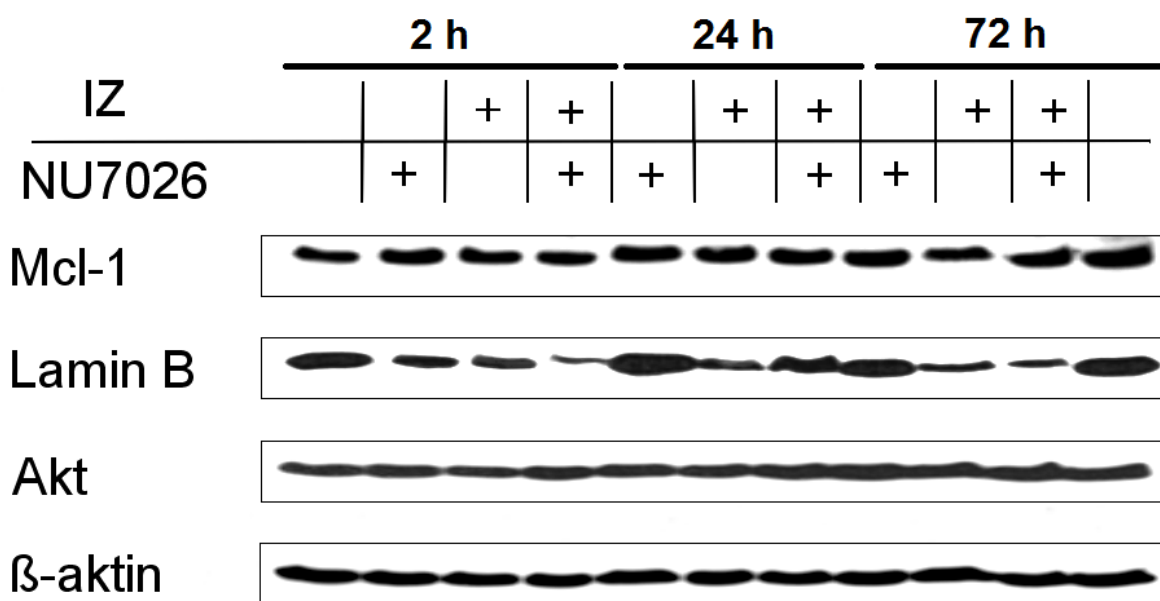
U buněk analyzovaných 2, 24 i 72 hod po ozáření nenacházíme žádné významné rozdíly v množství anti-apoptického proteinu Mcl-1 mezi jednotlivými skupinami. Neovlivňuje jej ani záření, přidaný inhibitor či jejich kombinace.

Dále jsme sledovali pokles Laminu B, jakožto známky apoptického procesu. V intervalu 2 hod po ozáření pozorujeme úbytek množství proteinu ve všech skupinách vzhledem ke kontrole. Nejmenší množství proteinu je ve skupině ovlivněné oběma noxami. U buněk analyzovaných 24 hod po ozáření pozorujeme ve skupině pouze ozářené pokles proteinu. Ve skupině ovlivněné kombinací nox se nám pokles Laminu B prokázat nepodařilo. 72 hod po ozáření je množství proteinu přibližně shodné u kontroly a buněk s inhibítorem. Úbytek proteinu nastává po samotném ozáření a po působení obou nox je úbytek nepatrně intenzivnější.



V našich výsledcích nepozorujeme žádné významné změny v množství Akt proteinu mezi skupinami v jednom časovém intervalu ani mezi jednotlivými intervaly navzájem.

Posledním z analyzovaných proteinů je  $\beta$ -aktin. Jedná se o protein, kterým hodnotíme správnost nanášky. Při shodné nanášce by měl být  $\beta$ -aktin ve všech vzorcích přibližně stejně exprimován, jak je tomu u našich výsledků (viz výše).



**Obr. č. 6:** Fotografické snímky proteinů účastnících se procesů spouštěných poškozením DNA. Množství Mcl-1 a Akt kinázy se příliš nemění. V intervalu 2 hod po ozáření se množství Laminu B postupně mezi skupinami snižuje. Zvýšený výskyt proteinu 24 hod po ozáření je u buněk ovlivněných inhibítorem, u ozářených je množství menší, u kombinace nedochází k poklesu. 72 hod po ozáření pozorujeme úbytek proteinu u buněk ozářených a ovlivněných kombinací.

## 5.4 Vliv záření a inhibitoru NU7441 na expresi proteinů spojených s reparací DNA a indukcí apoptózy

### 5.4.1 Metoda Western blotting

Buňky MOLT-4 byly v tomto pokusu rozděleny do čtyř skupin jako u předešlého experimentu. Inhibitor NU7026 byl nahrazen inhibítorem NU7441 o koncentraci 1  $\mu$ mol/l. Analyzované proteiny jsou vyobrazeny na fotografických snímcích na obr. č. 7.

Dle našich výsledků se množství proteinů Ku70 ani Ku80 příliš nemění v závislosti na použité noxe a je srovnatelné s množstvím těchto proteinů v kontrolách. Nepozorujeme ani žádnou změnu v závislosti na čase s výjimkou proteinu Ku80, jehož exprese se mírně snižuje 72 hod po ozáření u kombinace nox.

V našich výsledcích pozorujeme výrazné zvýšení proteinu p53 po ozáření dávkou 1 Gy a ve skupině buněk ovlivněné jak zářením, tak inhibitorem NU7441. Toto zvýšení pozorujeme ve všech časových intervalech, nedochází však ke změnám množství proteinu v těchto skupinách v průběhu času. Také množství p53 ve skupině 1 Gy a ve skupině s kombinací obou nox se od sebe výrazně neliší. V kontrole a u buněk ovlivněných pouze inhibitorem nenacházíme signifikantní navýšení.

U fosforylované formy p53 na Ser 392 sledujeme signifikantní nárůst proteinu u buněk ozářených a buněk ovlivněných zářením i inhibitorem v čase 2 a 24 hod po ozáření. V čase 72 hod po ozáření dochází u těchto skupin k výraznému poklesu proteinu v porovnání se skupinami z předchozích časových intervalů a množství proteinu je ekvivalentní k množství v kontrolách nebo skupině ovlivněné pouze inhibitorem. Stejně malé množství proteinu v kontrolách a skupině s inhibitorem nacházíme i u intervalu 2 a 24 hod. Maximum fosforylovaného p53 na Ser 392 tedy nalézáme po 2 a 24 hod po ozáření u skupiny ozářených buněk a buněk ovlivněných kombinací nox.

U pro-apoptického proteinu Bad v intervalu 2 hod po ozáření dochází opět k nepříliš výrazným změnám v množství proteinu. V intervalu 24 hod po ozáření pozorujeme snížené množství proteinu ve skupině buněk ovlivněné inhibitorem i zářením. U buněk analyzovaných 72 hod po ozáření dosahuje protein maxima v kontrolní skupině a skupině ovlivněné pouze inhibitorem. Ve skupině ozářené se množství proteinu nepatrně snižuje. Ve skupině ovlivněné oběma noxami je množství proteinu mírně nižší než u ostatních skupin.

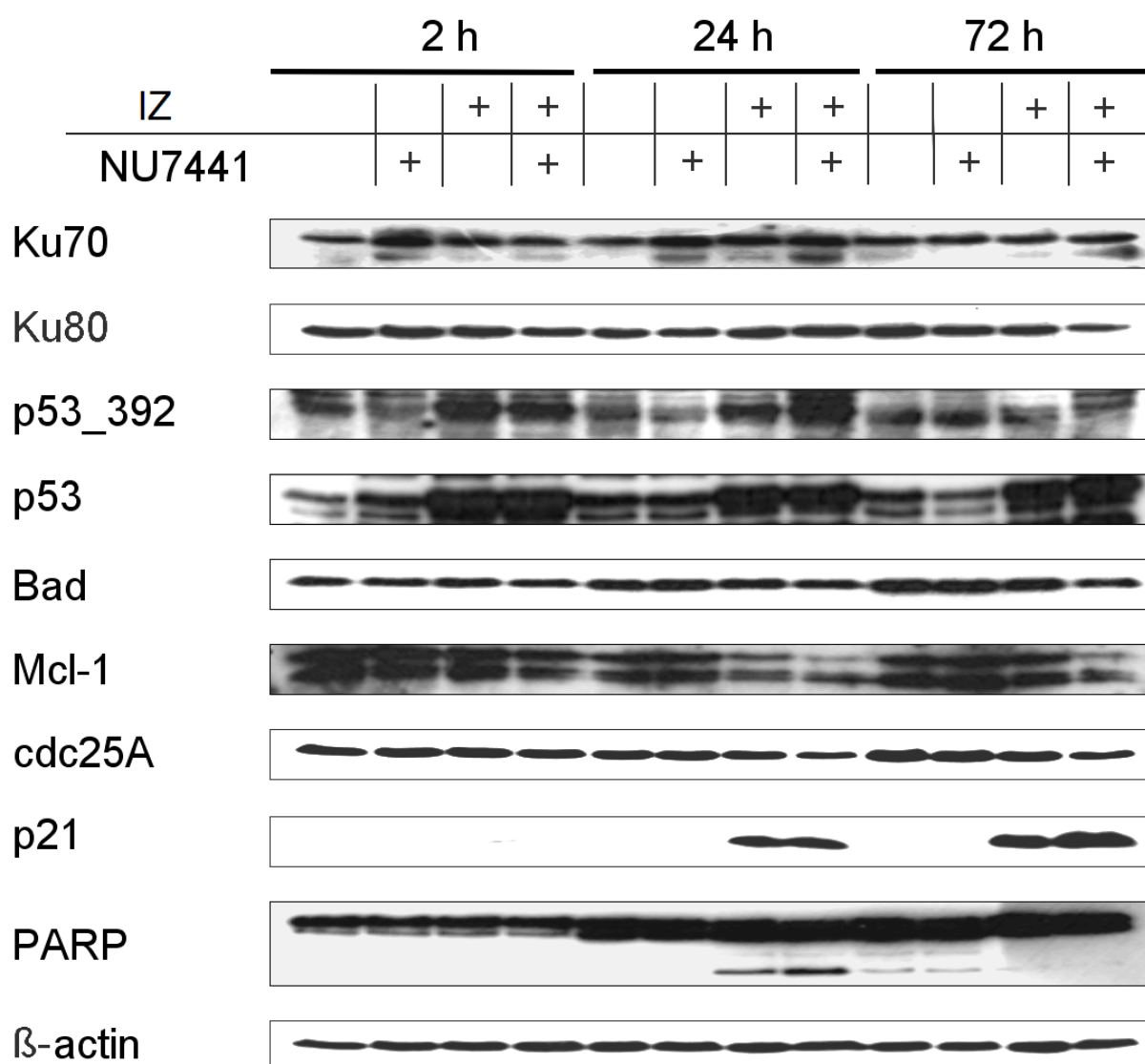
V časovém intervalu 2 hod po ozáření nedochází k výrazným změnám v množství anti-apoptického proteinu Mcl-1. U buněk analyzovaných 24 hod po ozáření pozorujeme sníženou hladinu proteinu ve skupině ozářené a ve skupině ovlivněné oběma noxami, přičemž množství Mcl-1 u buněk ovlivněných oběma noxami je nižší než u buněk ozářených. V intervalu 72 hod po ozáření nedochází k výrazným změnám v množství proteinu mezi kontrolou a skupinami ovlivněnými inhibitorem nebo zářením. Při kombinaci obou nox však dochází k úbytku proteinu stejně jako v předchozím časovém intervalu.

