

UNIVERZITA PABUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**Význam regulací signální cesty proteinu p53
v protinádorové léčbě: Inhibitory MAPK**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Martina Seifrtová
Vedoucí práce: doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

2009

UNIVERSITY OF PARBUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**Regulation of p53 pathway in anticancer therapy:
MAPK inhibitors**

THESIS

Author: Martina Seifrtová
Supervisor: doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

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

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

1. Proveďte literární rešerši a popište současný stav poznání o proteinu p53, jeho regulaci a vztahu k indukci apoptózy, a dále o MAPK se zaměřením na Erk1/2. Seznamte se s mechanismem protinádorového působení mitoxantronu.
2. Osvojte si techniku práce s buněčnou linií MOLT-4, její kultivaci a pasážování.
3. Zhodnoťte různé dávky mitoxantronu a způsob jejich aplikace pomocí sledování proliferační aktivity buněk a vyberte dávkové schéma pro další studii.
4. Zhodnoťte vliv inhibitoru Erk1/2 (U0126) na působení mitoxantronu pomocí sledování proliferační aktivity buněk, analýzy buněčného cyklu a stanovení apoptózy.
5. Zhodnoťte expresi a post-translační modifikace proteinu p53 a dalších substrátů ATM-kinasy pomocí imunodetekčních technik.
6. Naměřené hodnoty statisticky zpracujte a ze získaných výsledků vyvoďte, zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibitor Erk1/2 aktivaci biochemických cest vedoucích k detekci a reparaci mitoxantronem vyvolaného poškození DNA nebo k indukci apoptózy.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.**
Lékařská fakulta UK, Hradec Králové
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Darina Muthná, Ph.D.**
Lékařská fakulta UK Hradec Králové
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, Dr.Sc.
děkan

L.S.


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

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.5.2009

Martina Seifrtová

Děkuji doc. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za odborné vedení a připomínky k diplomové práci a za velmi vstřícný osobní přístup.

Děkuji také Mgr. Darině Muthné, Ph.D. za cenné rady, ochotu a všestrannou pomoc při vypracovávání experimentální části této práce. Mé poděkování rovněž patří laborantce Nadě Mazánkové za trpělivou pomoc při práci s buněčnými liniemi.

Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu po celé období mého studia.

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

Když si člověk postaví dům, vždycky zpozoruje, že se při tom naučil něčemu, co měl rozhodně znát, než začal stavět.

Friedrich Nietzsche

Souhrn

V této práci jsme se zabývali molekulárními změnami po působení mitoxantronu a inhibitoru U0126 (inhibitor MEK1/2) u lidských nádorových buněk. Cílem práce bylo zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje inhibitor U0126 aktivaci biochemických cest po mitoxantronem vyvolaném poškození DNA. Jako modelový systém jsme použili buněčnou linii MOLT-4 odvozenou od lidské T-lymfocytární leukémie.

Na počátku jsme sledovali proliferační aktivitu buněk po působení různých dávek mitoxantronu s cílem vybrat vhodné dávkové schéma pro další studii. Dále jsme sledovali proliferační aktivitu buněk po působení mitoxantronu a inhibitoru U0126 a hodnotili vliv tohoto inhibitoru na působení mitoxantronu. Zjistili jsme, že inhibice MEK1/2 kinázy pomocí U0126 vede po mitoxantronem vyvolaném poškození DNA ke zvýšenému odumírání buněk. Průtokovou cytometrií jsme sledovali indukci apoptózy za použití duálního značení Annexinem V a propidium jodidem a optických parametrů rozptylu světla. Indukci apoptózy jsme stanovili v reakci na různé dávky mitoxantronu, inhibitor U0126 a jejich kombinaci v různých časových intervalech působení. Bylo potvrzeno, že U0126 inhibicí MEK1/2 zastaví cestu napomáhající buněčné proliferaci a přežívání, a po poškození DNA je tak více buněk posíláno do apoptózy. Pro lepší přehled o průběhu buněčného cyklu jsme u jednotlivých skupin zanalyzovali obsah DNA v buňce. U buněk MOLT-4 mitoxantron způsobuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi následovanou rozvojem apoptózy, inhibice MEK1/2 kinázy pomocí U0126 tuto zástavu buněčného cyklu nenarušuje. Následně jsme studovali změny v expresi proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a rozvoji apoptózy (p53 a jeho posttranslační modifikace, p21, ERK1/2, lamin B). Expresi proteinů jsme detekovali pomocí elektroforézy a Western blottingu s následnou imunodetekcí. Zjistili jsme, že inhibice MEK1/2 pomocí U0126 u buněk MOLT-4 nemá zásadní vliv na expresi proteinu p53, ani na expresi jeho fosforylovaných forem. Proteiny jsme kvantifikovali pomocí měření integrované optické denzity, která nám poskytla detailnější přehled o množství proteinů u jednotlivých skupin ovlivněných buněk.

Klíčová slova: apoptóza, mitoxantron, U0126, p53, MAPK

Summary

In the project we were focused on molecular changes activated by mitoxantrone and inhibitor U0126 (inhibitor MEK1/2) in human tumor cells. The aim of the thesis was to find if and how inhibitor U0126 is activating biochemical pathways after the DNA damage caused by mitoxantrone. As a model system we selected cell line MOLT-4, derived from T-lymphocytic leukemia.

First, we observed the dynamics of cell viability and proliferation after the effect of different doses of mitoxantrone. The object of the task was to choose suitable dose scheme for other studies. Then we observed proliferation activity of the cells after the effect of mitoxantrone and inhibitor U0126 and we evaluated the influence of inhibitor to the action of mitoxantrone. Cell line MOLT-4 after exposure of mitoxantrone and inhibition of MEK1/2 by U0126 together caused increase in dead cells.

The induction of apoptosis was evaluated by flow cytometry. We used the flow-cytometric methods with the application of dual mark by Annexin V and propidium iodide and optical parameters of light scattering. The induction of apoptosis was measured after the exposure of the cells to the different doses of mitoxantrone, inhibitor U0126 and their combination in the different time lags. It was proved that U0126 through the inhibition MEK1/2 stopped the pathway leading to proliferation and cell survival and after the DNA damage more cells were sent to apoptosis. For better view of the process we studied of the cell cycle, using the analysis of DNA content. In the cell line MOLT-4 mitoxantrone caused G2/M cell cycle arrest followed by apoptosis, inhibition of MEK1/2 had not any influence on the G2/M arrest. Follow-up research was concentrated on the changes in the expression of the proteins that participate in the regulation of cell cycle and progress of apoptosis (p53 and its post-translation modifications, p21, ERK1/2, lamin B). The proteins were detected by electrophoresis and Western blot followed by immunodetection. The results lead to conclusion that inhibition of MEK1/2 has not influence on the expression of p53 and its post-translation modifications in the cell line MOLT-4. Subsequently, we used the measurement of integrated optical density for the quantification of proteins. This step provided more detailed information about the amount of proteins in individual groups of affected cells.

Key words: apoptosis, mitoxantrone, U0126, p53, MAPK

Obsah

1	Úvod	12
2	Teoretická část	13
2.1	Buněčný cyklus	13
2.2	Apoptóza	14
2.2.1	Definice pojmu.....	14
2.2.2	Kaspázy a proces apoptózy.....	15
2.2.3	Vnější a vnitřní cesta apoptózy	16
2.3	ATM kináza	18
2.4	Reparace DSB	19
2.5	Protein p53	19
2.5.1	Struktura a funkce	19
2.5.2	Spolupráce p53-Mdm2	20
2.5.3	Mechanismus zástavy buněčného cyklu.....	21
2.5.4	Zástava buněčného cyklu nebo apoptóza?.....	22
2.6	Cesty pro přežití buňky	23
2.6.1	Mitogeny aktivované protein kinázy (MAP kinázy).....	23
2.6.2	Ras-Raf-MEK-ERK	25
2.6.3	Cíle ERK1/2.....	27
2.6.4	Regulace buněčného cyklu prostřednictvím ERK	27
2.6.5	ERK cesta a leukémie.....	28
2.6.6	MAPK cesty v odpovědi na dvojitě zlomy DNA a indukci apoptózy	29
2.7	Hematopoetická nádorová linie MOLT-4	31
2.8	Mitoxantron	32
2.9	U0126	33
3	Experimentální část	34
3.1	Materiál a metodika	34
3.1.1	Buněčné kultury a kultivační podmínky.....	34
3.1.2	Mitoxantron	34
3.1.3	U0126 (MEK1/2 inhibitor).....	34
3.1.4	Průtoková cytometrie	35
3.1.5	DNA analýza.....	35
3.1.6	Detekce apoptózy pomocí Apoptestu.....	36
3.1.7	Lýza buněk.....	37
3.1.8	Stanovení celkové bílkoviny.....	38
3.1.9	Elektroforéza a Western blot	40
3.2	Přístroje	44
4	Výsledková část	45
4.1	Proliferační aktivita a viabilita buněk MOLT-4 po působení mitoxantronu	45
4.2	Proliferační aktivita a viabilita buněk MOLT-4 po působení mitoxantronu a inhibitoru U0126	47

4.3	Detekce apoptózy pomocí průtokové cytometrie	49
4.3.1	Analýza Annexin V/PI	50
4.3.1.1	Analýza Annexin V/PI za 24 hodin.....	50
4.3.1.2	Analýza Annexin V/PI za 72 hodin.....	51
4.3.2	Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC	53
4.3.2.1	Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC za 24 hodin	53
4.3.2.2	Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC za 24 hodin	54
4.3.3	Dvoupametrická analýza Side-scatter/objem	55
4.3.3.1	Dvoupametrická analýza Side-scatter/objem za 24 hodin.....	55
4.3.3.2	Dvoupametrická analýza Side-scatter/objem za 72 hodin.....	56
4.4	DNA analýza	57
4.4.1	DNA analýza 24 hodin	58
4.4.2	DNA analýza 72 hodin	59
4.5	Elektroforéza a Western blotting	60
4.5.1	Expese proteinů	60
5	Závěr	65
6	Seznam zkratek.....	68
7	Seznam literatury	70

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří u nás i ve světě mezi nejčastější. Ukázalo se, že některé druhy rakovin se rozvíjejí v důsledku nedostatečné apoptózy, kdy dochází k příliš velkému růstu a nízkému odumírání nádorových buněk. Ztráta apoptotických schopností nádorových buněk sama o sobě je předpokladem k rezistenci na účinek cytostatik a ozáření. Pochopení dějů, které se odehrávají v nádorové buňce a určení způsobu, jakým terapeutika indukují apoptózu, může významně přispět k novým strategiím a přístupům v kombinované terapii nádorů.

V této práci jsme se zabývali programovanou buněčnou smrtí a molekulárními změnami, které stojí v pozadí reparace DNA a indukce apoptotického procesu po působení mitoxantronu a inhibitoru U0126 u lidských nádorových buněk. Jako modelovou buněčnou linii jsem použili buňky MOLT-4 odvozené od lidské T-buněčné leukémie. Na těchto buňkách jsme pomocí průtokové cytometrie sledovali míru indukce apoptózy po působení daných terapeutik a pomocí elektroforézy a Western blottingu s následnou imunodetekcí jsme určili expresi proteinů charakteristických pro buněčnou smrt.

2 Teoretická část

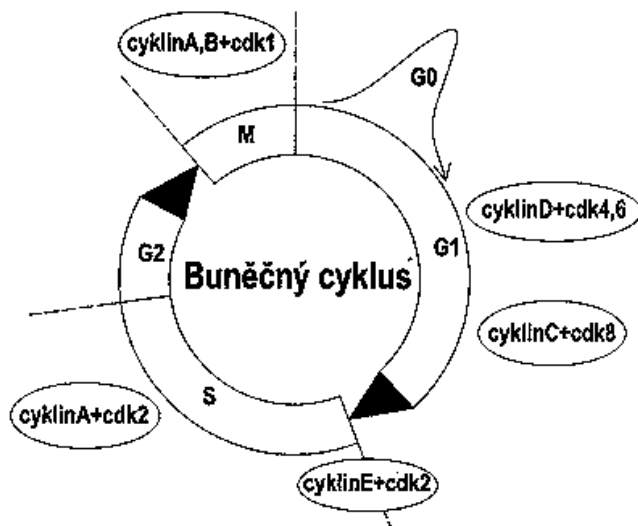
2.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus zabezpečuje dělení buňky a s ním předání kompletní genetické informace do buněk dceřiných. Cyklus se skládá ze čtyř fází. Fáze, při které dochází k dělení buňky a vznikají dvě geneticky identické diploidní dceřiné buňky, se nazývá mitóza. Období cyklu mezi mitózami se nazývá interfáze a dále se dělí na gap 1 (G1), syntetickou fázi (S) a gap 2 (G2). Mimo těchto fází existuje také fáze gap 0 (G0) – klidové období, kdy se buňky nedělí a zůstávají ve stacionárním stavu (Ehrmann, 2001).