U proteinu cdc25A ve skupině buněk analyzovaných 2 hod po ozáření nedochází dle našich výsledků k výrazným změnám v množství proteinu. V intervalu 24 hod po ozáření pozorujeme pokles proteinu ve skupině ovlivněné oběma noxami.

Množství proteinu v ostatních skupinách je přibližně shodné. Mírně snížené množství proteinu cdc25A v intervalu 72 hod se nachází u poslední skupiny (kombinace), stejně jako u předchozího intervalu.

V časovém intervalu 2 hod po ozáření nenalzáme žádný výskyt proteinu p21 v jakékoliv skupině. U buněk analyzovaných 24 hod po ozáření jsme protein prokázali u skupiny ovlivněné dávkou 1 Gy záření a u skupiny ovlivněné kombinací záření a inhibitoru. Množství proteinu je přibližně shodné. U intervalu 72 hod po ozáření se protein vyskytuje ve stejných skupinách jako v předešlém intervalu. Množství proteinu u kombinace je vyšší než u skupiny pouze ozářené.

Po 2 hod od ozáření v našich výsledcích nepozorujeme žádné změny v množství proteinu PARP v rámci skupiny. U intervalu 24 hod po ozáření dochází ke štěpení proteinu PARP, a to ve skupině ozářené a ve skupině ovlivněné zářením i inhibitorem. U kontroly a skupiny vystavené účinku samotného inhibitoru štěpy nepozorujeme. Ve skupině buněk analyzovaných 72 hod po ozáření se štěpy nenachází v žádné ze skupin buněk a množství proteinu je přibližně stejné.

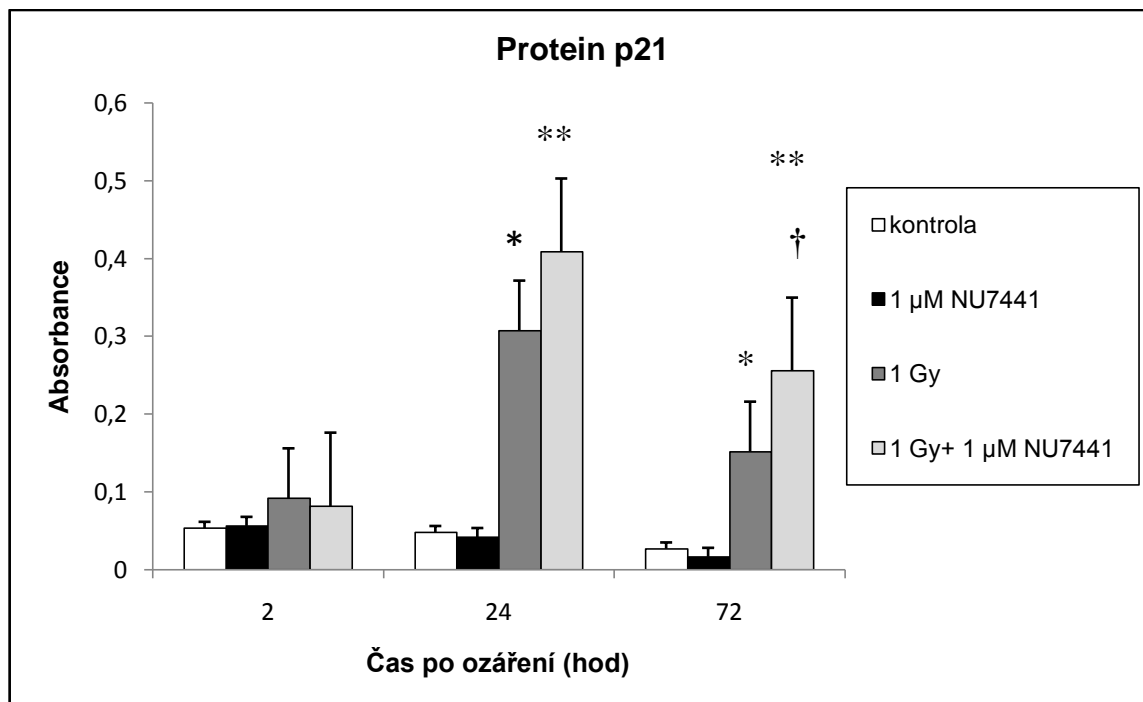


**Obr. č. 7:** Fotografické snímky proteinů účastnících se procesů spouštěných poškozením DNA. Množství Ku70/80 se příliš nemění. U proteinu p53 a jeho fosforylaci na Ser 392 pozorujeme nárůst po ozáření a u skupin s kombinací. Množství pro-apoptotického proteinu Bad se po kombinaci výrazně nemění, avšak množství anti-apoptotického Mcl-1 se po kombinaci obou nox významně snižuje a vede ke štěpení proteinu PARP. U kinázy cdc25A pozorujeme mírný pokles po kombinaci za 24 a 72 hod po ozáření. Záření a kombinace s inhibítorem způsobují up-regulaci p21 24 a 72 hod po ozáření.

#### 5.4.2 Metoda ELISA

Metodou ELISA jsme analyzovali dva proteiny: p21 a p53 Ser 15. Vzorky jsme rozdělili do čtyř skupin jako u předchozího experimentu. Tedy kontrola, buňky ovlivněné inhibítorem NU7441 v koncentraci 1 μmol/l, buňky ozářené dávkou 1 Gy a buňky vystavené oběma noxám. Buňky jsme analyzovali za 2, 24 a 72 hod po ozáření.

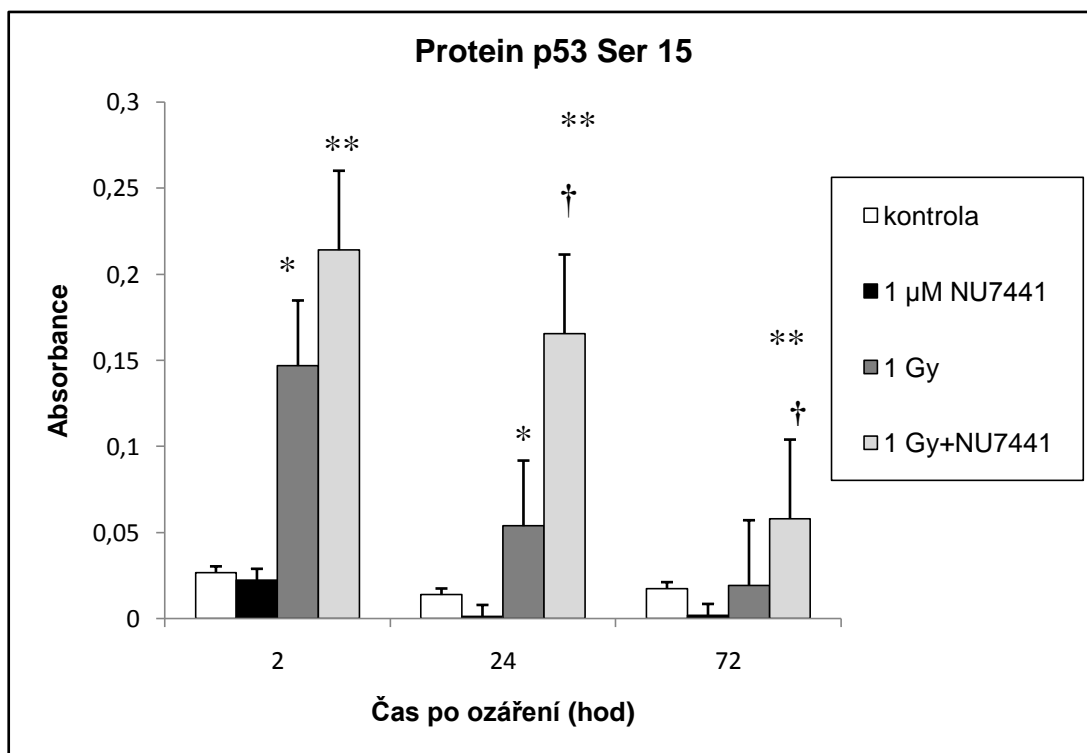
Množství proteinu p21 je zobrazeno v grafu č. 3. V časovém intervalu 2 hod po ozáření se množství proteinu statisticky významně neliší mezi jednotlivými skupinami. V intervalu 24 hod po ozáření nalézáme maximum proteinu u skupiny vystavené účinkům oběma noxám. Buňky ozářené a buňky ovlivněné oběma noxami vykazují signifikantní nárůst proteinu vůči kontrolní skupině. U buněk analyzovaných 72 hod po ozáření pozorujeme obdobné výsledky. Největší množství proteinu se nachází opět u skupiny ovlivněné kombinací nox. U skupiny ozářené je množství proteinu nižší než u kombinace, ale signifikantně vyšší než u kontroly. V tomto časovém intervalu je však celkově množství proteinu p21 nižší než u předchozího časového intervalu. Maximum proteinu p21 tedy dle našich výsledků pozorujeme u skupiny ovlivněné kombinací nox v časovém intervalu 24 hod po ozáření. Tyto výsledky korelují s analýzou proteinu p21 metodou Western blotting, kde jsme pozorovali maximum proteinu u skupin buněk ozářených a ovlivněných kombinací nox v časovém intervalu 24 a 72 hod po ozáření. Statisticky významný nárůst v hladině proteinu p21 mezi kontrolou a ozářením (1 Gy), stejně jako mezi kontrolou a kombinací nox jsme pozorovali 24 a 72 hod po ozáření. Mezi buňkami pouze ozářenými a ovlivněnými kombinací nox jsme zhodnotili staticky významný nárůst proteinu u buněk analyzovaných 72 hod po ozáření.



**Graf č. 3:** Množství proteinu p21 se v časovém intervalu 2 hod po ozáření statisticky významně nemění. 24 hod po ozáření dochází k nárůstu p21 vůči kontrole u skupiny jak ozářené, tak vystavené kombinaci, přičemž nejvyšší množství je u kombinace. V intervalu 72 hod po ozáření celkově klesá hladina p21, nejvyšší je opět u kombinace. Kromě toho, že pozorujeme statisticky významný nárůst množství p21 ve skupině ozářené a vystavené kombinaci vůči kontrole, je zde statisticky významný nárůst i u skupiny s kombinací v porovnání s buňkami, které byly pouze ozářené. Signifikantní rozdíl mezi kontrolou a 1 Gy  $p < 0,05$  \*. Signifikantní rozdíl mezi kontrolou a kombinací  $p < 0,05$  \*\*. Signifikantní rozdíl mezi 1 Gy a kombinací  $p < 0,05$  †.

Na grafu č. 4 jsou zobrazeny změny v množství fosforylovaného proteinu p53 Ser 15. V intervalu 2 hod po ozáření dochází k nárůstu proteinu ve skupině ozářené a skupině ovlivněné oběma noxami, přičemž množství proteinu u buněk ovlivněných kombinací je vyšší. Množství proteinu mezi kontrolou a skupinou ovlivněnou pouze inhibítorem se statisticky neliší. V časovém intervalu 24 hod po ozáření dochází k úbytku proteinu ve všech skupinách vzhledem k předchozímu časovému intervalu. Nejmenší množství proteinu pozorujeme u skupiny ovlivněné pouze inhibítorem. U kontroly je množství proteinu nepatrně vyšší. Množství p53 Ser 15 statisticky významně vzrůstá u buněk ozářených a ovlivněných oběma noxami. Vyšší množství proteinu je u kombinace. U buněk analyzovaných 72 hod po ozáření se hladina proteinu u buněk ovlivněných pouze inhibítorem a stejně tak u kontroly příliš nemění od předešlého časového intervalu. Množství proteinu u skupiny ozářené a kombinace je menší než u intervalu 24 hod po ozáření. U kombinace je množství proteinu opět

vyšší, stejně jako v předchozích časových intervalech. Dle zhodnocení testem Mann-Whitney jsme pozorovali statisticky významný nárůst hladiny p53 Ser 15 mezi kontrolou a ozářenými buňkami 2 a 24 hod po ozáření. Nárůst mezi kontrolou a kombinací nox je dle statistiky významný ve všech časových intervalech. Mezi buňkami pouze ozářenými a ovlivněnými kombinací nox je významný nárůst proteinu u buněk analyzovaných 24 a 72 hod po ozáření.



**Graf č. 4:** Maximum proteinu p53 Ser 15 jsme pozorovali 2 hod po ozáření u kombinace. V dalších časových intervalech dochází k úbytku proteinu, přesto maxima p53 Ser 15 pozorujeme ve všech časových intervalech vždy u kombinace. Statisticky významný nárůst proteinu u buněk ozářených vůči kontrole je patrný 2 a 24 hod po ozáření. Při srovnání kombinace vůči kontrole je nárůst patrný ve všech časových intervalech. Statisticky významný nárůst proteinu u kombinace vůči buňkám pouze ozářeným jsme pozorovali 24 a 72 hod po ozáření. Signifikantní rozdíl mezi kontrolou a 1 Gy  $p < 0,05$  \*. Signifikantní rozdíl mezi kontrolou a kombinací  $p < 0,05$  \*\*. Signifikantní rozdíl mezi 1 Gy a kombinací  $p < 0,05$  †.

### 5.4.3 Metoda průtokové cytometrie

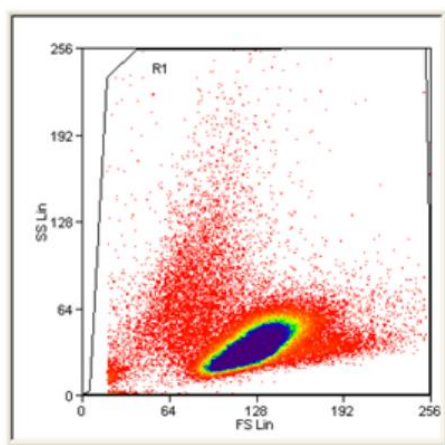
Pro detekci apoptózy jsme použili APOPTTEST, který je založen na detekci vazby Annexinu V a PI. Annexin V má schopnost se vázat k PS. Za normálních okolností se PS nachází na vnitřní straně buněčné membrány a Annexin V se není schopen navázat. V časných fázích apoptózy PS přechází na vnější stranu membrány, kde ho můžeme detekovat navázáním Annexinu V konjugovaným s FITC. S pokročilým stádiem apoptózy se exprese PS na vnější membráně zvyšuje. PI je

schopen procházet porušenou membránou buňky a navázat se na DNA a RNA. Membrána se stává průchozí pro PI až v pozdní fázi apoptózy. Je-li detekován v buňkách PI a Annexin V nikoliv, jedná se o nekrózu. Metodou je možné detekovat jak časně, tak i pozdně apoptické buňky.

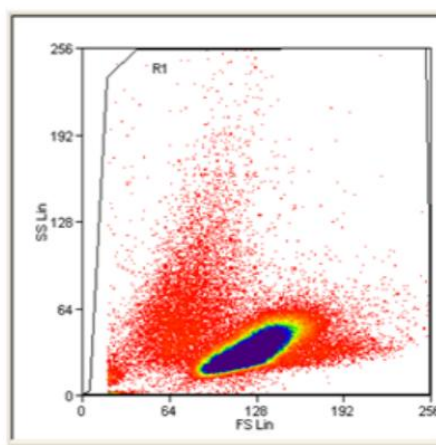
Morfologické změny související s průběhem apoptózy jako buněčné sraštění, tvorba výčnělků na plazmatické membráně (označovaných jako “blebs”), jaderná fragmentace, tvorba apoptických tělísek a následně buněčná desintegrace, mohou být srovnávány se změnami rozptylu světelného signálu v průtokovém cytometru. Analýza rozptylu světla dává informaci o velikosti a struktuře buňky. Zatímco intenzita světelného rozptylu v předním “forward” (FS) směru dobře koreluje s velikostí buněk, intenzita světelného rozptylu měřená v pravém úhlu “side” směru (SS) dobře koreluje s granularitou.

Na obr. č. 8 jsou vyobrazeny změny v granularitě a velikosti buněk mezi jednotlivými skupinami v časovém intervalu 24 hod po ozáření. Mezi kontrolou a buňkami ovlivněnými pouze inhibitorem nedochází k velkým rozdílům. Ve skupině buněk ozářených je dobře patrné, jak se granularita buněk oproti předchozím skupinám zvyšuje. Vzdůstá i počet buněk o menší velikosti. U buněk ovlivněných kombinací vidíme výrazné zmenšení objemu buněk a nárůst granularity, které svědčí o probíhajícím apoptickém procesu.