Jednotlivé úseky cyklu jsou řízeny fázově specifickými proteiny – cyklin dependentními kinázami (Cdk). Cdk jsou serin-threoninové protein kinázy, které jsou aktivovány vytvořením komplexu s další skupinou regulačních proteinů zvaných cykliny. Vytváření komplexů cyklin/Cdk je ovlivňováno řadou genů řídících dělení a diferenciaci buňky. Jednotlivá Cdk může asociovat s různými cykliny, přičemž typ navázaného cyklinu určuje, který cílový protein bude komplexem cyklin/Cdk fosforylován. Každý takto vytvořený komplex cyklinu s Cdk má v procesu regulace buněčného cyklu svoji specifickou úlohu (Nigg, 1995). Průchod G1 fází je kontrolován komplexem Cdk4 a Cdk6 s cykliny typu D. V pozdní G1 fázi je exprimován cyklin E a v komplexu s Cdk2 řídí přechod mezi G1 a S fází. Průchod buněk S fází reguluje komplex Cdk2/cyklin A a přechod mezi G2 a M fází je regulován komplexem Cdk1/cyklin B (Řezáčová, 2004).

Integrita a správnost genetické informace přenášené na dceřiné buňky je ověřována v tzv. “kontrolních bodech” (checkpoints) buněčného cyklu. U většiny buněk kontrola probíhá ve dvou základních bodech – v G1 a G2 fází. V G1/S kontrolním bodě buňka kontroluje, jestli nedošlo k poškození nebo chybě v genomové DNA, zda jsou podmínky vhodné pro proliferaci. Buňka pozastaví buněčný cyklus ještě před spuštěním replikace. Je-li genom poškozen reparačně, dojde k jeho opravě. Pokud je poškození genomu závažnější, jsou za normálních okolností aktivovány mechanismy vedoucí k programované buněčné smrti – apoptóze (Abraham, 2001). Hlavním mediátorem pro blok buněk v této fázi je protein p53. V druhém kontrolním bodě, G2/M, dochází k ověřování správnosti DNA před vstupem do mitózy (Řezáčová, 2004).

Klíčovým mechanismem pro vznik klonu nádorových buněk je tedy narušení přirozené rovnováhy mezi proliferací, diferenciací a odumíráním buněk v důsledku závažných chyb v genomu.



Obr. 1 Buněčný cyklus (Převzato od: Česká onkologická společnost, 2004)

2.2 Apoptóza

2.2.1 Definice pojmu

Již v roce 1972 Kerr et al. popsali morfologii programované buněčné smrti. Určili hlavní rysy časné fáze buněčné smrti, jimiž jsou dehydratace buňky, kondenzace jaderného chromatinu a změny v cytoplazmatické membráně. Proces programované buněčné smrti pak nazvali apoptóza (Cohen, 1993). Od této doby se nazírání na apoptózu jako takovou změnilo. Přestala být chápána pouze jako morfologicky odlišná smrt buňky a stala se komplexním a přísně regulovaným systémem biochemických reakcí. Dle současných poznatků se apoptóza definuje jako konkrétní forma geneticky řízené buněčné smrti, která neindukuje destruktivní zánětovou reakci (Krejsek et al., 2004).

V zájmu zachování integrity organismu denně odumírají apoptózou milióny buněk. Fyziologicky se takto odstraňují staré, nepotřebné a nefunkční buňky. Pokud ale buňky hynou nadměrně, můžeme hovořit o apoptóze nefyziologické. Naproti tomu nekróza je nefyziologická buněčná smrt za všech okolností, kdy buňky umírají

v důsledku výrazného poškození. Charakteristickým rysem nekrózy je progresivní dysfunkce buněčných a organelových membrán vedoucí ke ztrátě iontové homeostázy a neschopnost udržet mitochondriální dýchání a hladinu ATP nutnou k životu. Vylití buněčného obsahu do okolí pak způsobí destruktivní zánětovou odpověď. Dostává-li se buňce dostatek energie ve formě ATP a dalších nukleosid trifosfátů, dochází k buněčné reparaci nebo apoptóze, jestliže se ATP nedostává, jediným východiskem je pak nekróza (Vávrová et al., 2002).

2.2.2 Kaspázy a proces apoptózy

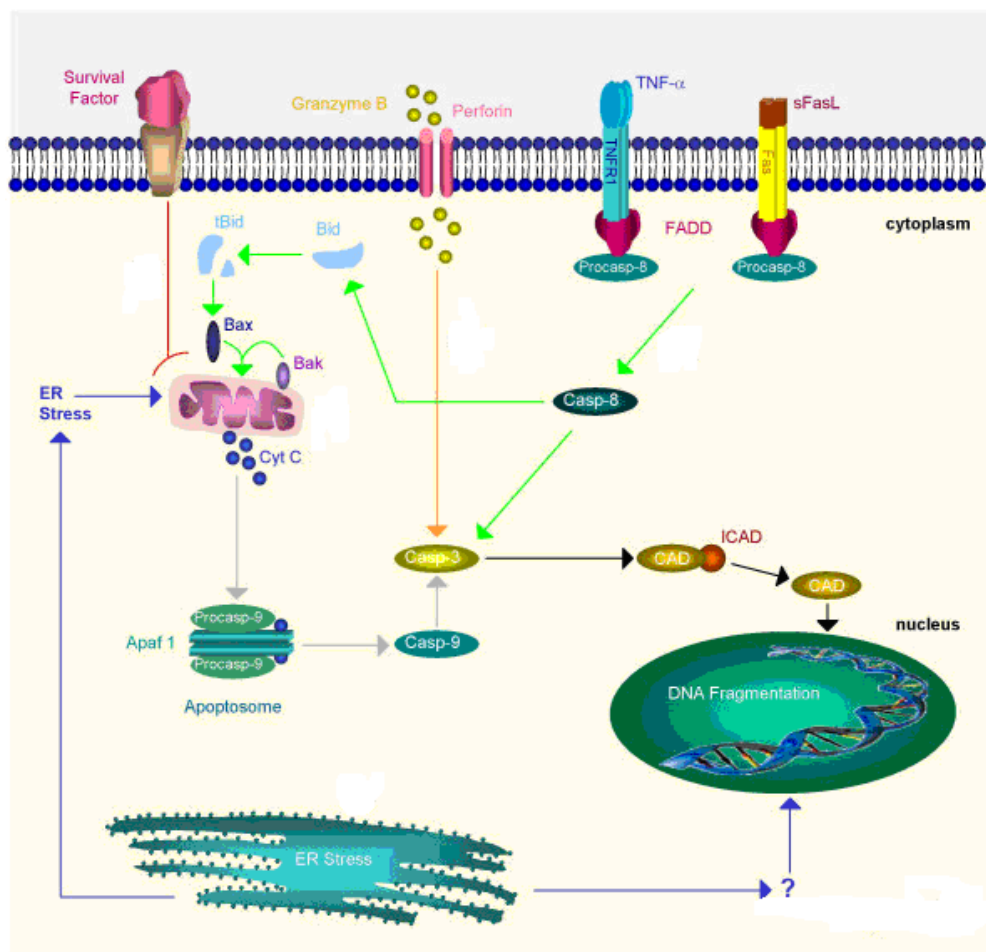
Buněčnou smrt mohou aktivovat a regulovat různé stimuly přes rozličné signální cesty. V buňce dochází k typickým morfologickým změnám, které jsou charakterizovány svaštěním buňky, kondenzací a fragmentací jádra a vznikem apoptotických tělísek (Kerr et al., 1972, Katanka a Tsuruo, 1996). Tyto změny jsou dané aktivací proteolytických enzymů – kaspáz. Kaspázy jsou cysteinové proteázy přirozeně se vyskytující v cytoplasmě. Jsou syntetizovány jako proenzymy a takto zůstávají inaktivní ve většině zdravých buněk. Po aktivaci různými smrtícími signály jsou jednoduché řetězce prokaspáz štěpeny, a výsledné podjednotky se shromažďují do heterotetramerů a formují aktivní proteázy (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Úkolem kaspáz je selektivní štěpení substrátů přítomných jak v cytoplasmě, tak v buněčném jádře (cytoskeletální struktury, regulační molekuly, biomembrány, jaderné enzymy, transportní proteiny). Štěpí například lamin B, α -fodrin, β -aktin, I^{CAD} (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease), PARP (poly-ADP ribose polymerase), proteiny zapojené do reparace DNA, spojování mRNA a replikace DNA (Thornberry and Lazebnik, 1998). Obecně můžeme kaspázy rozdělit na iniciátorové (kaspáza 8, 9 a 10) a efektorové (kaspáza 3, 6 a 7). Iniciátorové kaspázy jsou v procesu apoptózy aktivovány nejdříve. Následně proteolytickým štěpením aktivují kaspázy efektorové, které jsou zodpovědné za vlastní výkon apoptózy a rozvoj morfologických znaků (Řezáčová, 2004).

2.2.3 Vnější a vnitřní cesta apoptózy

K aktivaci těchto proteáz a následnému apoptotickému procesu vedou dvě hlavní cesty – vnější a vnitřní. Vnější cesta nastává po navázání ligandu na membránové receptory smrti (DR – Death Receptor) jako jsou CD95R (Fas-1R), TNFR1, TRAIL-R1 a R2, TRAMP. Fas-ligandem (CD95L) iniciovaná apoptóza je jednou z nejlépe prozkoumaných vnějších cest aktivace. Hraje důležitou roli v imunitní odpovědi a v eliminaci selfreaktivních lymfocytů (Hale et al., 1996, Kinloch et al., 1999). Po navázání ligandu na příslušný receptor dochází ke vzniku buněčnou smrt navozujícího signalizačního komplexu (DISC – Death Inducing Signaling Complex). DISC dává vzniknout aktivním iniciátorovým kaspázám 8, které aktivují další kaspázy, zejména efektorovou kaspázu 3. Ta vede ke konečné apoptotické smrti buňky (Song and Stelle, 1999). K podobnému sledu událostí vedoucím k navození apoptózy dochází i u ostatních typů receptorů (TRAIL-R1, TRAIL-R2).

Dalším proapoptickým signálem z vnějšího prostředí může být průnik granzymů (serinové proteázy) do cytoplasmy. Granzymy vnikají dovnitř buňky otvory tvořenými perforiny a následně jsou schopny aktivovat kaspázovou kaskádu (kaspázu 3, 7) (Krejsek et al., 2004).



Obr. 2 Apoptotické cesty (Převzato od: Dements et al., 2006)

Vnitřní cesta apoptózy, tzv. mitochondriální, je iniciována signály z vnitřního prostředí buňky, např. buněčnými metabolickými změnami, volnými radikály, anoxií, působením virů a cytostatik. Na počátku cesty stojí poškození DNA a následná aktivace proteinu p53 fosforylací. Dále pak dochází k aktivaci proapoptotických členů rodiny Bcl-2 (Bax, Bam, Bim a Bid). V nepřítomnosti smrtícího signálu je rodina Bcl-2 proteinů lokalizována na organelách odděleně. Protiapoptotičtí členové rodiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl_{xL}, Mcl-1) jsou umístěni na membránových strukturách mitochondrií, endoplasmatického retikula i jaderné membrány, zatímco proapoptotičtí členové jsou lokalizováni v cytosolu a cytoskeletu. Přijme-li buňka proapoptotický signál, pro- a protiapoptotičtí členové se setkávají na povrchu mitochondrií. Zde tvoří homo- a heterodimery, které regulují uvolnění cytochromu c z mitochondrií. Je-li cytochrom c uvolněn do cytoplasmy, může aktivovat kaspázy a indukovat apoptózu (Liu et al., 1996). Poměr pro- a protiapoptotických členů rodiny Bcl-2 představuje jeden z prahů,

určující zda buňka zanikne apoptózou či nikoliv. Dojde-li k převaze proapoptotických členů, cytochrom c se uvolní z mitochondrií a vytvoří komplex s Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1) a prokaspázou 9, tzv. apoptosom. Apoptosom aktivuje prokaspázu 3. Aktivní kaspáza 3 je nejvýznamnější efektorovou kaspázou a je zodpovědná za vlastní apoptotický proces (Vávrová et al., 2003).

V buňce pak dochází k organizovanému štěpení důležitých celulárních komponent, jaderná membrána je narušena, laminy podléhají proteolytické degradaci následované jadernou fragmentací. Jaderné fragmenty se spolu s částí cytoplasmy opouzdří a výsledkem je vznik charakteristických struktur - apoptotických tělísek. *In vivo* jsou apoptotická tělíska fagocytována řadou buněk, např. makrofágy, buňkami epitelialního, fibroblastového původu (Cohen, 1993, Vávrová et al., 2002, Tichý, 2008).

2.3 ATM kináza

Po působení různých fyzikálních a chemických faktorů může v buňce dojít k poškození DNA. Nejčastěji vznikají jednoduché nebo dvojité zlomy DNA, přičemž pro buňku nejletálnější jsou zlomy dvojité (double strand breaks – DSB). Dojde-li k takovému poškození, v místě DSB se začnou akumulovat proteiny - ATM kináza, Mre 11, Rad 50, Nbs 1, BRCA 1, Mdc 1, 53BP1 (Bekker-Jensen et al., 2006).