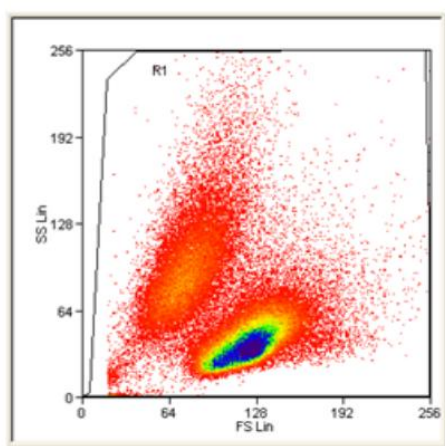




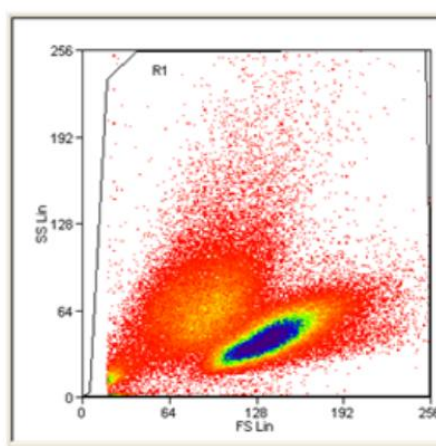
**Kontrola**



**1 μM NU7441**



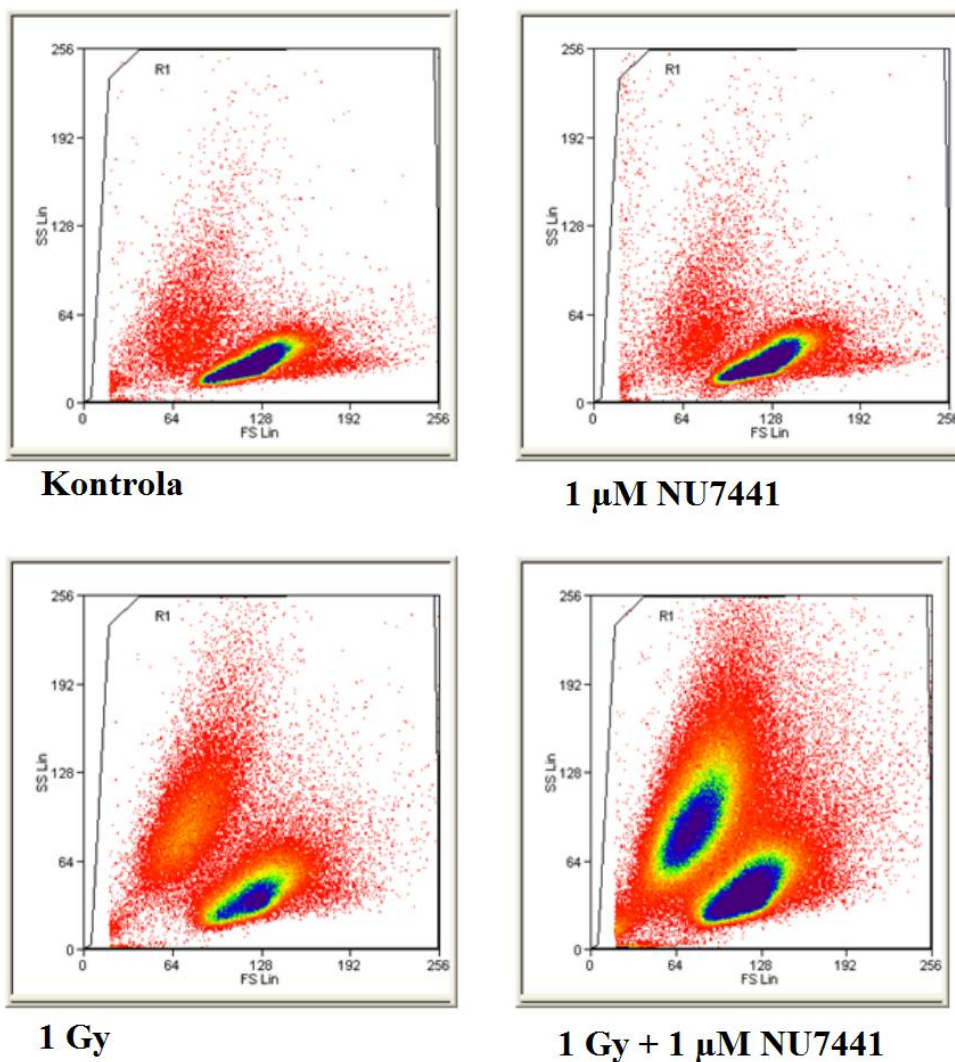
**1 Gy**



**1 Gy + 1 μM NU7441**

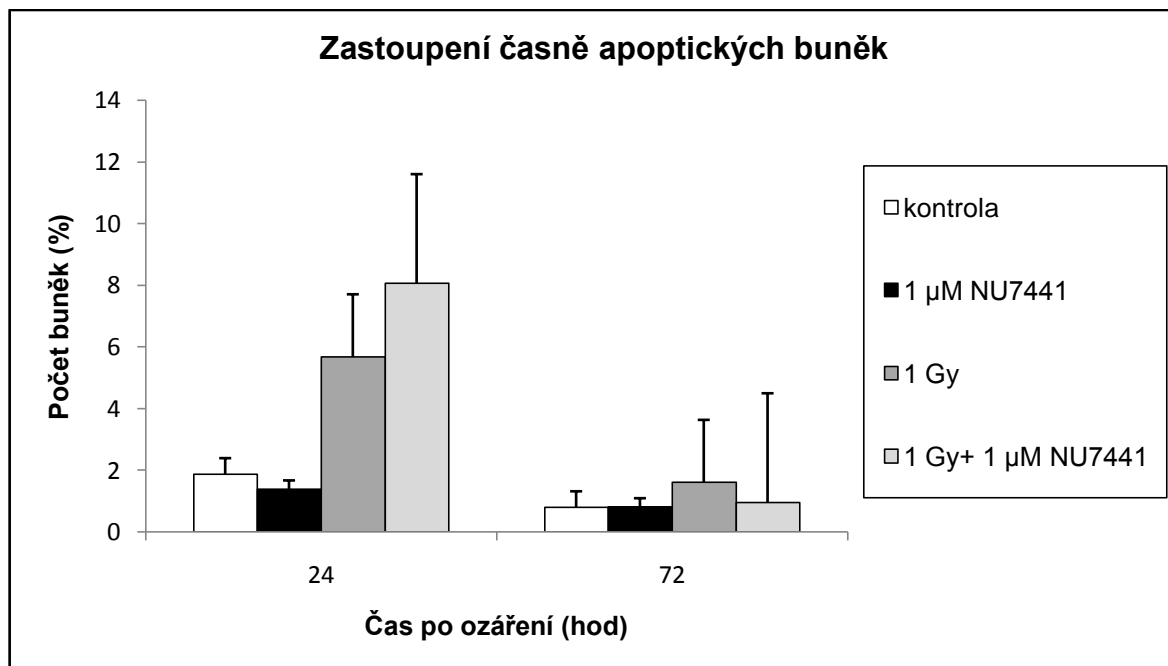
**Obr. č. 8:** Rozdíly v granularitě a velikosti buněk 24 hod po ozáření. U kontroly a samotného inhibitoru nedochází k příliš velkým změnám. U buněk ozářených se zvyšuje granularita buněk a jejich velikost je menší. U kombinace se tyto projevy objevují ještě ve větší míře.

Na obr. č. 9 pozorujeme změny v granularitě a velikosti buněk 72 hod po ozáření. Stejně jako v předchozí skupině rozdíly mezi kontrolou a buňkami, na něž byl aplikován pouze inhibitor, jsou nepatrné. Největší výskyt buněk je opět v oblasti charakteristické pro nepoškozené buňky. U buněk ozářených dochází k velkému nárůstu granularity oproti předchozím skupinám. Objem buněk je také menší. U skupiny vystavené působení obou nox pozorujeme výrazné zvýšení počtu buněk o menší velikosti a vyšší granularitě. Nejvyšší granularitu a zároveň zmenšení objemu buněk tedy pozorujeme u skupiny ovlivněné kombinací nox 72 hod po ozáření.



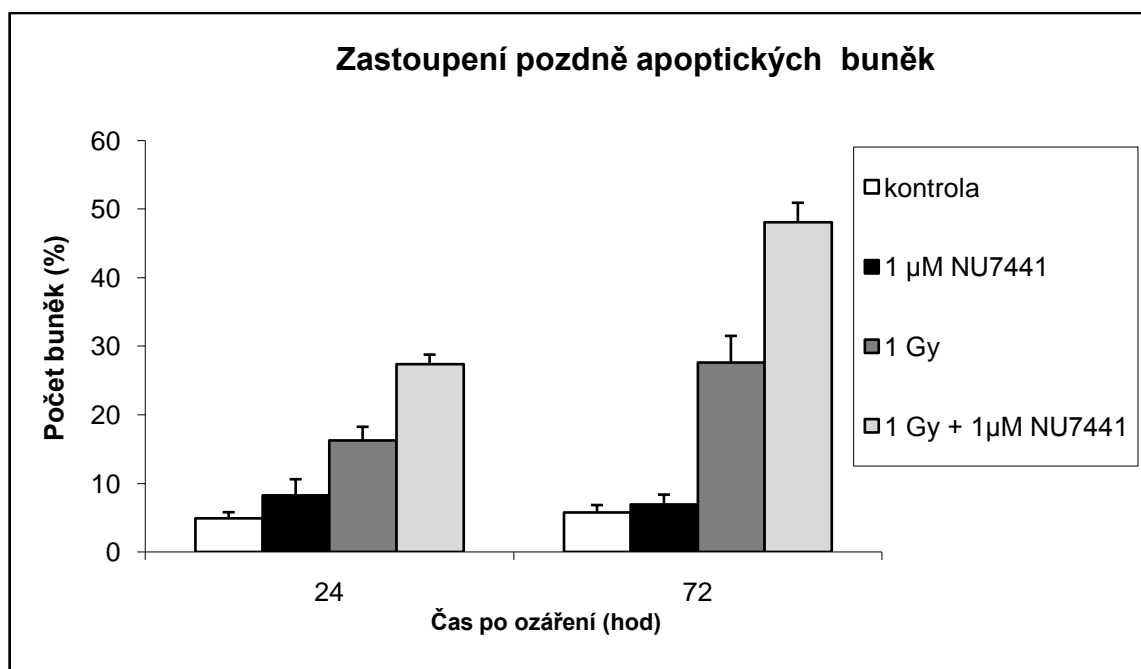
**Obr. č. 9:** Rozdíly v granularitě a velikosti buněk 72 hod po ozáření. U kontroly a buněk pouze s inhibitorem nedochází ke změnám. U buněk ozářených stoupá množství buněk o menší velikosti a vyšší granularitě. Buňky ovlivněné kombinací vykazují maximum takto pozměněných buněk.

Dle grafu č. 5 se největší množství časně apoptických buněk vyskytuje v intervalu 24 hod po ozáření, a to ve skupině ovlivněné kombinací obou nox (8,06%). Ve skupině buněk pouze ozářených pozorujeme také nárůst časné apoptózy, ale nižší než u kombinace (5,68%). V kontrole a buňkách ovlivněných pouze inhibitorem nedochází k příliš velkému nárůstu apoptózy (1,86% a 1,39%). V časovém intervalu 72 hod po ozáření se maximum časně apoptických buněk nachází ve skupině ozářené (1,61%). Množství je však nižší než u předchozího časového intervalu. Ostatní skupiny nevykazují příliš významný apoptický proces (hodnoty jsou pod 1%).



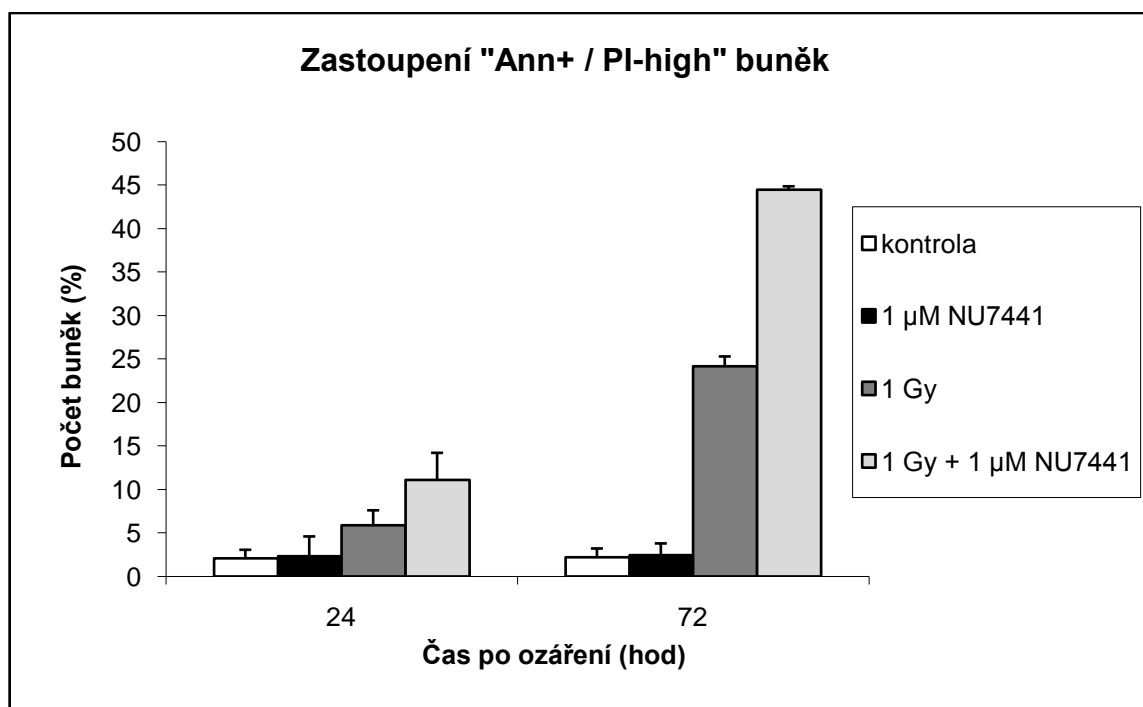
**Graf č. 5:** Zvýšené množství časně apoptických buněk nacházíme u buněk ozářených a ovlivněných kombinací 24 hod po ozáření. Množství těchto buněk je u kombinace vyšší. V časovém intervalu 72 hod po ozáření se množství časně apoptických buněk markantně snižuje, nejvyšší je u skupiny ozářené.

Na grafu č. 6 je vyobrazeno procentuální zastoupení pozdně apoptických buněk. V intervalu 24 hod po ozáření dochází k postupnému nárůstu množství pozdně apoptických buněk mezi skupinami. V kontrole je pozdně apoptických buněk nejméně (4,92%). Ve skupině s inhibitorem dochází k menšímu nárůstu pozdně apoptických buněk (8,21%). U ozářených buněk pozorujeme zvýšení těchto buněk na dvojnásobnou hodnotu oproti předchozí skupině (16,44%). Poslední ze skupin má nejvyšší množství pozdně apoptických buněk (27,38%). V intervalu 72 hod po ozáření se množství pozdně apoptických buněk u kontroly a skupiny ovlivněné pouze inhibitorem příliš nemění (5,78% a 6,88%). U buněk ozářených dochází k velkému nárůstu pozdně apoptických buněk oproti předchozím skupinám (27,6%). Množství je vyšší než u stejné skupiny v předešlém časovém intervalu. Maximum pozdně apoptických buněk se nachází u skupiny buněk ovlivněných oběma noxami (48,13%).