Jedním z prvních kroků v odpovědi na poškození DNA v lidských buňkách je aktivace kináz – kasein-kinázy 1, DNA-PK kinázy, MAP kinázy, c-Jun (JNK), ATR, a zejména ATM (ataxie-telangiektasie mutovaná kináza). ATM patří do rodiny proteinkináz příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze. Jedná se o 350 kDa velký protein, jehož hlavní úlohou jsou zejména fosforylace dalších proteinů (Tichý, 2008). V normálních buňkách se ATM vyskytuje ve formě neaktivního dimeru či multimeru. K aktivaci ATM dochází autofosforylací na serinu 1981, která vede k disociaci dimeru. K těmto dějům dochází bezprostředně po poškození DNA (Bakkenist a Kastan, 2003). Aktivovaná ATM dále fosforyluje celou řadu substrátů jako jsou p53, Mdm2, Chk1, Chk2, Brca1, Nbs1 a cAbl. Důsledkem fosforylací p53, Mdm2 a Chk2 je zástava buněčného cyklu v G1 fázi, fosforylací Nbs 1, Chk2 a Chk1 dojde k akumulaci buněk v S-fázi, fosforylovaná Chk1 a Brca1 jsou zodpovědné za blok v G2 fázi (Abraham, 2001).

Jeden z hlavních cílů ATM kinázy je protein p53, jehož regulací jsme se zabývali v naší práci. Tento protein umožňuje zástavu buněčného cyklu a reparaci a

vystupuje v G1/S kontrolním bodu. ATM kináza hraje významnou roli také v regulaci S fáze, kdy aktivuje Chk2, což vede k fosforylaci fosfatázy Cdc25A, která se váže na protein 14-3-3 a degraduje (Falck et al., 2001). Degradovaná Cdc25A dále nemůže fosforylovat Cdk2, a tak nemůže dojít k syntéze DNA. ATM reguluje i poslední kontrolní bod buněčného cyklu G2/M. Zde aktivuje Chk1 a Chk2, které následně mohou inhibovat fosforylaci Cdc25C, bez níž nedochází k aktivaci komplexu Cdk1/cyklin B1 a k progresi buněčného cyklu (Lukas et al., 2001, Hirao et al., 2000, Khanna et al., 2001).

2.4 Reparace DSB

Jsou známy dva základní mechanismy podílející se na reparaci dvojitých zlomů DNA – nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR). K nehomolognímu spojování konců dochází v průběhu celého buněčného cyklu, ale především v G1 a časně S fázi (Ma et al., 2005). Při NHEJ často dochází ke změnám ve struktuře DNA, protože nelze správně rozeznat, které části zlomů mají být spolu spojeny. Naproti tomu HR probíhá od pozdní S fáze do G2 fáze a je přesnější, k reparaci využívá homologní sekvenci DNA jako nepoškozenou matici, podle které opětovně spojí DSB a opraví tak poškozené místo (Khanna et al., 2001).

2.5 Protein p53

2.5.1 Struktura a funkce

Lidský protein p53 je tvořen 393 aminokyselinami a obsahuje 3 hlavní funkční domény. První, transaktivační doména, se vyskytuje na N-konci proteinu a je zodpovědná za aktivaci transkripce cílových genů. Na N-konci se nachází také vazebné místo pro Mdm-2. Druhá doména, tzv. centrální, je zodpovědná za sekvencně specifickou vazbu na cílové sekvence DNA. Třetí doména je lokalizována na C-konci, představuje ji tetramerizační element tohoto proteinu, důležitý pro správnou funkci p53 (Ko a Prives, 1996).

Gen pro protein p53 je lokalizován na krátkém raménku chromosomu 17. Délka genu je přibližně 20 kb (kilobází) a je složen z 11 exonů, z nichž první je nekódující, a 10 intronů (Kotala et al., 2002).

Protein p53 je tumorový supresor, jaderný fosfoprotein, který v buňce funguje jako transkripční faktor (Harris, 1996). Po poškození DNA je tento protein aktivován fosforylací. Jednu z nejdůležitějších fosforylací p53 provádí ATM kináza na serinu 15 a checkpoint kináza 2 - Chk2 (po aktivaci ATM) na serinu 20 během G1 fáze. Během G2/M fáze je p53 fosforylován na serinech 37 a 392 (Buschmann et al., 2000). Fosforylace na serinu 15 vede k inhibici aktivity Mdm2, což vede k prodloužení životnosti p53 (Tichý, 2008). Fosforylace na serinu 392 zprostředkovává stabilizaci proteinu p53 tím, že zvyšuje jeho schopnost vázat se na specifické sekvence DNA (Thompson et al., 2004). Další posttranslační modifikace zahrnují fosforylací na serinech 6, 9 a 33, defosforylací na serinu 376 a acetylaci na lysinech 320, 373 a 382. Všechny tyto fosforylace udělují proteinu p53 stabilitu a transkripční aktivitu (Canman et al., 1998, Ronai a Alarcon-Vargas, 2002). P53 se dále váže na specifické sekvence DNA a aktivuje transkripci dalších genů, které vyvolají zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi. Je-li poškození reparovatelné, umožní tak opravu DNA a v případě rozsáhlého poškození vyvolá apoptózu, a tak zabrání přenosu poškozené DNA do dceřiných buněk (Ullrich et al., 1993).

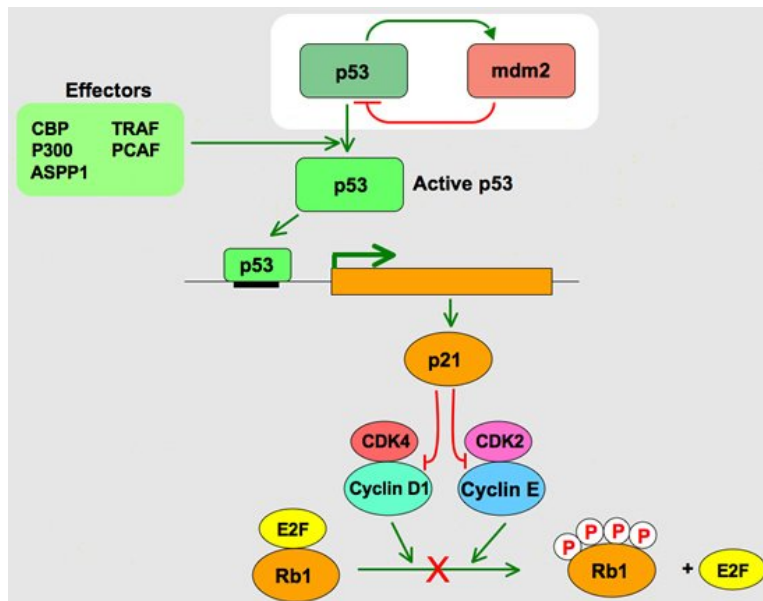
2.5.2 Spolupráce p53-Mdm2

V normálních buňkách je hladina proteinu p53 velmi nízká. Vznikající nově syntetizovaný protein je rychle degradován vlivem proteinu Mdm2 (mouse double minute 2) v proteasomu. Mdm2 je ubikvitin ligáza, která mimo jiné ubikvitinuje (kovalentně připojuje ubikvitin k lyzinům cílového proteinu) protein p53, aby mohl být rozeznán aparátem proteasomu a degradován (Uldrijan et al., 2002). Mdm2 protein reguluje aktivitu p53 blokováním jeho transkripční aktivity, exportem do cytoplasmy a následnou degradací. Samotná vazba Mdm2 na p53 pouze blokuje jeho transkripční aktivitu. K degradaci proteinu je nutný transport komplexu p53-Mdm2 z jádra buňky do cytoplasmy (Ronai a Alarcon-Vargas, 2002). Tento transport může být blokován působením p19^{ARF}, což vede k ochraně p53 před degradací (Reis et al., 2000). P53 a Mdm2 jsou navzájem v autoregulační vazbě. Protein p53 indukuje transkripci Mdm2,

ten se obratem váže na p53 a podpoří tak jeho degradaci. Dojde-li k poškození DNA, je doména p53 zodpovědná za vazbu s Mdm2 fosforylována (Ser_15, Ser_20) a dochází ke snížení afinity p53 k Mdm2 a vzestupu celkového množství p53 (Michael a Oren, 2003).

2.5.3 Mechanismus zástavy buněčného cyklu

Protein p53 hraje klíčovou úlohu v zástavě buněčného cyklu v G1 fázi. Aktivovaný protein p53 vyvolá transkripci genu pro protein p21. Protein p21 působí jako inhibitor cyklin dependentních kináz (Ko a Prives, 1996), jeho zvýšená exprese inhibuje aktivitu komplexů Cdk2/cyklin E a Cdk4/cyklin D (Dulic et al., 1994). Tyto komplexy za normálních okolností fosforylují a tím inaktivují Rb - retinoblastoma protein. Rb protein se v buňce vyskytuje ve vazbě na transkripční faktor E2F, který je nezbytný pro aktivaci transkripce genů specifických pro S fázi. V této vazbě není schopen E2F faktor zahájit transkripci. Dojde-li k fosforylaci Rb proteinu pomocí cyklin dependentních kináz, faktor E2F se uvolní z vazby, spustí se proces transkripce a buňka je dále schopna přejít do S fáze cyklu. V případě poškození DNA dojde vlivem p21 k inhibici cyklin dependentních kináz, což vede k hypofosforylaci Rb proteinu a tím k zábraně uvolnění z komplexu s faktorem E2F. Důsledkem je pak nemožnost přechodu z G1 do S fáze, tedy pozastavení buněčného cyklu (Agarwal et al., 1998).



Obr. 3 p53: zástava buněčného cyklu v G1 fázi pomocí p21 (Převzato z: The TP53 Web Site)

2.5.4 Zástava buněčného cyklu nebo apoptóza?

Aktivace p53 v reakci na stejný stimul vede v některých buněčných typech k zástavě buněčného cyklu, v jiných buněčných typech k apoptóze. Mechanismus, jakým buňka odpoví na poškození, není zatím úplně objasněn (Agarwal et al., 1998). K indukci apoptózy může dojít například vlivem převážením proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2. Je dokázáno, že po poškození DNA chemoterapeutiky, ionizujícím nebo UV zářením indukuje protein p53 expresi proapoptotických členů rodiny Bcl-2, jako je PUMA/Bcl3 a Noxa (Tichý, 2008). Naopak protiapoptotičtí členové rodiny Bcl-2 a adenovirus E1B mohou p53-dependentní apoptóze zabránit (Rao et al, 1992). Jedna z teorií je, že množství p53 musí přesáhnout určitý práh, aby došlo k indukci apoptózy (Nakano a Shinohara, 1999).

Dále je dokázáno, že v některých buněčných liniích (převážně hematopoetického původu) vedou stimuly jako jsou exprese Myc, adenovirus E1A či nepřítomnost růstových faktorů k p53-dependentní apoptóze (Lowe a Ruley, 1993, Kokontis et al., 1994). Také delece genu p21 způsobí, že místo zástavy buněčného cyklu dojde k apoptóze buňky (Polyak et al., 1997). Dalším důležitým regulátorem odpovědi na poškození DNA je Rb protein, jehož inaktivace vede ke ztrátě zástavy cyklu v G1 fázi a k indukci apoptózy. Inaktivací Rb proteinu dochází k uvolnění faktoru E2F, který dále

může indukovat apoptózu (Qin et al., 1994). Naopak nadměrná exprese Rb proteinu blokuje p53-dependentní apoptózu (Ko a Prives, 1996).

Lze říci, že o tom, zda dojde k apoptóze nebo zástavě buněčného cyklu rozhodují v buňce rozličné veličiny – rozsah poškození DNA, hladina proteinu p53, přítomnost pro- a protiapoptotických faktorů i dalších genů regulujících buněčný cyklus (Chen et al., 1996).

2.6 Cesty pro přežití buňky

V normálním lidském organismu probíhají neustálé boje mezi smrtí buňky a jejím přežitím. Aby byla udržena homeostáza, musí být tyto protichůdné události v rovnováze. Různé mechanismy v organismu zajišťují přežití buňky a stejně tak, je-li buňka poškozena, je zajištěna její smrt.

Dojde-li k poškození DNA, v buňce jsou aktivovány souběžně signály vedoucí k její smrti a signály zajišťující přežití a proliferaci buňky. Jednou z cest vedoucích k buněčnému přežití je aktivace rozsáhlé sítě mitogeny aktivovaných proteinkináz – MAPK.

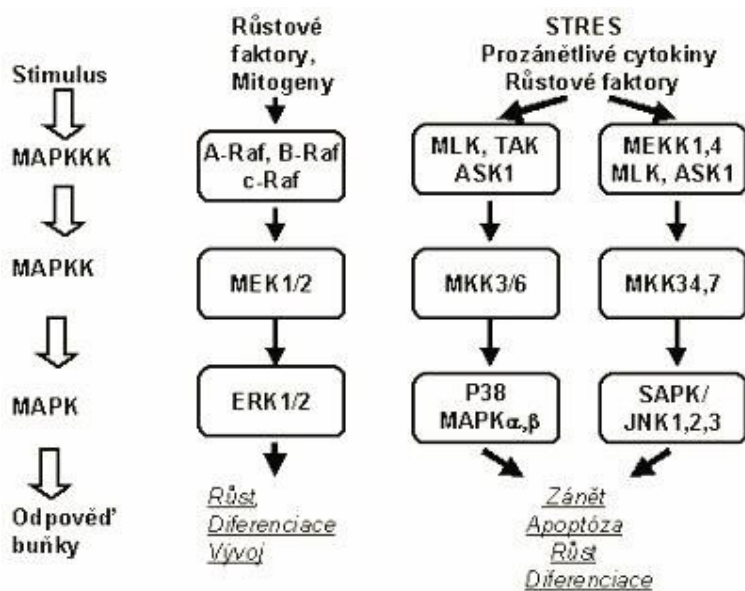
2.6.1 Mitogeny aktivované protein kinázy (MAP kinázy)

V průběhu posledních 20 let byly nalezeny rozmanité signální transdukční cesty. Mnohé z těchto cest náleží do tzv. „mitogeny aktivované protein kinázové superrodiny“. MAP kinázy jsou strukturně příbuzné serin-threoninové kinázy, které jsou aktivovány velkým množstvím odlišných stimulů působících na různé receptorové rodiny. Mezi stimuly mohou patřit hormony a růstové faktory účinkující přes tyrosin kinázové receptory (EGF-epidermal growth factor, PDGF-platelet-derived growth factor, FGF-fibroblast growth factor, insulin aj.), nebo přes cytokinové receptory (např. růstové hormony). Dalšími stimuly mohou být transformující růstové faktory (TGF- β) účinkující přes serin-threoninové kinázové receptory a zánětlivé cytokiny z rodiny TNF (tumor necrosis factor) (Kyriakis a Avruch, 2001). Vystavení buňky různým toxickým stresům nebo ionizujícímu záření indukuje také aktivaci rozličných MAPK cest. Výsledné signály hrají kritickou roli v kontrole buněčného přežívání (Dent et al., 2003).