**Graf č. 6:** Ve 24 hod intervalu dochází k postupnému nárůstu pozdně apoptických buněk, maximum je u kombinace. V intervalu 72 hod po ozáření pozorujeme masivní nárůst pozdně apoptických buněk u skupiny ozářené a ovlivněné kombinací. U kombinace je množství těchto buněk opět vyšší.

Zajímavé je stanovení populace buněk Annexin V-pozitivních s velmi vysokým obsahem PI. Tyto buňky mají již velmi rozrušenou cytoplazmatickou membránu a jsou v terminálním stádiu apoptózy těsně před desintegrací. Na grafu č. 7 pak můžeme dobře pozorovat signifikantní vliv kombinace obou nox v intervalu 72 hod po ozáření a tedy i výraznou potenciací účinku.

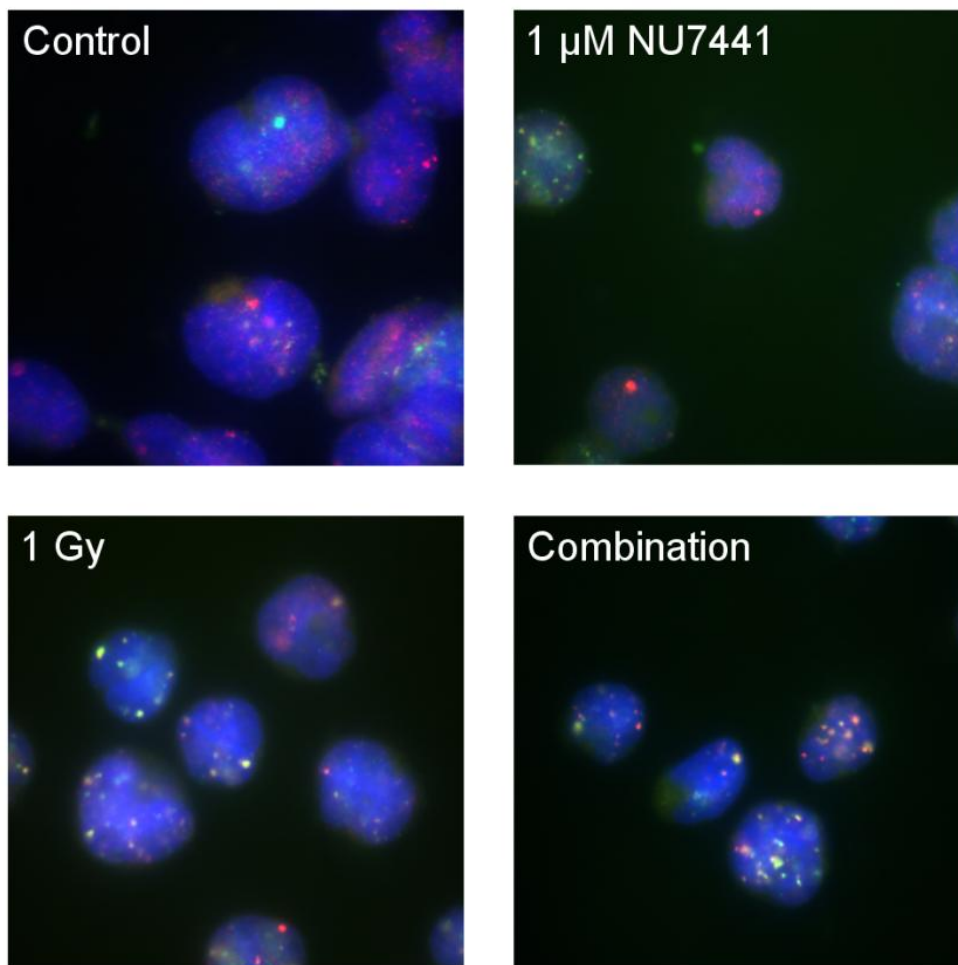


**Graf č. 7:** Zastoupení „Ann+/PI-high“ buněk se zvyšuje v závislosti na čase. U kombinace je množství těchto buněk výrazně vyšší oproti ostatním skupinám

#### 5.4.4 Metoda epifluorescenční mikroskopie

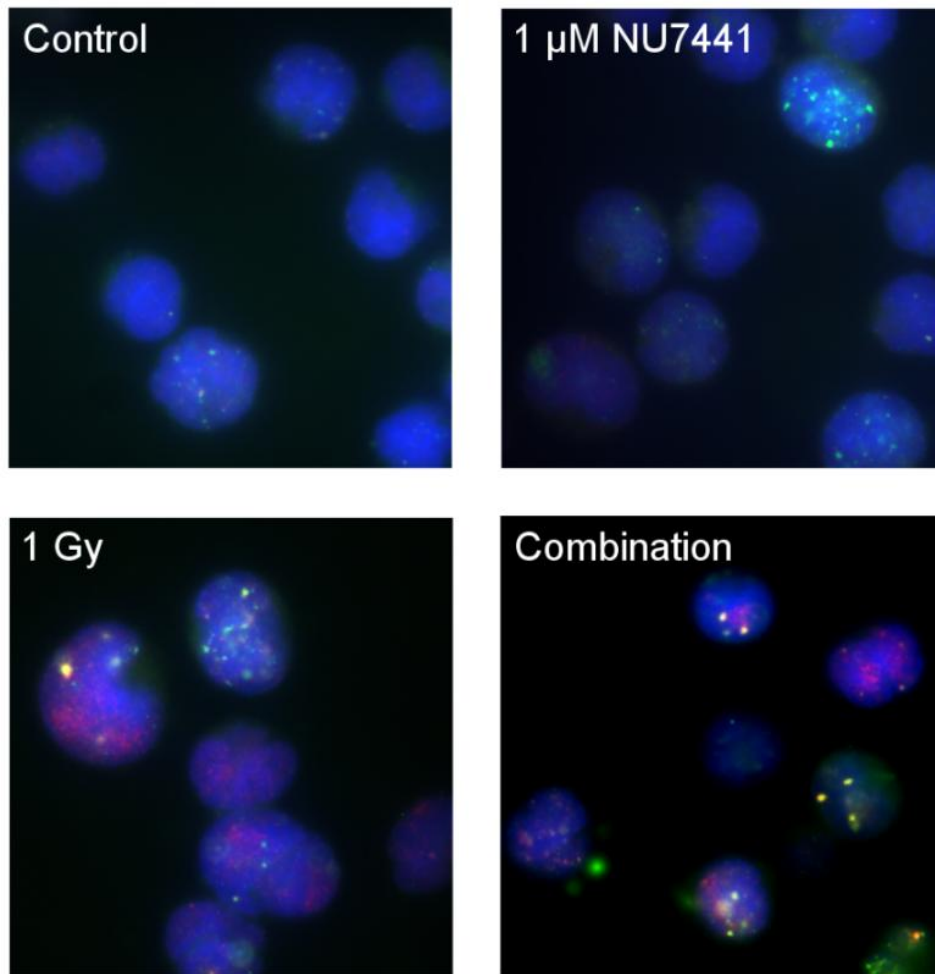
Za použití epifluorescenční mikroskopie jsme provedli experiment založený na prokázání kolokalizace fosforylovaného histonu  $\gamma$ H2AX a proteinu 53BP1 v ložiskách indukovaných IZ (ionizing radiation-induced foci; IRIF), jejichž výskyt koreluje s poškozením DNA. Histon  $\gamma$ H2AX je označen anti-myší FITC protilátkou. Na snímcích je zobrazen zeleně. Protein 53BP1 je označen anti-králičí Cy3 protilátkou a na snímcích je zobrazen červeně. V případě současného výskytu  $\gamma$ H2AX a 53BP1 ohnisko svítí žlutě.

Na obr č. 10 jsou vyobrazeny mikroskopické snímky buněk analyzovaných 2 hod po ozáření. U kontroly a skupiny ovlivněné pouze inhibitorem nepozorujeme společné ložisko  $\gamma$ H2AX a 53BP1. U buněk ozářených a buněk ovlivněných kombinací obou nox dochází k výskytu těchto ložisek. U kombinace je množství těchto ložisek vyšší.



**Obr. č. 10:** Mikroskopické snímky buněk 2 hod po ozáření prokazují kolokalizaci proteinů  $\gamma$ H2AX a 53BP1 ve skupině ozářené a skupině ovlivněné kombinací, kde je těchto ložisek více.

U buněk analyzovaných 24 hod po ozáření (obr. č. 11) nacházíme obdobné výsledky. Buňky kontrolní a buňky ovlivněné pouze inhibítorem nevykazují výskyt obou proteinů současně. Ve skupině ozářené výskyt těchto ložisek již můžeme pozorovat. U buněk ovlivněných jak inhibítorem, tak zářením se množství těchto ložisek zvyšuje. Množství těchto ložisek u obou popsaných skupin (1 Gy a kombinace) je však menší než u buněk v těchto skupinách analyzovaných 2 hod po ozáření.



**Obr. č. 11:** Mikroskopické snímky buněk 24 hod po ozáření zobrazují výskyt společných ložisek  $\gamma$ H2AX a 53BP1 u buněk ozářených a ovlivněných kombinací. Ložisek je více u kombinace, ale méně než v předchozím časovém intervalu.

## 6 Diskuze

DNA je hlavním cílem mnoha dnes obecně užívaných proti-rakovinových látek a inhibice opravy DNA je jedna z nejvíce slibných strategií v moderní proti-rakovinové terapii. V současné době se zájem obrací na inhibitory reparační DSBs v kombinaci s IZ, protože DSBs jsou považovány za letální léze s možnou indukcí apoptózy.[64]

Brzkou odpovědí na DSBs je fosforylace histonu H2A, izoformy H2AX na Ser 139.[27] Fosforylaci  $\gamma$ H2AX zajišťují ATM, ATR a DNA-PK.[43] Tato změna vede k úpravě chromatinové struktury v oblastech DNA poškození a k usnadnění vazby dalších potřebných molekul v tomto místě.[27] V místě poškození pak dochází k formaci IRIF.[56] Do těchto ložisek jsou přitahovány další proteiny, např. ATM, Mdc1, 53BP1, MRN komplex nebo BRCA.[78] Proteiny 53BP1 a Mdc1 zprostředkovávají spojení dalších proteinů s místem poškození v DNA.[56]

Shaneen et al. (2011) zkoumali tvorbu ložisek  $\gamma$ H2AX na buňkách rakoviny prostaty. Kombinace inhibitorů NU7441 a KU55933 s IZ nebo doxorubicinem redukovala signál  $\gamma$ H2AX v buněčných liniích (LNCaP-p53 wt a PC3-p53 mutant), což potvrzuje to, že ATM je hlavní kinázou pro tuto fosforylaci. NU7441 sám o sobě mírně inhiboval fosforylaci v časném stádiu. V pozdějších stádiích však došlo k navýšení  $\gamma$ H2AX i přes inhibici DNA-PK, uplatnila se tedy ATM. DNA-PK tedy může fosforylovat H2AX jen v nepřítomnosti ATM nikoliv však, když je ATM chemicky inhibována.[57] Willmore et al. (2008) pozorovali tvorbu ložisek  $\gamma$ H2AX po použití samotného inhibitoru a inhibitoru s fludarabinem. V kombinaci pozorovali nárůst těchto ložisek svědčící o větším výskytu DSBs.[75] Zhao et al. (2006) prováděli podobný pokus. Samotný inhibitor nevykazoval žádný účinek. Při kombinaci inhibitoru se zářením nedošlo k ovlivnění množství ložisek, ale ke zpomalení jejich postupné eliminace; tedy zpomalení oprav DSBs.[78]

V naší práci jsme tvorbu těchto ložisek a kolokalizaci proteinů  $\gamma$ H2AX a 53BP1 sledovali epifluorescenční mikroskopií 2 a 24 hod po ozáření buněk. U buněk analyzovaných 2 hod po ozáření jsme pozorovali kolokalizaci  $\gamma$ H2AX s 53BP1 u buněk ozářených a kombinace. Společný výskyt těchto proteinů byl markantně zvýšený u buněk ovlivněných kombinací. Buňky analyzované 24 hod po ozáření a inhibici DNA-PK také vykazovaly zvýšené množství těchto ložisek v porovnání se



všemi dalšími skupinami, ale jejich počet již byl nižší. To poukazuje na to, že tvorba těchto ložisek je velmi rychlá a postupem času se ztrácí.

Pokud poškození reparováno není, zvyšuje se množství proteinu p53, který je schopen regulovat buněčný cyklus a ovlivnit osud buňky v reakci na buněčný stres buď zástavou buněčného cyklu nebo převedením buňky do apoptózy.[63] Tato regulace je nutná pro zabránění proliferace abnormálních buněk a udržení integrity genetické informace. Proto je také označován jako „ochránce genomu“. P53 je schopen regulovat genovou transkripcí pro-apoptické proteiny: puma, noxa, bax, OKL38 a anti-apoptické proteiny: Bcl-2, ARC a APAF-1.[79] Může zastavit buněčný cyklus v G1-fázi buněčného cyklu prostřednictvím aktivace p21. Vstup do mitózy blokuje prostřednictvím cdc2 a v G2-fázi je to cyklin B1.[63] Nakano et al. (2001) ukázali, že radiací indukovaná apoptóza v buňkách MOLT-4 je plně závislá na p53.[46]

V naší práci byla exprese proteinu p53 pozorována 2, 24 i 72 hod po ozáření dávkou 1 Gy a u buněk ovlivněných zároveň zářením i inhibitorem NU7441. V buňkách MOLT-4 jsme již po 2 hod našli zvýšené množství proteinu p53. Ke zvýšené expresi došlo proto, aby mohlo dojít k zástavě buněčného cyklu a opravě DNA nebo případné apoptóze buněk.

Stabilita a aktivita proteinu p53 je regulována fosforylacemi a acetylacemi. Fosforylaci na Ser 392 způsobuje kasein kináza 2 (CK2) a p38MAPK. Dle Radhakrishnan et al. (2006) se na fosforylaci může podílet i cyklin dependentní kináza 9 (CDK9).[54] Fosforylace na Ser 392 usnadňuje vazbu k specifickým DNA sekvencím, transaktivační schopnost a pravděpodobně stabilizuje p53 tetramerizací.[54,30]

V našich výsledcích jsme prokázali signifikantní nárůst fosforylace p53 na Ser 392 2 a 24 hod po ozáření. 72 hod po ozáření už tato fosforylace nebyla patrná. K nárůstu došlo u skupiny ozářené a skupiny ovlivněné kombinací nox.

Ke stabilizaci také přispívá fosforylace p53 na Ser 15. Tato posttranslační modifikace může být vykonána pomocí ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 a Chk 2.[79] Fosforylace na Ser 15 brání vazbě s Mdm2 a nedochází tak k degradaci proteinu p53 a usnadňuje další posttranslační modifikace.[69,57]

Pomocí metody ELISA jsme prokázali výrazné zvýšení proteinu p53 Ser 15 již 2 hod po ozáření. Množství proteinu u buněk ovlivněných inhibitorem i zářením

bylo vyšší než u pouze ozářených buněk, avšak s postupem času se množství proteinu snížilo. Ačkoliv bychom tedy použitím inhibitoru DNA-PK mohli očekávat pokles míry fosforylace p53 na Ser 15, nebyl tento útlum pozorován, jelikož DNA-PK není jedinou kinázou účastnicí se této fosforylace. Pro zamezení tak složitého děje, jakým je fosforylace proteinu p53, je zřejmě zapotřebí inhibovat celou řadu enzymů a tedy i použít kombinaci více inhibitorů. Naše výsledky potvrzuje i studie Shaheen et al. (2011), kdy metodou Western blotting analyzovali tuto fosforylaci na buňkách rakoviny prostaty. Dle jejich výsledků NU7441 není schopen inhibovat fosforylaci p53 na Ser 15.[57]

Protein p21 patří k inhibitorům CDK.[34] Sdílí stejnou strukturu N-terminální domény s p27 a p57, které inhibují CDK aktivitu.[16] Protein p21 je up-regulován proteinem p53. P21 promotor obsahuje 2 konzervované p53-vazebné oblasti; nejméně jedna z nich je nutná k regulaci transkripce p21 v závislosti na poškození DNA. Dle Gartela et al. (2002) však transkripce p21 může být aktivována i nezávisle na p53.[21] Poté, co je p21 exprimován váže cyklin-CDK komplexy, inhibuje jejich kinázovou aktivitu a blokuje DNA syntézu a progresi buněčného cyklu.[34]

V našich výsledcích získaných metodou Western blotting se podařilo prokázat výskyt proteinu p21 24 a 72 hod po ozáření u buněk ozářených a ovlivněných kombinací nox. 72 hod po ozáření bylo množství proteinu u kombinace vyšší než u ozáření. Tyto výsledky souhlasí se zvýšeným výskytem proteinu p53 ve shodných skupinách. Dále jsme tento protein analyzovali metodou ELISA. Výsledky této metody jsou shodné s výsledky Western blottingu. Podařilo se nám prokázat, že maximum proteinu p21 nalzáme u kombinace; a to 24 hod po ozáření. Zvýšení proteinu p21 tedy svědčí o zástavě buněčného cyklu a je též nepřímým důkazem genotoxického stresu - poškození DNA.

Ku protein je komplex složený ze dvou podjednotek: Ku70 a Ku80.[35] Tyto proteiny vytváří DNA-vázající heterodimer, který spolu s DNA-PK<sub>CS</sub> vytváří serin/threoninovou kinázu DNA-PK, která se účastní oprav DSBs během NHEJ.[68] Ku heterodimer rozpozná specifické DNA konce v oblasti léze a pak přitáhne DNA-PK<sub>CS</sub> do místa poškození.[75] DNA-PK poté fosforyluje několik nukleárních proteinů: p53, c-fos, Sp1, XRCC4, DNA-PK<sub>CS</sub> nebo samotný protein Ku.[35]

V této studii jsme bohužel neměli k dispozici protilátku proti fosforylovaným formám Ku-podjednotek. Sledovali jsme tedy množství nefosforylovaných forem a na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že dochází k mírným, avšak nesignifikantním změnám v množství proteinů. Na základě dosud publikovaných výsledků předpokládáme, že dochází k útlumu aktivity DNA-PK. Shaheen et al. (2011) se zabývali inhibicí fosforylací DNA-PK<sub>CS</sub> na buňkách rakoviny prostaty, díky kterým se protein stává aktivním. NU7441 byl schopen inhibovat fosforylací na Ser 2056, ale nebyl schopen inhibovat fosforylací na Thr 2609.[57] K závěru, že NU7441 vede k útlumu aktivity celkové DNA-PK došli i Willmore et al. (2008), kteří zkoumali fosforylace na B-buněčné CLL.[75]

Bad řadíme do skupiny Bcl-2 proteinů. Jedná se o pro-apoptický protein.[67] Dle studie Kazi et al. (2011) obsahuje alfa helikální struktury, jež zapadají do hydrofobní oblasti formované z BH1, BH2 a BH3 domén u Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> a Mcl-1. Jakmile se Bax, Bad, Bim nebo Bak navážou na tyto proteiny, Bak nebo Bax jsou volné a mohou indukovat apoptózu.[29]

Bad je fosforylován proteinem Akt na Ser 112, 136 a 155, což inhibuje jeho pro-apoptickou aktivitu tím, že umožní jeho interakci s 14-3-3 adaptorovým proteinem nebo přímo zabráněním interakce s Bcl-x<sub>L</sub> nebo Bcl-2.[32,28] V absenci signálů vedoucích k přežití je defosforylován a zvyšuje se jeho pro-apoptická aktivita. Podle studie Kelly et al.(2010) se však hladina Bad po ozáření nezvyšuje.[32]

U buněk analyzovaných 24 a 72 hod po ozáření jsme pozorovali mírný pokles v množství proteinu Bad u buněk ovlivněných kombinací, což dobře koreluje s indukcí apoptózy (viz níže). V intervalu 72 hod po ozáření se snížilo množství proteinu i u buněk pouze ozářených, což připisujeme procesům spojeným s pozdní apoptózou.

Dalším proteinem, který jsme analyzovali, byl PARP. Při nízkých koncentracích DNA poškození PARP inhibuje pro-apoptické Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> endonukleázy a chrání tak buňky před apoptózou.[38] Katalyzuje poly (ADP) ribosylaci některých nukleárních proteinů s NAD jako substrátem.[5] Při apoptóze se však stává substrátem pro kaspázy (kaspáza-3, kaspáza-7) a dochází k jeho štěpení. Štěpením dochází k jeho inaktivaci a neschopnosti vázat se na DNA řetězcové zlomy. Vznikají fragmenty o velikosti 89 a 24 kDa, které používáme k průkazu raných stádií apoptického procesu v buňkách. [5,7]

Přítomnost štěpů v našich experimentech jsme pozorovali 24 hod po ozáření u buněk ozářených a ovlivněných kombinací nox. Tyto výsledky jsou v souladu s analýzou časně apoptických buněk průtokovým cytometrem; jejich množství dosáhlo maxima také po kombinaci za 24 hod po ozáření.