Po aktivaci MAPK fosforylují mnohé transkripční faktory, cytoskeletální proteiny, kinázy a jiné enzymy (Qi a Elion, 2005) a vyvolávají tak rozmanité buněčné odpovědi – od proliferace, přes diferenciaci, až k apoptóze (Platanias, 2003).

V savčích buňkách bylo definováno 5 MAPK systémů: extracelulárními signály regulované kinázy (ERK1 a ERK2), Jun N-terminální kinázy (JNK1, JNK2, JNK3), p38 kinázy, ERK3/ERK4 a ERK5 (Qi a Elion, 2005). Dosud byly podrobně charakterizovány první tři zmíněné MAPK: ERK1 a ERK2, Jun N-terminální kinázy (JNK), také známé jako stresem aktivované protein kinázy (SAPK), a p38 kinázy. ERK1 a ERK2 jsou aktivovány zejména v odpovědi na růstové faktory a cytokiny, regulují proliferaci, diferenciaci a ve výsledku působí mitogenně. Členové rodiny p38 a JNK jsou aktivováni zejména stresovými stimuly, v menší míře cytokiny a růstovými faktory. Tyto kinázy regulují apoptózu a zástavu buněčného cyklu, indukují buněčnou diferenciaci, stejně tak produkci cytokinů a zánětlivých působků (Zima a Štern, 2002).

MAPK tvoří síť kaskád, které zprostředkovávají buněčnou odpověď na řadu stimulů. Každá MAPK cesta je založena na fosforylaci členů rodin MAP kinázy kinázy kinázy (MAPKKK, MAP3K, MEKK), MAP kinázy kinázy (MAPKK, MAP2K, MEK) a MAP kinázy (MAPK). Jednotliví členové MAPK jsou aktivováni duální fosforylací na threoninových (Thr) a tyrosinových (Tyr) zbytcích ve specifickém motivu (Thr-Xaa-Tyr) předcházejícími kinázami. Pro klasické ERK kinázy (ERK1/2/5) je tento motiv Thr-Glu-Tyr, pro p38 kinázy Thr-Gly-Tyr a pro JNK kinázy Thr-Pro-Tyr (Platanias, 2003).



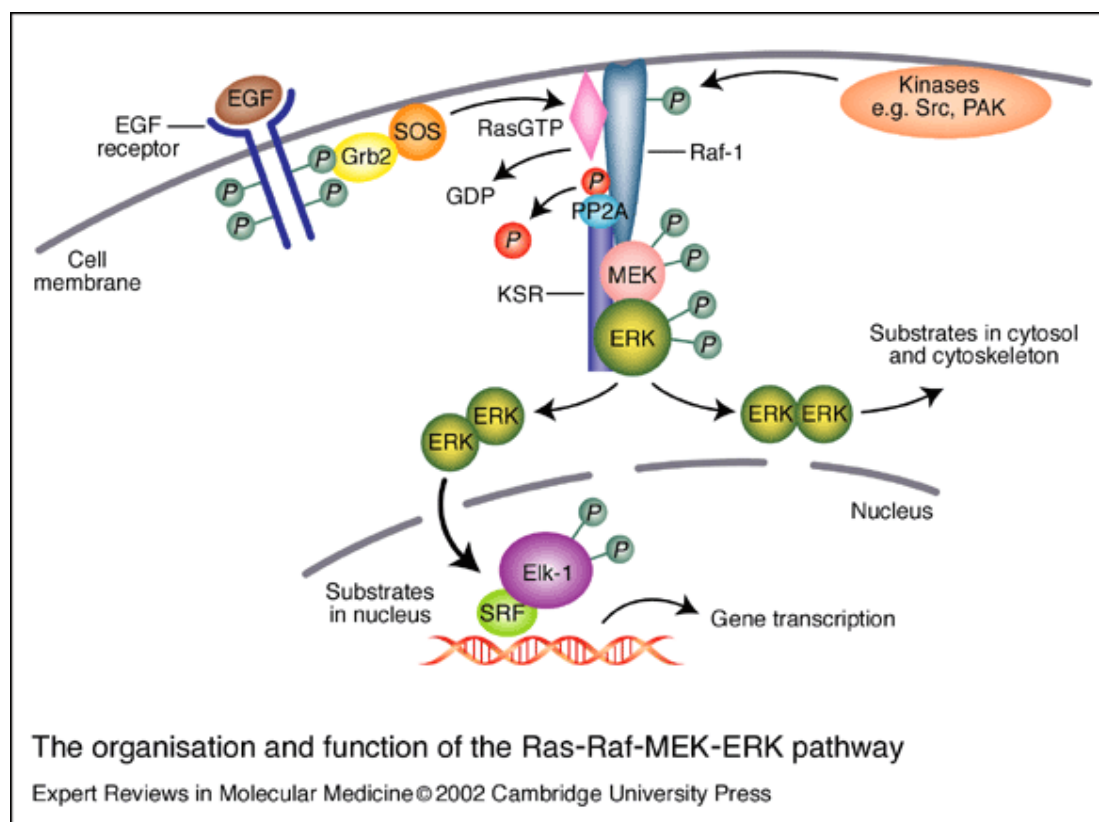
Obr. 4 Zjednodušené schéma signálních drah realizovaných prostřednictvím MAPK (Převzato od: Krajská centra primární péče, 2005)

2.6.2 Ras-Raf-MEK-ERK

Ras-Raf-MEK-ERK cesta hraje klíčovou roli v regulaci buněčného růstu. Rodina onkogenů Ras zahrnuje N-Ras, H-Ras a K-Ras (Inder et al., 2008). Ras se aktivuje vazbou ligandu (např. růstového faktoru) na tyrosin kinázové receptory jako jsou EGRF (epidermal growth factor receptor), HER-2, vascular EGRF, PDGRF (platelet-derived growth factor receptor) a MET či na receptory spřažené s G-proteiny. Protein Ras patří do rodiny G-proteinů, jeho aktivita závisí na typu vázaného guanosinfosfátu: váže-li GTP, je ve formě aktivní, váže-li GDP je inaktivní. Proces výměny nukleotidů je regulován pomocí dvou protichůdně působících skupin proteinů – GEF (guanine nucleotide exchange family, podporuje vazbu GTP) a GAP (GTPase activating protein, podporuje štěpení GTP na GDP) (Kyriakis, 2008). K aktivaci Ras tak přispívá např. SOS (son of sevenless), což je guaninový nukleotidový výměnný faktor, který podporuje odstranění GDP z Ras. Ras potom může vázat GTP, aktivuje se, spustí kaskádu reakcí, a umožní tak přenos extracelulárních signálů do jádra. Při přenosu dochází ke kaskádě specifických fosforylací.

Další krok po aktivaci Ras zahrnuje aktivaci rodiny serin threoninových kináz známých jako Raf kinázy. Tato rodina je složena ze tří izoforem Raf-1, A-Raf, B-Raf. Řadíme je mezi MAP kinázy kinázy kinázy (MAPKKK). Raf kináza poté přímo

fosforyluje a aktivuje MAP kinázu kinázu (MAPKK) na dvou serinových zbytcích v kinázové aktivační smyčce. Tyto fosforylace jsou nutné k úplné aktivaci MEK1/2. Aktivovaná MEK1/2 poté přímo fosforyluje ERK1/2 (MAPK) na tyrosinových a threoninových zbytcích (Liu et al., 2001). K fosforylaci dochází na zbytcích 202 a 204 u ERK1 a na zbytcích 180 a 182 u ERK2 (Newton et al., 2000). Nejprve byla popsána ERK2 (MAPK2) jako 42 kDa velký protein s kinázovou aktivitou, následně byla identifikována izoforma tohoto enzymu ERK1 (MAPK1) o velikosti 44 kDa, proto se jinak také nazývají p42 a p44 (Dent et al., 2003). ERK1 a ERK2 obsahují 83 % identických aminokyselin a jsou exprimovány v různém rozsahu ve všech tkáních (Roux a Blenis, 2004).



Obr. 5 Ras-Raf-MEK-ERK signální cesta (Převzato od: Cushing P, 2006)

2.6.3 Cíle ERK1/2

ERK1/2 po aktivaci fosforylují různé substráty, které vyvolají rozličné buněčné odpovědi od cytoskeletálních změn po genovou transkripci. Mezi cíle ERK1/2 patří velké množství substrátů jako jsou různé membránové proteiny (CD120a, Syk, calnexin), jaderné substráty (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc, STAT3), cytoskeletální proteiny (neurofilamenty, paxillin) a také regulátory buněčného cyklu jako jsou Bcl-2 a cPL2 (Qi a Elion, 2005).

MAPK také katalyzují fosforylaci a aktivaci několika proteinových kináz zvaných MAPK-aktivované protein kinázy (MK). Rodina MK proteinů zahrnuje ribosomální S6 kinázu (RSK), mitogeny a stresem aktivované kinázy (MSK), MAPK-interagující kinázy (MNK), MAPK-aktivované protein kinázy 2, 3 a 5. MK jsou příbuzné kinázy, které v odpovědi na mitogeny a stresové stimuly zprostředkovávají velké množství biologických funkcí (Roux a Blenis, 2004). Členové rodiny RSK jsou aktivovány výhradně prostřednictvím ERK1/2, MSK a MNK jsou aktivovány i cestou p38. Studie ukázaly, že někteří členové RSK mohou podporovat progresi G1 fázi prostřednictvím fosforylaci inhibitoru cyklin dependentních kináz p27. Fosforylace p27 pomocí RSK1 a RSK2 podporuje asociaci s 14-3-3 proteinem a zabraňuje tak proteinu p27 v translokaci do jádra. Specifické role MK v MAPK signalizaci jsou neustále v procesu studií (Roux a Blenis, 2004).

V závislosti na síle a trvání stimulace může ve výsledku dojít k buněčné proliferaci (závislé na růstových faktorech), k inaktivaci tumorových supresorových genů, k necitlivosti na signály růstových inhibitorů, k zabránění apoptózy, kaspázové inhibici, k rezistenci na chemoterapeutika a záření prostřednictvím MDR-1 (multidrug resistance gene) a dalším růst podporujícím událostem. Tato cesta tedy hraje zásadní roli v regulaci širokého spektra buněčných funkcí, zahrnujících proliferaci, diferenciaci, onkogenní transformaci a její rozvinutí. Neadekvátní aktivací této dráhy může v buňce dojít k maligní transformaci a ke vzniku nádorové proliferace (Sridhar et al., 2005).

2.6.4 Regulace buněčného cyklu prostřednictvím ERK

Ras-Raf-MEK-ERK kaskáda se zúčastňuje regulace buněčného cyklu zejména v G0/G1 fázi a G1/S přechodu. Po proběhnutí aktivační kaskády dochází k translokaci ERK do jádra a navození exprese genů, například genů pro cykliny D a E

(Burgermeister a Seger, 2008). Komplexy cyklinů s cyklin dependentními kinázami se ukazují jako primární cíle této cesty v odpovědi na extracelulární stimuly. Jednou z hlavních funkcí této MAP kinázové cesty je kontrola těchto kinázových komplexů v G1 a S fázi. (Wilkinson a Millar, 2000).

Cesta ERK posttranslačně ovlivňuje seskupení cyklin D a E dependentních kináz a jejich katalytickou aktivitu a také syntézu cyklin dependentních inhibitorů patřících do rodiny p21.

Můžeme konstatovat, že ERK cesta pozitivně reguluje buněčný cyklus během G1 fáze, a to podporou transkripce cyklinu D1, a taktéž jeho seskupováním s cyklin dependentními kinázami Cdk4 (Sherr a Roberts, 1999).

Pomocí této kaskády jsou regulovány i klíčové molekulární události, které přispívají ke vstupu do S-fáze. Patří mezi ně zahájení syntézy cyklin A a cyklin E mRNA jako důsledek Cdk4/cyklin D1 zprostředkované fosforylace pRB a uvolnění E2F. Dále nahromadění Cdk2/cyklin A a Cdk2/cyklin E kinázových komplexů díky zvýšené expresi cyklin dependentních inhibitorů a také uvolnění katalyticky aktivních Cdk2 komplexů prostřednictvím degradace inhibitoru cyklin dependentních kináz, proteinu p27 (Wilkinson a Millar, 2000).