Klíčovou úlohou cdc25A fosfatázy je působení v G1/S-fázi a M-fázi buněčného cyklu. Jednou z funkcí je odstranění fosfátových skupin z Thr 14 a Tyr 15 na E(A) cyklin dependentní kináze 2 [E(A) CDK2].[24,41,82] Napomáhá tak aktivaci této fosfatázy a progresi buněčného cyklu do S-fáze a následné replikaci DNA.[41,82] Podobná funkce je také zahrnuta v mitóze, kde se podílí na aktivaci cdc2 kinázy. Členové 14-3-3 proteinové rodiny reagují s cdc25A a Raf-1 a přispívají tak k progresi buněčného cyklu.[20] Exprese tohoto proteinu je kontrolována proliferačními regulačními signály, které zahrnují E2F a další transkripční faktory.[82]

DNA poškození vede k mnohočetné fosforylaci cdc25A a následné proteazom-dependentní degradaci proteinu.[26] Probíhající apoptóza v buňkách je spojena s tvorbou C-terminálního fragmentu, který je zahrnut v aktivaci CDK2. Dle Mazars et al. (2009) může být fragment sám o sobě zahrnut do procesu apoptózy. Štěpení vede k redukci množství plné formy cdc25A a akumulaci 33kDa C-terminálního fragmentu.[41]

Dle Fuhrmann et al. (2001) bychom měli pozorovat zvýšení množství proteinu cdc25A při růstové zástavě a snížení při apoptóze.[20] Z našich výsledků je patrné, že došlo ke snížení proteinu u buněk analyzovaných 24 a 72 hod po ozáření, které byly ovlivněny kombinací nox. Tyto výsledky jsou nepřímým důkazem indukce apoptického procesu.

Jak již bylo řečeno, protein Mcl-1 patří do Bcl-2 rodiny proteinů a jedná se o anti-apoptický faktor.[67] Svou anti-apoptickou aktivitu zprostředkovává tím, že je schopen tvorby heterodimerů s pro-apoptickými BH3-only proteiny Bcl-2 rodiny proteinů Bim, Bak nebo Noxa v mitochondriální vnější membráně a tím jejich neutralizace. To vede k potlačení uvolnění cyt c z mitochondrie a Apaf-1-dependentní aktivaci kaspázy-3.[42,80] Mcl-1 je regulován post-transkripčně přes proteazomální degradaci, která je nezávislá na kaspázové aktivaci.[73] Degradaci proteinu ovlivňuje E3 ubikvitinová ligáza (MULE). Degradace nastává během apoptózy a může být podpořena další E3 ubikvitinovou ligázou nebo proteázami.[42]

Množství Mcl-1 se po expozici jednotlivým noxám nezměnilo, avšak kombinace nox vedla ke snížení Mcl-1 exprese 24 a 72 hod po ozáření. Degradace Mcl-1 tak přispívá k indukci apoptózy.

Naše výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi, které poukazují na to, že akumulace p53 u buněk MOLT-4 je spojena s následnými apoptickými změnami jako je změna lokalizace PS buněčné membrány (Annexin V) a tvorba pórů v membráně buňky (PI).[46,47] Přítomnost p53 může spustit apoptózu v případě, že DNA poškození je příliš rozsáhlé na to, aby bylo opraveno.[57] Metodou průtokové cytometrie jsme stanovili jak časně, tak i pozdně apoptické buňky. Zatímco u časně apoptických buněk jsme našli maximum těchto buněk 24 hod po ozáření u kombinace (8,06%), nejvíce pozdně apoptických buněk jsme pozorovali 72 hod po ozáření také u kombinace (48,13%). 72 hod po ozáření se nám podařilo prokázat také již velké narušení membrány, kdy byl PI schopen projít do buňky, což značí tzv. terminální fázi apoptózy. Je tedy vidět, že použití inhibitoru mělo výrazný vliv na nárůst apoptického procesu. Téměř polovina buněk 72 hod po ozáření podlela apoptóze, což je přibližně dvojnásobné množství než u buněk pouze ozářených. Naše výsledky potvrzuje i studie Shaheen et al., kde záření v kombinaci s inhibitorem NU7441 zvýšilo apoptózu na buňkách rakoviny prostaty p53-wt (LNCaP), kdežto u buněk p53-mutantních (PC3) vykazoval inhibitor jen mírný účinek. Apoptóza spouštěná zářením a NU7441 je tedy p53-dependentní a buňky s funkčním p53 se při inhibici DNA-PK hromadí v G1-fázi.[57]

U doplňkových experimentů s inhibitorem NU7026 jsme analyzovali pouze 3 proteiny: Akt, Mcl-1 a LaminB.

Akt, také známá jako protein kináza B, je serin/threoninová kináza. Jedná se o anti-apoptický faktor. Protein inhibuje apoptózu inaktivací proteinu Bad, c-Raf, puma a kaspázy-9 a stabilizuje Mcl-1.[8,81,11,14] Je aktivován fosforylacemi na Ser 473 a Thr 308. Fosforylaci na serinu způsobuje mTORC2 komplex, DNA-PK, ATM, ATR a další. Akt brání akumulaci p53 v mitochondriích a uvolnění cyt c a Smac/DIABLO.[61]

V naší studii jsme neprokázali významné změny v množství proteinu u žádné skupiny ani v žádném ze zkoumaných intervalů. Stejně tak nedošlo ke změnám v množství proteinu Mcl-1.

Lamin B je nukleární protein, který je zahrnut do aktivace a progresu apoptózy. Je substrátem pro kaspázu-6. Při apoptóze pozorujeme jeho štěpení na fragmenty o nižší molekulové hmotnosti (48kDa). Podle di Matola et al. (2001) dochází ke štěpení laminu B kaspázou-6 již v časných fázích apoptózy (po 12 hod).[15]

Štěpy bychom měli nalézt u ozářené skupiny buněk a skupiny ovlivněné kombinací obou nox. V našich výsledcích jsme však výskyt fragmentů nepozorovali, jelikož jsme používali protilátku, která nedisponovala afinitou k patřičnému epitopu štěpeného laminu B. Úbytek jeho „plné“ formy (68kDa) u buněk ozářených a ovlivněných kombinací však nastal v důsledku jeho štěpení a podporuje tak hypotézu a probíhající apoptóze.

Pokud porovnáme účinek obou inhibitorů na úrovni proteinů účastnících se signalizace DNA reparace, můžeme konstatovat, že inhibitor NU7026 v koncentraci 10  $\mu$ M při kombinaci s dávkou 1 Gy tlumil fosforylace p53 na Ser 15 a 392, Chk-2 na Thr 68 a histonu H2AX na Ser 139.[65] Takový efekt jsme u inhibitoru NU7441 nepozorovali. Je však potřeba důrazně připomenout, že použitá koncentrace NU7441 byla o řád nižší (1  $\mu$ M). Na druhou stranu, pokud hodnotíme, jaký efekt mají inhibitory v konečném důsledku na indukci apoptózy, tak u buněk MOLT-4 s kombinací záření a NU7026 Tichý et al. (2012) pozorovali zpožděný nástup apoptózy (za 24 hod 3 % a za 72 hod 24 % Annexin V+/PI+ buněk).[65] Naproti tomu u buněk ovlivněných kombinací s inhibitorem NU7441 jsme pozorovali daleko rychlejší a intenzivnější nástup apoptózy (za 24 hod 28 % a za 72 hod 48 % Annexin V+/PI+ buněk). Proto hodnotíme jako perspektivnější inhibitor NU7441, který se dá použít v nižších koncentracích a vede k intenzivnějšímu pro-apoptickému účinku.

## 7 Závěr

V této práci jsme se zabývali studiem inhibice reparace DSBs a indukci apoptózy za použití IZ a inhibitorů DNA-PK (NU7026 a NU7441). Experimenty byly provedeny na buňkách T-lymfocytární leukémie MOLT-4, které exprimují protein p53. Těžiště studie spočívalo v práci s inhibitorem NU7441. Dále jsme provedli několik experimentů s NU7026, které doplnily studii, jež byla na našem pracovišti prováděna v minulých letech

IZ způsobuje DSBs, které mohou být pro buňku letální, pokud nejsou opraveny. V časných fázích indukce DSBs se tvoří ložiska  $\gamma$ H2AX. Množství těchto ložisek se po ovlivnění buněk kombinací zvýšilo, což znamená, že vzrostl počet DSBs. I přes inhibici DNA-PK však dochází k fosforylaci H2AX, jelikož se zde uplatňuje také ATM kináza, která si vzhledem k použité koncentraci inhibitoru ponechává část své kinázové aktivity.

Dále jsme se v naší práci zabývali tím, na jaké proteiny má inhibice DNA-PK vliv. Množství proteinu p53, stejně tak jako jeho fosforylovaných forem p53 Ser 392 a p53 Ser 15, se zvýšilo u buněk ozářených i ovlivněných kombinací obou nox. Zvýšení množství p53 svědčí o potřebě buněk zamezit propagaci poškozené genetické informace. Přestože je DNA-PK plně inhibovaná, k fosforylaci p53 dochází ze stejného důvodu jako u  $\gamma$ H2AX.

V souvislosti se zvýšením proteinu p53 jsme pozorovali zvýšení množství proteinu p21 24 a 72 hod po ozáření u buněk pouze ozářených a u buněk ovlivněných kombinací nox. Došlo tedy k zástavě buněčného cyklu. V naší práci byl také prokázán mírný úbytek proteinu cdc25A 24 a 72 hod po ozáření u kombinace, což svědčí o probíhajícím apoptickém procesu. Pozorovali jsme, že po kombinaci ozáření a inhibice dochází za 24 a 72 hod k degradaci anti-apoptického proteinu Mcl-1, což podněcuje průběh apoptózy. Ta byla prokázána také detekcí proteinu PARP, který byl štěpen 24 hod po ozáření u buněk ozářených a kombinace nox a prokazuje tak přítomnost aktivních kaspáz - exekutorů apoptózy. U nefosforylovaných forem proteinu Ku70/80 jsme pozorovali mírné, nesignifikantní změny. Protože podle dosavadních studií dochází v rámci útlumu aktivity DNA-PK k poklesu fosforylovaných forem, rádi bychom se věnovali jejich analýze v dalších experimentech.

Dále se nám pomocí průtokové cytometrie podařilo prokázat, že inhibice reparace DNA inhibitorem NU7441 má výrazný vliv na indukci apoptózy. Zatímco časně apoptických buněk bylo u kombinace 24 hod po ozáření pouze 8,06 %, pozdně apoptických buněk bylo již 27,38 %. 72 hod po ozáření jsme u této skupiny stanovili pozdně apoptických buněk dokonce skoro polovinu (48,13 %). Jednalo se přibližně o dvojnásobné množství, než jsme pozorovali u buněk pouze ozářených (27,6%). Z toho vyplývá, že inhibitor NU7441 je schopen buňky výrazně senzibilizovat vůči IZ.

Při srovnání inhibitorů docházíme k závěru, že inhibitor NU7026 (v koncentraci 10  $\mu$ M) v kombinaci s dávkou 1 Gy tlumí fosforylace některých substrátů ATM a DNA-PK [65], ovšem výsledná míra apoptózy je vyšší po použití inhibitoru NU7441 (v koncentraci 1  $\mu$ M). Protože jej lze použít v nižších koncentracích a vede k intenzivnějšímu pro-apoptickému účinku, hodnotíme inhibitor NU7441 jako perspektivní platformu pro vývoj dalších účinných protinádorových léčiv. Díky vysoké specifitě je tento inhibitor také výborným nástrojem pro studium mechanismů účinku DNA-PK v molekulární biologii.