Ke kompletnímu porozumění vlivu MAPK cest na buněčný cyklus *in vivo* bude nutné přesné určení, jak tyto cesty interagují s ostatními signálními cestami v konkrétních buněčných typech.

2.6.5 ERK cesta a leukémie

Jak již bylo zmíněno dříve, aktivace ERK kináz je regulována přes proteinovou signalizační kaskádu zahrnující Ras, Raf, MEK1/2 a ERK1/2. Tato kaskáda je velmi dobře prostudována u různých druhů leukémií, kde vede k podpoře buněčného růstu a k zábraně apoptózy hematopoetických buněk. Raf-Ras-MEK-ERK cesta se zúčastňuje vzniku mitogenních odpovědí v podstatě u všech hematologických malignit, jako jsou lymfomy, akutní i chronická leukémie a mnohočetný myelom. Hraje klíčovou roli v patogenezi NK (natural killer) granulární lymfocytární leukémie a podílí se také na udržování přežívání maligních lymfocytů u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) (Platanias, 2003).

N-Ras a K-Ras mutace, které vedou ke konstitutivní aktivaci GTPázy a následné aktivaci Raf-MEK-ERK cesty, se vyskytují až ve 20-30 % akutních myeloidních a akutních lymfoblastických leukémií (Sridhar et al., 2005).

Nicméně je zřejmé, že i jiné, na ERK nezávislé mechanismy, jsou zahrnuty v procesech leukemogeneze. Nezávisle na rolích jiných signálních cest, které se také účastní patogeneze akutních leukémií, je studium ERK cest farmakologickým cílem a může být přínosem pro klinické léčení (Milella et al., 2001).

Poznání, že MAP kinázová signální kaskáda hraje důležitou roli v regulaci apoptózy a růstu maligních hematopoetických buněčných liniích, vedla v posledních letech k intenzivním studiím s cílem přesně charakterizovat mechanismy, které jsou odpovědné za tyto účinky.

Studie ukázaly synergický efekt chemoterapeutických látek a léčiv, které inhibují MAP kinázovou aktivaci a navozují potlačení růstu a apoptózu leukemických buněk. V současnosti jsou vyvíjeny a testovány inhibitory Raf-1, které vykazují protinádorové účinky. Vysvětlení působení MEK inhibitorů společně s chemoterapeutickými látkami a radioterapií může poskytnout důležité informace pro budoucí klinické léčení (Dent et al., 1998).

2.6.6 MAPK cesty v odpovědi na dvojité zlomy DNA a indukci apoptózy

Radiační terapie je jednou z nejvýznamnějších protinádorových strategií. V radioterapii je nejvíce využívána frakcionace dávky záření, vedoucí k eradikaci nádorových buněk a k co nejmenšímu poškození zdravých tkání. Bohužel však často dochází ke vzniku radiorezistentního nádorového klonu komplikující využití této terapie. Již Pirollo et al. (1997) popsali, že buněčná rezistence je často spojena s molekulárními drahami vedoucími u normálních buněk k buněčnému růstu nebo diferenciaci.

Podle dosavadních znalostí vyvolává poškození buněk ionizujícím zářením a různými dalšími genotoxickými stresory kompenzační aktivaci mnoha MAPK signálních drah, která se rozbíhá souběžně s aktivací ATM-Chk1/2-p53 kaskády. Dochází jak k aktivaci klasické mitogeny aktivované ERK kaskády, tak k aktivaci JNK a p38 MAPK. Zatímco c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) a p38 MAPK se převážně

spojují s proapoptickým působením, signály zprostředkované kaskádou ERK primárně souvisí s buněčnou proliferací a přežitím, a jsou spojovány s antiapoptickým působením (Golding et al., 2007). Reakce na dvojité zlomy DNA může vést i k modulaci exprese a uvolňování autokrinních faktorů (např. TGF- α , TNF- α) a receptorů smrti, které se rovněž podílí na aktivaci MAPK.

Vystavujeme-li buňky ionizujícímu záření, dochází k aktivaci členů rodiny Raf (MAPKKK). Například u A431 nádorových buněk bylo zjištěno, že vystavení těchto buněk ionizujícímu záření v dávce 2 Gy vede k aktivaci Raf-1, ale nikoliv B-Raf. Jiné studie na fibroblastech s deletovanými geny pro Raf-1 a B-Raf ukázaly, že ztráta funkce Raf-1 a B-Raf snižuje růstovými faktory indukovanou aktivaci ERK1/2 a zvyšuje apoptózu. Stejné chování bylo zaznamenáno po ozáření těchto buněk. Tyto výsledky jsou v rozporu se studii na embryonálních fibroblastech s delecí genu pro Raf-1, ve kterých signalizace růstovými faktory k ERK1/2 není změněna, i když Raf-1 je nefunkční. Z toho vyplývá, že některé buňky, zvláště embryonální fibroblasty, mohou využít kompenzační signalizaci od jiných MAPKKK molekul, je-li exprese Raf-1 kompletně zrušena (Dent et al., 2003).

Dent et al. (1999) popsali u karcinomových buněk A431 a MDA-MB-231, že aktivace MEK1/2-ERK1/2 kaskády má radioprotektivní efekt. Inhibice této dráhy zvyšuje zabití buněk apoptózou po ozáření. Na druhou stranu, u mnoha buněčných typů se zdá, že signály zprostředkované ERK nehrají významnou úlohu v kontrole radiosensitivity, nebo jí dokonce zvyšují narušením zástavy cyklu v G2/M fázi (Warenius et al., 1996). Celkový efekt závisí i na délce aktivace či inhibice kaskády, i zde jsou však data kontroverzní (Dent et al., 2003). Krátká aktivace MAPK kaskády může vést ke zvýšení proliferace buněk, zatímco dlouhá aktivace MAPK může vést k inhibici DNA syntézy přes superindukci p21 (Park et al., 1999). Některé práce ukázaly, že u buněk bez funkční p53 zářením aktivovaná cesta přes epidermal growth receptors (ErbB) může vést k vzestupu p21 a bloku buněk v G1/S i G2/M fázi, což ukazuje, že zářením aktivovaná kaskáda MAPK a rovněž p21 hrají významnou úlohu v regulaci průchodu buňky přes buněčný cyklus po poškození DNA.

Na regulaci buněčné smrti se ERK signální cesta podílí i regulací různých dalších proteinů a transkripčních faktorů. Dochází k aktivaci faktorů podporujících přežití (Bcl-XL, MCL-1, c-FLIP, inaktivace BAD), aktivaci transkripčních faktorů podporujících přežití (CREB, C/EBP β), ale schopných i podpořit buněčnou smrt (EGR-1, AP-1), ke zvýšení exprese reparačních proteinů (ERCC1, XRCC1, XPC).

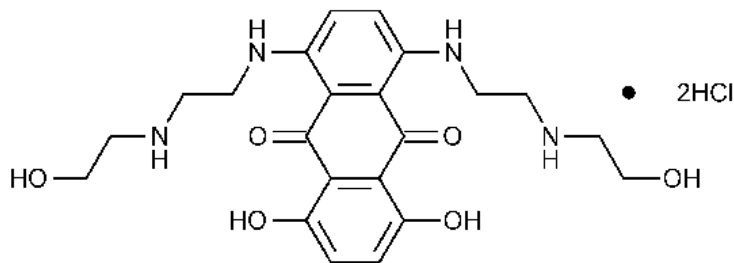
Jakým způsobem souvisí signální cesty ERK1/2 a ATM-p53? I zde jsou dosud známé údaje nejednotné. Bylo prokázáno, že u některých buněčných typů se kinázy MEK1/2-ERK1/2 podílí na aktivaci negativního regulátoru p53 proteinu Mdm-2 jeho fosforylací na serinu 166 (Malmlof et al., 2007) a zvýšením jeho syntézy (Phelps et al., 2005). Golding et al. (2007) prokazují u buněk maligního gliomu, že inhibice MEK1/2-ERK1/2 snižuje významně aktivaci ATM kinázy v odpovědi na DSB a zároveň že inhibice ATM snižuje zářením indukovanou aktivaci ERK1/2. Yan et al. (2007) při inhibici MEK1/2-ERK1/2 u buněk karcinomu prsu MCF-7 po ozáření nepozorovali snížení aktivace ATM, avšak prokazují snížení aktivace ATR, a zároveň při inhibici ATM a ATR nepozorovali pokles zářením vyvolané aktivace ERK1/2.

Lze uzavřít, že MAPK cesty významně regulují buněčný osud po ozáření. ERK signalizace může chránit nebo zvýšit citlivost na záření v závislosti na buněčném typu a délce inhibice ERK cesty, i když přesné zapojení jednotlivých částí kaskády a jejich propojení s ostatními cestami regulujícími odpověď na DNA poškození, jeho reparaci, zástavu buněčného cyklu a indukci apoptózy zůstává předmětem intenzivního bádání.

2.7 Hematopoetická nádorová linie MOLT-4

Buněčná linie MOLT-4 je odvozena od lidské T lymfocytární leukémie. Buňky na svém povrchu exprimují znaky CD1⁺ (49 %), CD4⁺ (55 %), CD5⁺ (72 %) a CD7⁺ (77 %). MOLT-4 obsahují wild typ proteinu p53, jsou velmi citlivé k účinkům ionizujícího záření a cytostatických látek, a proto jsou vhodným modelovým systémem pro studování molekulárních mechanismů odpovědi na poškození DNA (Tichý et al., 2007).

2.8 Mitoxantron



Obr. 6 Vzorec mitoxantronu

(1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]anthracenen-9,10-dion dihydrochlorid)

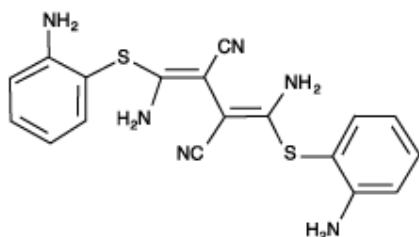
Mitoxantron je syntetický derivát antracendionu, který vykazuje převážně interkalační účinky. Interkalace spočívá v navázání cytostatika vodíkovými vazbami na DNA. Výsledkem tvorby stabilního komplexu s DNA je inhibice replikace a transkripce a dochází ke zlomům vláken. V terapeutických koncentracích však hraje zásadní roli inhibice topoisomerázy II. Tento enzym se váže na oba řetězce dvoušroubovice DNA, postupně je přerušuje, uvolní nadšroubovici a následně DNA opět spojí. Tím umožní průběh replikace separaci chromosomů během mitózy. Mitoxantron vytváří s topoisomerázou II kovalentní komplex. Tím nedojde ke zpětnému spojení DNA a vzniká tak permanentní dvojitý zlom - DSB. Mimo jiné se na cytotoxickém účinku mitoxantronu může podílet i jeho pevná vazba na cytoskeletální protein cytokeratin 8 (Tomšík, 2008).

Mitoxantron na rozdíl od antracyklinů nepůsobí tvorbu kyslíkových radikálů, přesto však má toxické účinky na myokard. Z hlediska buněčného cyklu patří mezi nescifická cytostatika, s určitou převahou inhibice ve fázi G2. V plazmě se rychle váže na proteiny a proniká do krevních elementů. Vylučování je třífázové, s poločasy 15 minut, 3 hodiny (zpětná redistribuce látky z krvinek) a 38 až 298 hodin.

V klinické praxi je mitoxantron užíván k léčbě karcinomu prsu, vaječníků a akutní myeloblastické leukémie (v kombinaci s cytarabinem). Dále se indikuje jako cytostatikum druhé volby u Hodgkinovy choroby a nehodgkinských lymfomů. Doplňkovým lékem může být též u sarkomů měkkých tkání, u mezoteliomu, karcinomu žaludku, u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu močového měchýře (Klener, 1996).

V naší práci jsme působili mitoxantronem na buňky MOLT-4. Mitoxantron zde působí jako inhibitor topoisomerázy II a způsobuje dvojitý zlomy DNA.

2.9 U0126



Obr. 7 Struktura U0126

U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien) je chemicky syntetizovaná organická sloučenina fungující v buňce jako inhibitor kaskády mitogeny aktivovaných protein kináz (MAPK).

U0126 v buňce přímo inhibuje mitogeny aktivované protein kinázy kinázy MAPKK 1 a 2, MEK-1 a MEK-2. Inhibice je selektivní pro MEK-1 a MEK-2, U0126 téměř neovlivňuje kinázovou aktivitu protein kinázy C, Abl, Raf, MEKK, ERK, JNK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, Cdk2 nebo Cdk4 (Favata et al., 1998).

K inhibici je kromě U0126 ještě používán strukturálně nepříbuzný inhibitor PD98059. Oba jsou nekompetitivními inhibitory MEK1/2 a zabraňují tak aktivaci ERK1/2. ERK1/2 signalizace je klíčovým regulátorem buněčné proliferace, a proto inhibitory této cesty vstupují do popředí klinických studií jako potenciální protinádorová činitelé (Roux a Blenis, 2004).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metodika

3.1.1 Buněčné kultury a kultivační podmínky

Buňky lidské T-lymfocytární leukémie MOLT-4 byly získány z ATCC (American Type Culture Collections, Manassas, VA, USA). Buňky jsme kultivovali v IMDM – Iskově modifikaci Dulbeccova media (Dulbecco, Sigma, St. Louis, USA) s 20 % obsahem fetálního telecího séra, L-glutaminem a penicilinem. Buňky byly inkubovány při 37 °C a kontrolované atmosféře 5 % CO₂. Pro stanovení počtu buněk jsme do zkumavky napipetovali 50 µl trypanové modři a 50 µl buněčné suspenze a důkladně promíchali. Buňky jsme počítali v Bürkerově komůrce v 50 čtvercích. Výsledek byl vyjadřován jako počet buněk x 10⁴/ml. Každý druhý den jsme kulturu pasážovali tak, aby jejich koncentrace byla 2 x 10⁵ buněk/ml. Používané buňky neprošly více jak 20 pasážemi.

3.1.2 Mitoxantron

Buňky jsme vystavovali různým koncentracím mitoxantronu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,3 mg mitoxantronu v 2,5 ml sterilní vody a skladován při -20 °C. Dalším ředěním jsme připravili pracovní roztok o koncentraci 10 nmol/l. Buňky byly suspendovány v kompletním médiu v koncentraci 2 x 10⁵ buněk/ml a byly vystavovány koncentracím mitoxantronu v rozmezí 0,1 – 10 nmol/l.

3.1.3 U0126 (MEK1/2 inhibitor)

Rozpuštěním 5 mg U0126 v 1,31 ml DMSO (dimethyl sulfoxid) jsme připravili zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l. Roztok byl skladován v temnu při teplotě -20 °C. V pokusech jsme pracovali s koncentrací 10 µmol/l, na 1 ml média jsme přidávali 1 µl zásobního roztoku U0126.

3.1.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem. Částice jsou v suspenzi pod tlakem vhněny do přístroje, kde vytvoří kontinuální tok tekutiny, v němž jsou částice segregovány jednotlivě za sebou. Ve chvíli, kdy částice laserový paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl – forward scatter (FSC) a boční rozptyl – side scatter (SSC). FSC je charakterizován lomem světla o malém úhlu (2° - 13°) a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu (SSC) je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury, resp. granularity. Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva (fluorochromy) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla, avšak již o odlišné vlnové délce. V průtokové cytometrii se používají fluorochromy, které mají většinou stejné spektrum absorpční, ale jiné emisní. Průtokové cytometry využívají jako světelného zdroje nejčastěji argonový laser o excitační vlnové délce 488 nm. Analýzy jsme prováděli na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter).

3.1.5 DNA analýza

Měření obsahu DNA poskytuje informace o zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a procentu apoptotických buněk v populaci. Pro detekci se využívá fluorochromů, které se po permeabilizaci buněčné membrány stechiometricky váží na DNA. V našem případě jsme jako fluorochrom použili propidium jodid. Jedním z časných dějů při apoptóze je aktivace endonukleáz, které preferenčně štěpí DNA v internukleosomální sekci. Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností. Po permeabilizaci membrány dochází k úniku nízkomolekulární DNA z buněk. Tyto buňky se barví propidium jodidem méně než buňky v G1 fázi buněčného cyklu a na cytometrickém profilu obsahu DNA můžeme pozorovat tzv. „sub-G1 vrchol“.

Před vlastní analýzou jsme přibližně 5×10^5 buněk v suspenzi promyli 2x ledovým fosfátovým pufrům (PBS), stočili a po dobu minimálně 30 minut (až 24 hodin) jsme je permeabilizovali v 70 % ethanolu. Po centrifugaci při 2300 ot./15 min. jsme slili ethanol. Buňky jsme promyli ve 3 ml fyziologickém roztoku a následně v 3 ml PBS pufru. Dále jsme přidali 0,5 ml PBS, 0,5 ml citrátového pufru a nechali inkubovat přesně 5 minut při pokojové teplotě. Opět jsme buňky promyli v PBS, přidali 0,5 ml Vindelova roztoku a nechali suspenzi inkubovat 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Suspenzi jsme přelili do kyvetky a změřili na průtokovém cytometru. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA) a bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

Roztoky a chemikálie:

- ✓ Citrát-fosfátový pufr (pH 7,8) – 0,2 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mol/l kyselina citronová
- ✓ Vindelův roztok – 1 mol/l TRIS, RNáza (1mg/1ml PBS), NaCl (60 mg), propidium jodid (5mg/5ml PBS), dH_2O

3.1.6 Detekce apoptózy pomocí Apoptestu

Cílem bylo stanovit apoptózu u buněk MOLT-4 v reakci na mitoxantron samotný nebo v kombinaci s inhibitorem U0126. Pro detekci apoptózy jsme použili APOPTTEST V-FITC kit (DakoCytomation; Brno, CZE). Buňky během apoptózy translokují na svůj povrch fosfatidylserin, který se nachází na vnitřní straně membrány. Annexin V je fosfolipidy vázající protein, který za přítomnosti vápenatých iontů vykazuje selektivitu a vysokou afinitu vůči fosfatidylserinu. Vazbou annexinu značeného fluorescenčním barvivem FITC (fluoresceinisothiocyanát) na fosfatidylserin lze prokázat buňky v časně fázi apoptózy. Pozdní fázi apoptózy lze prokázat pomocí propidium jodidu. Přibližně 5×10^5 buněk jsme centrifugovali při 4 °C (1100 otáček/10 minut). Poté jsme přidali 2 ml PBS a stejně jako v předchozím kroku nechali suspenzi centrifugovat. Po slítí supernatantu jsme k buňkám přidali 90 μl 10x koncentrovaného ledového vápenatého pufru, 1 μl annexinu, 2,5 μl propidium jodidu a inkubovali 10 minut na ledu a ve tmě. Hned po přidání 500 μl vápenatého pufru jsme vzorky proměřili

na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter). Výsledky jsme zpracovali pomocí programu WinMDI2.8. Zjistili jsme procentuální zastoupení živých, časně či pozdně apoptotických a nekrotických buněk MOLT-4 v reakci na působení mitoxantronu, inhibitoru U0126 a jejich kombinace.

Roztoky a chemikálie:

- ✓ APOPTTEST V-FITC kit (DakoCytomation; Brno, CZE) pro průtokovou cytometrii – Annexin V-FITC
- ✓ 10x koncentrovaný vápenatý pufr
- ✓ propidium jodid

3.1.7 Lýza buněk

Lýzou uvolníme z buněk proteiny pro provedení elektroforézy a Western blottingu. Potřebovali jsme 10^7 buněk, které jsme měli v objemu 20 ml. Nejprve jsme suspenzi 10 minut centrifugovali při 1300 otáčkách a + 4 °C. Supernatant jsme slili a k sedimentu přidali 5 ml PBS s 1 μ mol/l orthovanadičnanem sodným. Opět jsme centrifugovali za stejných podmínek, supernatant slili a do téměř suchého sedimentu jsme přidali 0,5 ml ledového lyzovacího pufru. Suspenzi jsme zamíchali na vortexu a inkubovali 30 minut na ledu, přičemž každých 5 minut jsme ji intenzivně promíchávali. Na závěr inkubace jsme suspenzi resuspendovali injekční stříkačkou a centrifugovali 30 minut při 14 000 otáčkách a + 4 °C. Supernatant jsme slili do kryozkumavky a zamrazili při -80 °C.

Zlyzovali jsme 4 vzorky (tab. 1) po 4 a 24 hodinách po aplikaci mitoxantronu.

Tab. 1 Vzorky lyzované po 4 a 24 hodinách inkubace

Vzorek č.:	
1	kontrola
2	0,5 nmol/l mitoxantron
3	U0126
4	0,5 nmol/l mitoxantron + U0126

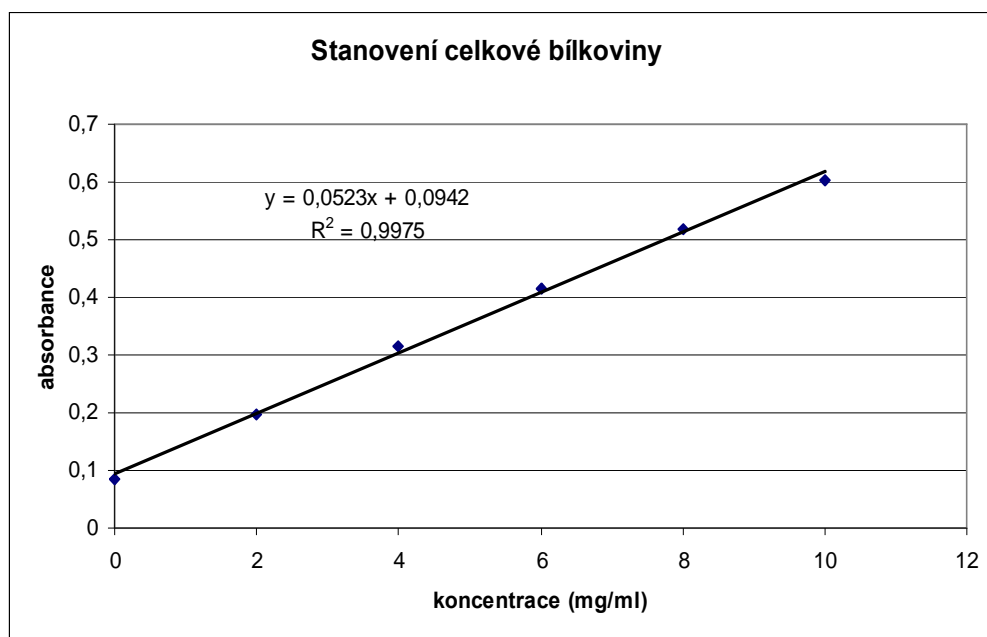
Roztoky a chemikálie

- ✓ Fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS, pH 7) – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, H_2O
- ✓ Fosfátový pufr s Tweenem 20 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, Tween 20 (0,05 g/100 ml PBS), dH_2O
- ✓ Lyzovací pufr – 137 mmol/l NaCl, 50 mmol/l NaF, 20 mmol/l TRIS base pH 8, 1 mmol/l Na_3VO_4 , 10 % glycerol, 1 % oktyl- β -D-glukopyranosid
- ✓ Complete™ Mini tabletky
- ✓ Orthovanadičnan sodný

3.1.8 Stanovení celkové bílkoviny

Principem stanovení je reakce s biuretovým činidlem, kdy bílkoviny a peptidy reagují s měďnatými ionty v alkalickém prostředí za vzniku modrofialového komplexu. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku. Pro stanovení jsme použili modifikovanou metodu, kde po vzniku komplexu Cu^{++} dochází k redukci tohoto komplexu na Cu^+ a kationty Cu^+ následně reagují s kyselinou bicinchoninovou a peptidovou vazbou za vzniku barevného produktu.

Nejprve jsme si do mikrotitrační destičky připravili koncentrační řadu standardů (Protein Standard, Biorad), vzorky (1:9 – vzorek: dH_2O) a přidali jsme činidlo pro zviditelnění reakce (roztok CuSO_4 : roztok bicinchoninové kyseliny – 1:50). Destičku jsme 30 minut inkubovali při 37 °C a pak proměřili absorbanci na přístroji Tecan Infinite M200 při vlnové délce 562 nm. Na základě absorbance standardů o přesných koncentracích jsme si vytvořili kalibrační křivku (obr. 8).



Obr. 8 Kalibrační křivka – standard pro vzorky lyzované za 4 a 24 hodiny

Z kalibrační křivky jsme si vypočítali koncentraci celkové bílkoviny u jednotlivých vzorků a následně objemy nutné pro nanášení stejného množství bílkoviny do jamek (20 μg) (tab. 2).

Tab. 2 Koncentrace a nanášky proteinů

Číslo vzorku	Standard - celková bílkovina ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Množství proteinu ve vzorku ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Nanáška na jamku (μl)
1	2,51	7,98	11,96
2	2,80	7,15	10,72
3	2,79	7,20	10,80
4	2,69	7,43	11,14
5	3,29	6,08	9,10
6	3,15	6,35	9,52
7	2,83	7,06	10,60
8	2,41	8,31	12,46

Roztoky a chemikálie:

- ✓ Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit: roztok bicinchoninové kyseliny (uhličitan sodný, vinan sodný, hydrogenuhličitan sodný v 0,1 mmol/l hydroxidu sodném, pH 11,25), pentahydrát síranu měďnatého (4 % roztok), proteinový standard (bovinní sérový albumin - BSA), dH₂O

3.1.9 Elektroforéza a Western blot

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je metoda, která umožňuje separaci látek na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Vlivem odlišné rychlosti migrace jednotlivých částic ve stejnosměrném elektrickém poli se vytváří charakteristické zóny separovaných látek v gelu. 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 pouze na základě své molekulové hmotnosti.

Western blotting je metoda, která umožňuje detekci specifického proteinu ve směsi. Jedná se o přenos elektroforeticky rozdělených proteinů na nitrocelulosovou nebo polyvinylidenfluoridovou membránu s následnou detekcí proteinů pomocí protilátek. Po přenosu proteinů se membrána inkubuje s mlékem (Non-fat dry milk, Bio-Rad), které blokuje nespecifické navázání protilátky na membránu. Poté se nepřímo značí protein, který nás zajímá, pomocí systému primární-sekundární protilátka značená křenuvou peroxidázou. Ta katalyzuje reakci se substrátem, jejímž výsledkem je produkt s chemiluminiscencí, kterou detekujeme na fotografický papír.