## 8 Seznam použité literatury

1. Ahn JY, Schwarz JK, Piwnica-Worms H, Canman CE. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 2000;60:5934-6.
2. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010;9:145-52.
3. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 2006;173:195-206.
4. Bogomazova AN, Lagarkova MA, Tskhovrebova LV, Shutova MV, Kiselev SL. Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2. *Aging (Albany NY)* 2011; 3:584-96.
5. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 1999;274:22932-40.
6. Brachmann SM, Yballe CM, Innocenti M, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Mol Cell Biol*. 2005 Apr;25(7):2593-606.
7. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemain F, Plénat F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2009;57:289-300.
8. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-21.
9. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:616-27.
10. Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 2005;24:949-61.
11. Colloff JL, Mason EF, Altman BJ, Gerriets VA, Liu T, Nichols AN, Zhao Y, Wofford JA, Jacobs SR, Ilkayeva O, Garrison SP, Zambetti GP, Rathmell JC. Akt requires glucose metabolism to suppress puma expression and prevent apoptosis of leukemic T cells. *J Biol Chem* 2011;286:5921-33.
12. Costa C, Germena G, Hirsch E. Dissection of the Interplay between Class I PI3Ks and Rac Signaling in Phagocytic Functions. *ScientificWorldJournal* 2010;10:1826-39.
13. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004;95:957-70.
14. de Frias M, Iglesias-Serret D, Cosiáls AM, Coll-Mulet L, Santidrián AF, González-Gironès DM, de la Banda E, Pons G, Gil J. Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2009;94:1698-707.

15. Di Matola T, D'Ascoli F, Luongo C, Bifulco M, Rossi G, Fenzi G, Vitale M. Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome c and lamin B. *Eur J Endocrinol* 2001;145:645-50.
16. Dong C, Li Q, Lyu SC, Krensky AM, Clayberger C. A novel apoptosis pathway activated by the carboxyl terminus of p21. *Blood* 2005;105:1187-94.
17. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PK<sub>CS</sub> to sites of DNA damage. *Nature* 2005;434:605-11.
18. Fremuth F. Účinky záření a chemických látek na buňky a organismus. Praha: Statní pedagogické nakladatelství, 1981, 269 s. ISBN 14-428-81.
19. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:481-507. Review.
20. Fuhrmann G, Leisser C, Rosenberger G, Grusch M, Huettenbrenner S, Halama T, Mosberger I, Sasgary S, Cerni C, Krupitza G. Cdc25A phosphatase suppresses apoptosis induced by serum deprivation. *Oncogene* 2001;20:4542-53.
21. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639-49.
22. Greenberg JM, Gonzalez-Sarmiento R, Artur DC. Immunophenotypic and cytogenetic analysis of MOLT-3 and MOLT-4: human cell lines with rearrangement of chromosome 7. *Blood* 1988;72:1755-60.
23. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98:2603-14.
24. Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* 1994;13:4302-10.
25. Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* 2007;6:414-7.
26. Chen MS, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 2003;23:7488-97.
27. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23:687-96.
28. Jiang P, Du W, Heese K, Wu M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *mol Cell Biol* 2006;26:9071-82.
29. Kazi A, Sun J, Doi K, Sung SS, Takahashi Y, Yin H, Rodriguez JM, Becerril J, Berndt N, Hamilton AD, Wang HG, Sefti SM. The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *J Biol Chem* 2011;286:9382-92.
30. Keller DM, Lu H. p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J Biol Chem* 2002;277:50206-13.
31. Keller DM, Zeng X, Wang Y, Zhang QH, Kapoor M, Shu H, Goodman R, Lozano G, Zhao Y, Lu H. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell* 2001;7:283-92.

32. Kelly PN, White MJ, Goschnick MW, Fairfax KA, Tarlinton DM, Kinkel SA, Bouillet P, Adams JM, Kile BT, Strasser A. Individual and overlapping roles of BH3-only proteins Bim and Bad in apoptosis of lymphocytes and platelets and in suppression of thymic lymphoma development. *Cell Death Differ* 2010;17:1655-64.
33. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247-54.
34. King ML, Murphy LL. Role of cyclin inhibitor protein p21 in the inhibition of HCT116 human colon cancer cell proliferation by American ginseng (*Panax quinquefolius*) and its constituents. *Phytomedicine* 2010;17:261-8.
35. Koike M. Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J Radiat Res* 2002;43:223-36.
36. Kolektiv autorů. *Principy a praxe radiační ochrany*. Praha: Státní úřad pro jadernou bezpečnost, 2000, 619 s. ISBN 80-238-3703-6.
37. Lassmann M, Hänscheid H, Gassen D, Biko J, Meineke V, Reiners C, Scherthan H. In Vivo Formation of  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 DNA Repair Foci in Blood Cells After Radioiodine Therapy of Differentiated Thyroid Cancer. *J Nucl Med* 2010;51:1318-25.
38. Lee DH, Park T, Kim HW. Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in Jurkat T cells through treatment with acetoxyscirpenol mycotoxins. *Biol Pharm Bull* 2006;29:648-54.
39. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 2008;7:2902-6.
40. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10389-94.
41. Mazars A, Fernandez-Vidal A, Mondesert O, Lorenzo C, Prévost G, Ducommun B, Payrastre B, Racaud-Sultan C, Manenti S. A caspase-dependent cleavage of CDC25A generates an active fragment activating cyclin-dependent kinase 2 during apoptosis. *Cell Death Differ* 2009;16:208-18.
42. Milot E, Filep JG. Regulation of Neutrophil Survival/Apoptosis by Mcl-1. *Scientific World Journal* 2011;11:1948-62.
43. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:575-90.
44. Muller C, Christodoulouopoulos G, Salles B, Panasci L. DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood* 1998;95:2213-9.
45. Nakagawa K, Taya Y, Tamai K, Yamaizumi M. Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 1999;19:2828-34.

46. Nakano H, Kohara M, Shinohara K. Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 2001;306:101-6.
47. Nakano H, Shinohara K. Correlation between unirradiated cell TP53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 cells. *Radiat Res* 1999;151:686-93.
48. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 2011;436:527-36.
49. Nutley BP, Smith NF, Hayes A, Kelland LR, Brunton L, Golding BT, Smith GC, Martin NM, Workman P, Raynaud FI. Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-PK inhibitor NU7026. *British Journal of Cancer* 2005; 93:1011-8.
50. Pandita TK, Lieberman HB, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y, Kastan MB. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 2000;19:1386-91.
51. Panta GR, Kaur S, Cavin LG, Cortés ML, Mercurio F, Lothstein L, Sweatman TW, Israel M, Arsura M. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 2004;24:1823-35.
52. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000;15:289-302.
53. Pollard TD, Earnshaw WC. Protein kinases. In: *Cell biology*. Philadelphia: Sander, Elsevier Science, 2002:425-429.
54. Radhakrishnan SK, Gartel AL. CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. *Cell cycle* 2006;5:519-21.
55. Rivera-Calzada A, Spagnolo L, Pearl LH, Llorca O. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep* 2007;8:56-62.
56. Řezáčová M, Havelek R, Lukášová E, Vávrová J. Fosforylovaný histon H2AX-nový indikátor poškození DNA. *Chem- Listy* 2011;105:108-113.
57. Shaheen FS, Znojek P, Fisher A, Webster M, Plummer R, Gaughan L, Smith GC, Leung HY, Curtin NJ, Robson CN. Targeting the DNA double strand break repair machinery in prostate cancer. *PloS One* 2011;6:
58. Shang ZF, Huang B, Xu QZ, Zhang SM, Fan R, Liu XD, Wang Y, Zhou PK. Inactivation of DNA-dependent protein kinase leads to spindle disruption and mitotic catastrophe with attenuated checkpoint protein 2 Phosphorylation in response to DNA damage. *Cancer Res* 2010; 70:3657-66.
59. Schwartz EK, Heyer WD. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 2011;120:109-27.
60. Singh SK, Wang M, Staudt C, Iliakis G. Post-irradiation chemical processing of DNA damage generates double-strand breaks in cells already engaged in repair. *Nucleic Acids Res* 2011;39:8416-29.

61. Stronach EA, Chen M, Maginn EN, Agarwal R, Mills GB, Wasan H, Gabra H. DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance. *Neoplasie* 2011;13:1069-80.
62. Sun Y, Xu Y, Roy K, Price BD. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol* 2007;27:8502-9.
63. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011;
64. Tavecchio M, Munck JM, Cano C, Newell DR, Curtin NJ. Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2011;
65. Tichý A, Novotná E, Šalovská B, Sedlaříková R, Pejchal J, Zárybnická L, Vávrová J, Šinkorová Z. Radio-sensitization of human leukaemic MOLT-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2012; 56: *In press*.
66. Tichý A, Vávrová J, Pejchal J, Rezáčová M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010;53:13-7.
67. Tichý A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta medica* 2006;49:13-18.
68. Tomita M. Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell dech. *J Radiat Res (Tokyo)* 2010;51:493-501.
69. Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, Soddu S, Cundari E. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2004;15:3751-7.
70. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8403-10.
71. Vávrová J, Makerová M, Vokurková D. Lidské hematologické nádorové linie a jejich citlivost k účinkům ionizujícího záření. *Vojenské zdravotnické listy* 2000;6: 267-276.
72. Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Psutka J. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res* 2004;53:335-42.
73. Wensveen FM, Alves NL, Derks IA, Reedquist KA, Eldering E. Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. *Apoptosis* 2011;16:708-21.
74. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, Durkacz BW. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 2004;103:4659-65.
75. Willmore E, Elliott SL, Mainou-Fowler T, Summerfield GP, Jackson GH, O'Neill F, Lowe C, Carter A, Harris R, Pettitt AR, Cano-Soumillac C, Griffin

- RJ, Cowell IG, Austin CA, Durkacz BW. DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:3984-92.
76. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
77. Yano K, Morotomi-Yano K, Adachi N, Akiyama H. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. *J Radiat Res (Tokyo)* 2009;50:97-108.
78. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, Richardson CJ, Griffin RJ, Calvert AH, Newell DR, Smith GC, Curtin NJ. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Research* 2006;66:5354-62.
79. Zheltukhin AO, Chumakov PM. Constitutive and induced functions of the p53 gene. *Biochemistry (Mosc)* 2010;75:1692-721.
80. Zhou W, Hu J, Tang H, Wang D, Huang X, He C, Zhu H. Small interfering RNA targeting mcl-1 enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis in various solid malignant tumors. *BMC Cancer* 2011;11:485.
81. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999;286:1741-4.
82. Zou X, Tsutsui T, Ray D, Blomquist JF, Ichijo H, Ucker DS, Kiyokawa H. The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001;21:4818-28.