Příprava gelu

Nejprve jsme si připravili rozdělovací gel, převrstvili jsme ho 650 µl butanolu a nechali ho 60 minut polymerovat. Po odstranění butanolu jsme rozdělovací gel převrstvili gelem zaostřovacím, do něj vložili hřebínek a nechali polymerovat 30 minut (tab. 3).

Příprava a nanesení vzorků

Rozmrazili jsme si marker molekulové hmotnosti (Precision plus proteinTM standards, Prestained SDS-PAGE standards, Bio-Rad) a vzorky. Ke každému z nich

jsme přidali 3x koncentrovaný vzorkový pufr v poměru 2:1 (vzorek:pufr), vortexovali a 5 minut zahřivali na vodní lázni na 95 °C. Na závěr jsme vzorky krátce stočili na centrifuze. Sestavili jsme si MiniProtean3 (Bio-Rad), elektroforetickou komoru jsme naplnili running pufrem a nanесли vzorky do jamek.

Elektroforéza

Running pufr jsme doplnili po okraj, přikryli víkem, umístili do ledu a zapojili celou aparaturu do zdroje. Elektroforéza probíhala při 200 V a 0,24 A přibližně 50 minut. Průběh elektroforézy jsme vizuálně kontrolovali.

Příprava membrán

Na čistém podkladu, v rukavicích, jsme nastříhali a označili polyvinylidenfluoridové membrány. Membrány jsme 1 minutu aktivovali třepáním v methanolu.

Western blot

Po skončení elektroforézy jsme gely 10 minut promyli v transfer pufru a pak spolu s membránami složili do blotovacích sendvičů a blotovali za intenzivního chlazení a podmínek: 100 V, 0,35 A po dobu 120 minut.

Blokování membrán a inkubace v primární protilátce

Namíchali jsme si 150 ml 10 % mléka v TBS-Tween 0,05 %. Po blottingu jsme rozložili sendvič a podle molekulového markeru jsme zkontrolovali správnost a efektivnost blottingu. Membrány jsme umístili do misky s TBS a třepali 2 x 5 minut. Membrány jsme blokovali v připraveném mléku při pokojové teplotě 60 minut. Po blokaci jsme je promyli 2 x 5 minut v TBS. Z parafilmu jsme si připravili pouzdra, vložili do nich membrány, převrstvili naředěnou primární protilátkou (tab. 4) a inkubovali za mírného třepání přes noc při 4 °C.

Inkubace se sekundární protilátkou

Membrány jsme po inkubaci s primární protilátkou promývali 5 x 10 minut v TBS s Tweenem 0,05 % a 1 x 10 minut v TBS. Poté jsme je nechali inkubovat se sekundární protilátkou (1:1000 – 1:25000 dle protilátky - tab. 4) v 5 % mléku v TBS

s Tweenem 0,05 % po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Membrány jsme opět hodinu promývali.

Detekce

Membrány jsme nechali 1 minutu inkubovat v chemiluminiscenčním roztoku (ECL, Chemiluminiscence blotting substrate, Roche). Signál jsme zachytili na modrocitlivé filmy (Foma, Hradec Králové). Filmy jsme zpracovávali v chemikáliích Adefo a vyvolávacím automatu Fomei.

Roztoky a chemikálie:

- ✓ 12 % SDS polyakrylamidový gel
- ✓ Running pufr (pH 8,3) – TRIS-base (15,0 g), glycin (72,0 g), SDS (2,5 g), deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 2500 ml)
- ✓ Vzorkovací pufr - 3x koncentrovaný vzorkovací SDS pufr, β -merkaptoethanol, bromfenolová modř
- ✓ Transfer pufr - TRIS-base (15,15 g), glycin (72,0 g), methanol (1000 ml), deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 5000 ml)
- ✓ 10x koncentrovaný TBS (pH 7,6) – TRIS-base (48,4 g), NaCl (160,0 g), 1 mol/l HCl (76 ml), deionizovaná voda (doplněno na celkový objem 2000 ml)
- ✓ TBS – míchán ze zásobního roztoku 10x koncentrovaného TBS – 1 TBS:9 dH₂O
- ✓ TBS-0,05 % Tween 20 – 1 ml Tween 20 + 200 ml 10x TBS + 1800 ml dH₂O
- ✓ Primární a sekundární protilátky

Tab. 3 Složení zaostřovacího a rozdělovacího gelu (množství na přípravu 2 gelů)

	Zaostřovací 4 %	Rozdělovací 12 %
dH₂O	3,05 ml	5,0 ml
Tris-HCl 1,5 mmol/l (pH 8,8)	---	3,75 ml
Tris-HCl 1,5 mmol/l (pH 6,8)	1,25 ml	---
Akrylamid (30 %)	0,65 ml	6,0 ml
SDS	75 μ l	75 μ l
APS	37,5 μ l	37,5 μ l
TEMED	3,75 μ l	5 μ l

Tab. 4 Původ, výrobce, ředění primárních a sekundárních protilátek

Protilátky	původ	primární	sekundární	ředění	výrobce
p53	myš	1:750	1:2000	mléko	Exbio
p53_Ser15	králík	1:1000	1:1000	BSA	Cell Signaling
p53_Ser392	myš	1:500	1:2000	BSA	Exbio
ERK	myš	1:2000	1:2000	mléko	Cell Signaling
p21	myš	1:1000	1:1000	mléko	Sigma
lamin-B	myš	1:100	1:1000	mléko	Calbiochem
aktin	myš	1:20000	1:25000	mléko	Sigma

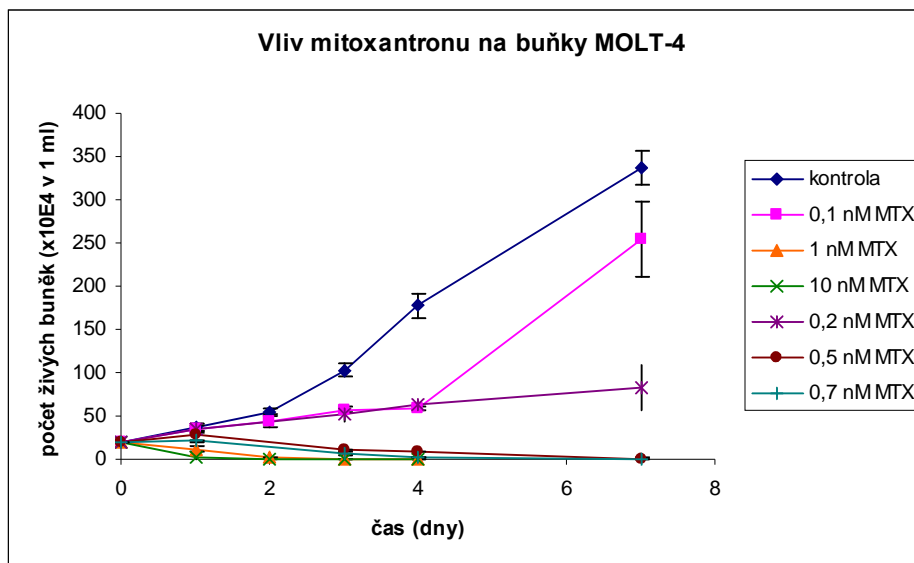
3.2 Přístroje

- ✓ Inkubátor I6150 Juan
- ✓ Centrifuga Hermle Z 323 K
- ✓ Centrifuga BR4
- ✓ Centrifuga MPW
- ✓ Centrifuga Hettich, Universal 32R
- ✓ Protean 3 (Biorad, Praha, CZ)
- ✓ Minihybridizér Probiot Jp.
- ✓ Cell Lab Quanta SC (Beckman-Coulter, Fullerton, USA)
- ✓ Laminární box MSC 12 Juan
- ✓ Hlubokomrazící box Sanyo
- ✓ Vyvolávací automat Fomei
- ✓ Spektrofotometr Tecan Infinite M200

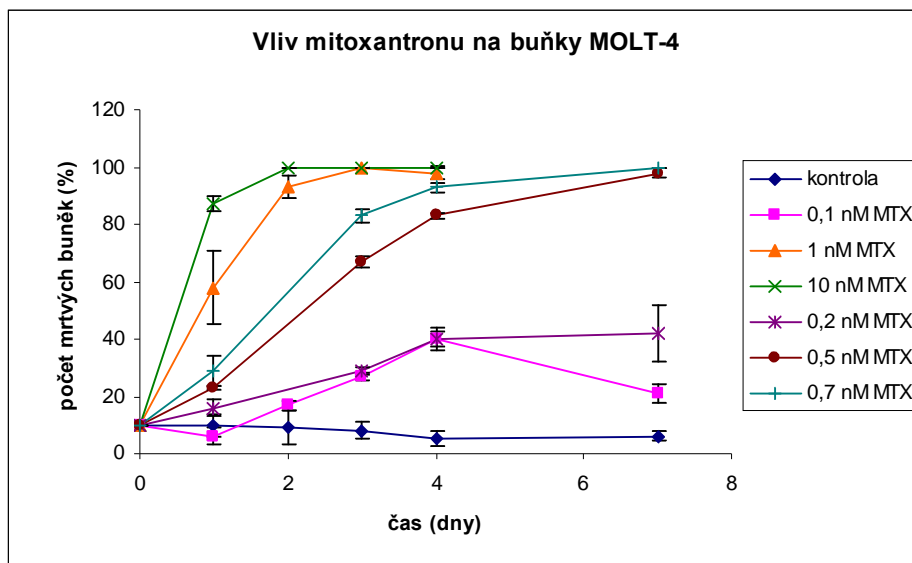
4 Výsledková část

4.1 Proliferační aktivita a viabilita buněk MOLT-4 po působení mitoxantronu

Buňky MOLT-4 byly kultivovány v IMDM médiu a inkubovány při 37 °C v kontrolované 5 % CO₂ atmosféře. Na počátku jsme nasazovali vždy 2 x 10⁵ buněk do 1 ml. Buňky jsme vystavovali různým dávkám mitoxantronu a sledovali jsme jejich proliferační aktivitu. V intervalech 1, 2, 3, 4 a 7 dní jsme odebrali z rakviček 50 µl buněčné suspenze, přidali ji k 50 µl trypanové modři, a následně jsme buňky počítali v Bürkerově komůrce. Provedli jsme tři nezávislé experimenty, z nichž byl stanoven průměr a směrodatné odchylky. Ze získaných hodnot jsme vytvořili grafy závislosti počtu živých a mrtvých buněk po působení daných koncentrací mitoxantronu na čas. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jak příslušné koncentrace ovlivňují viabilitu buněk a vybrat vhodné dávkové schéma pro další pokusy.



Obr. 9 Graf závislosti počtu živých buněk na čase po působení různých koncentrací mitoxantronu



Obr. 10 Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase po působení různých koncentrací mitoxantronu

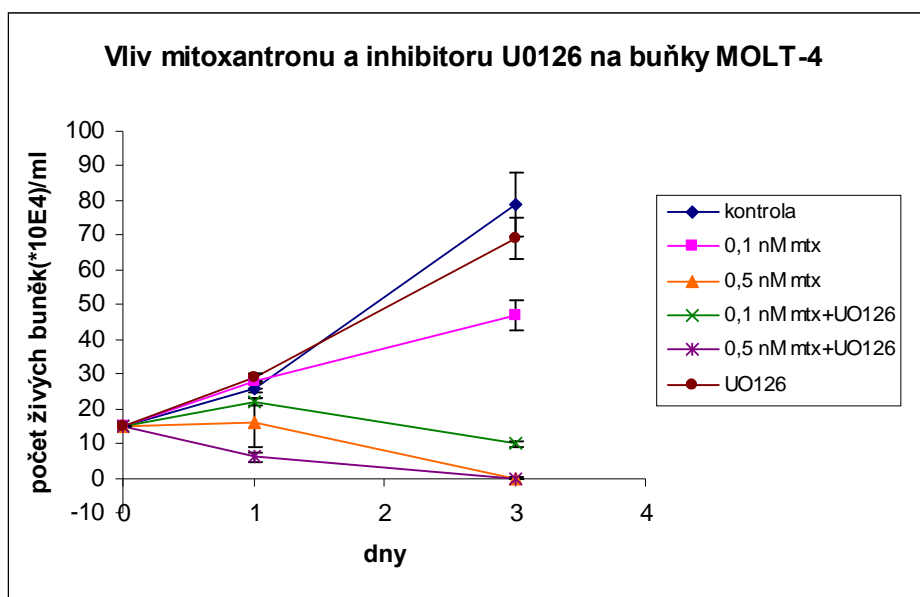
Kontrolní skupinu tvořily mitoxantronem neovlivněné buňky. Průběh kontrolní křivky v grafu proliferace (obr. 9) i viability (obr. 10) naznačuje, že experiment proběhl za vhodných podmínek. Sledujeme logaritmický nárůst počtu živých buněk na čase, procento mrtvých buněk se s časem téměř nemění.

Po působení 0,1 nmol/l mitoxantronu sledujeme po 1, 2, 3 a 4 dnech mírný vzestup počtu živých buněk, stoupá i procento buněk mrtvých. Téměř stejný průběh sledujeme v těchto intervalech vystavíme-li buňky koncentraci 0,2 nmol/l mitoxantronu. Po 7 dnech působení 0,1 nmol/l mitoxantronu dochází k výraznému nárůstu počtu živých buněk a poklesu počtu buněk mrtvých. Tato tendence se projevuje také po působení 0,2 nmol/l mitoxantronu, avšak v menší míře. Koncentrace 0,1 a 0,2 nmol/l bezprostředně nevede k usmrcení buněk, po delším intervalu působení dochází k adaptaci buněk a obnovuje se jejich životaschopnost. Působíme-li na buňky koncentrací 0,5 nmol/l mitoxantronu dochází k postupnému poklesu počtu živých buněk a výraznému nárůstu počtu buněk mrtvých. Po týdenním působení je tato koncentrace již absolutně letální. Křivky viability po působení 1 nmol/l mitoxantronu ukazují postupný pokles proliferací aktivity buněk v čase. Po třech dnech působení jsou již všechny buňky usmrceny. Křivky znázorňující působení koncentrace 10 nmol/l mitoxantronu ukazují nejstrmější poklesy počtu živých buněk a nárůsty počtu buněk mrtvých. DNA poškození je nereparovatelné, po druhém dni působení je již tato koncentrace pro buňky absolutně letální (obr. 9, 10).

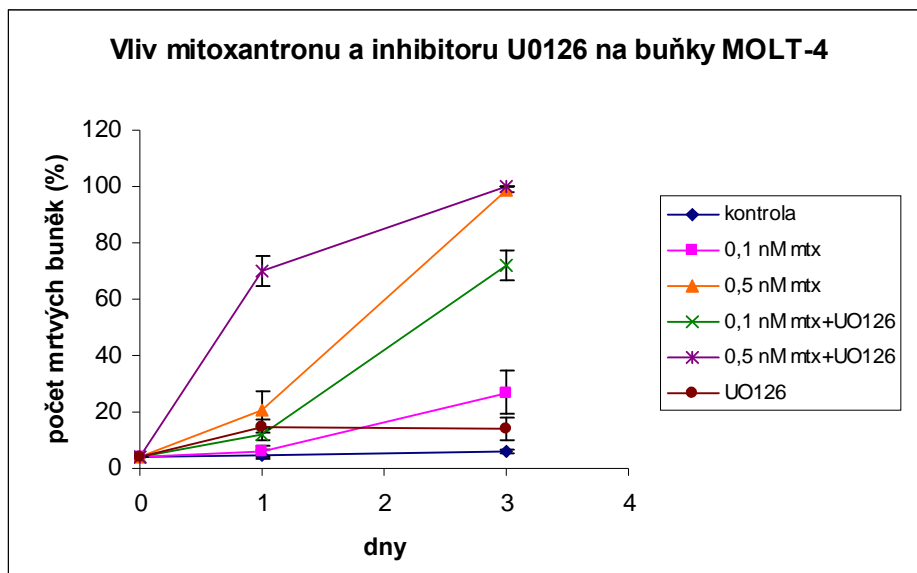
Z uvedených závislostí je patrné, že nejvhodnější koncentrace pro další studia se pohybují v rozmezí koncentrací 0,1 – 0,5 nmol/l. Pro další experimenty jsme vybrali koncentrace mitoxantronu 0,1 a 0,5 nmol/l.

4.2 Proliferační aktivita a viabilita buněk MOLT-4 po působení mitoxantronu a inhibitoru U0126

V tomto experimentu jsme stanovili počet a viabilitu buněk MOLT-4 v reakci na 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantron, na inhibitor U0126 a jejich kombinace. Buňky byly kultivovány v IMDM médiu a inkubovány při 37 °C v kontrolované 5 % CO₂ atmosféře. Na počátku jsme nasazovali $1,5 \times 10^5$ buněk do 1 ml. Buňky jsme počítali vždy první a třetí den inkubace s danými látkami. Provedli jsme tři nezávislé experimenty, z nichž byl stanoven průměr a směrodatná odchylka. Ze získaných hodnot jsme vytvořili grafy závislosti počtu živých a mrtvých buněk po působení daných látek na čase.



Obr. 11 Graf závislosti počtu živých buněk na čase po působení mitoxantronu, U0126 a jejich kombinací



Obr. 12 Graf závislosti počtu mrtvých buněk na čase po působení mitoxantronu, U0126 a jejich kombinací

V souladu s předchozím zjištěním se po působení 0,1 nmol/l mitoxantronu počet živých buněk postupně zvyšuje, zatímco po působení 0,5 nmol/l mitoxantronu jejich počet klesá a třetí den působení jsou již všechny buňky mrtvé. Po působení samotného U0126 dochází k mírně snížené proliferaci a mírnému snížení viability oproti kontrole. U0126 inhibicí MEK1/2 vyřadí jednu z možných cest vedoucí k podpoře buněčného růstu (Roux a Blenis, 2004) a pravděpodobně tak způsobí vyšší odumírání buněk. Porovnáme-li působení samotného mitoxantronu a mitoxantronu v kombinaci s inhibitorem U0126, průběh křivky se znatelně mění. Po prvním dni působení mitoxantronu v kombinaci s U0126 je počet živých buněk nižší než po působení samotného mitoxantronu a stoupá procento mrtvých buněk. Třetí den působení 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu v kombinaci s U0126 je pro buňky již absolutně letální (obr. 11, 12). Můžeme konstatovat, že po poškození DNA samotným mitoxantronem je do dějů zapojena cesta MEK1/2-ERK1/2, podporující buněčnou proliferaci, a apoptózou umírá méně buněk. Inhibujeme-li vlivem působení inhibitoru U0126 kinázu MEK1/2, nedochází k aktivaci ERK1/2, cesta pro přežití buněk je blokována a po působení mitoxantronu umírá více buněk.

4.3 Detekce apoptózy pomocí průtokové cytometrie

Použitím této metody od sebe můžeme rozlišit různá stádia apoptózy a nekrózu. Podle změn v buněčné membráně můžeme apoptózu rozdělit na časnou a pozdní. Při časně apoptóze je bariérová a transportní funkce membrány ještě zachována, při pozdní apoptóze nikoliv. Dvojím značením buněk Annexinem V a propidium jodidem (PI) od sebe můžeme jednotlivé typy buněčné smrti rozlišit.

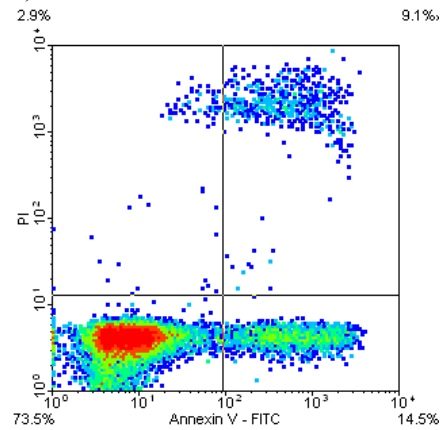
Molekuly fosfatidylserinu jsou v živých buňkách umístěny pouze na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Jedním z projevů časně apoptózy je translokace molekuly fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu cytoplazmatické membrány. Na tuto molekulu se za přítomnosti Ca^{2+} váže Annexin V (Vávrová et al., 2002). U časně apoptotických buněk je membrána ještě nepropustná pro PI. Časně apoptotické buňky jsou tedy Annexin V pozitivní a PI negativní. V pozdně apoptotických a nekrotických buňkách PI proniká narušenou cytoplazmatickou membránou do cytoplazmy a specificky se váže na nukleové kyseliny. Pozdně apoptotické buňky jsou Annexin V i PI pozitivní. Naproti tomu živé buňky jsou Annexin V i PI negativní.

V experimentu jsme stanovili apoptózu buněk MOLT-4 v reakci na 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantron, na inhibitor U0126 a jejich kombinace. První skupinu tvořily kontrolní buňky, v druhé skupině jsme buňky vystavovali působení 0,1 nmol/l mitoxantronu, v třetí byly vystaveny 0,5 nmol/l mitoxantronu. Ve čtvrté skupině jsme na buňky působili pouze inhibitorem U0126, v páté 0,1 nmol/l mitoxantronem v kombinaci s inhibitorem U0126, v šesté 0,5 nmol/l mitoxantronem v kombinaci s inhibitorem U0126. Měření jsme prováděli na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC po 24 a 72 hodinovém působení daných látek. Výsledky byly zpracovány do grafů pomocí programu WinMDI2.8.

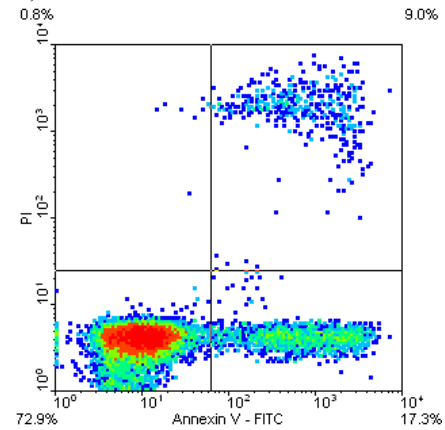
4.3.1 Analýza Annexin V/PI

4.3.1.1 Analýza Annexin V/PI za 24 hodin

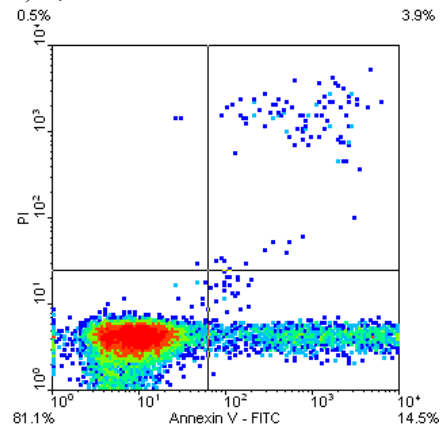
a) kontrola



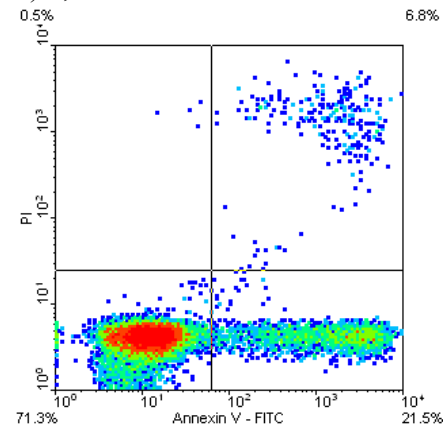
b) U0126



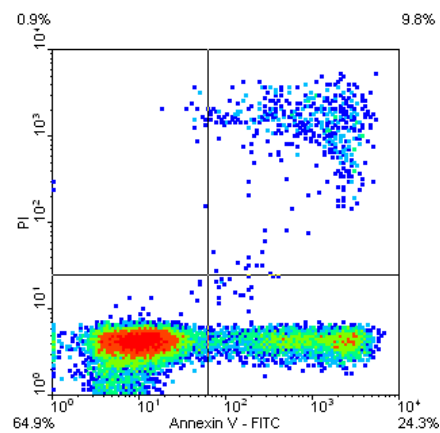
c) 0,1 nmol/l mtx



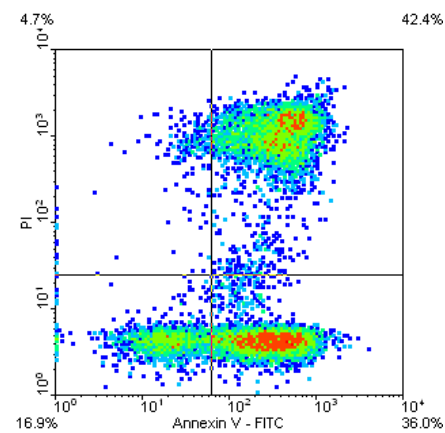
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



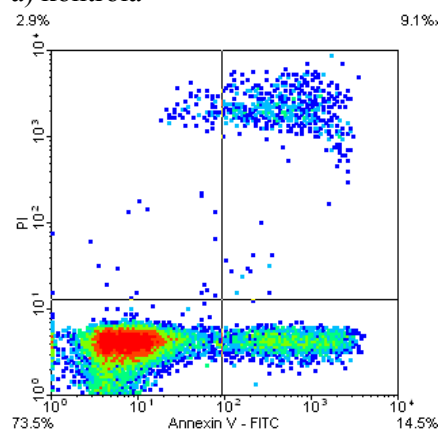
f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



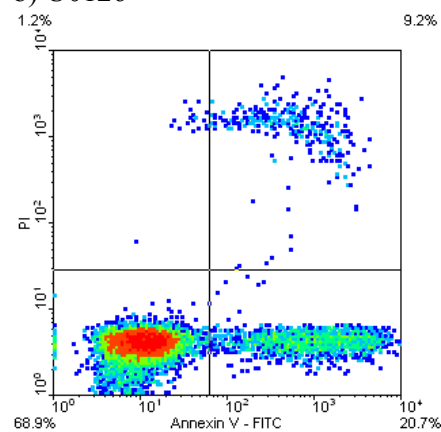
Obr. 13 a-f Analýza časně a pozdně apoptotických buněk MOLT-4 pomocí dvojího značení Annexinem V a PI po 24 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

4.3.1.2 Analýza Annexin V/PI za 72 hodin

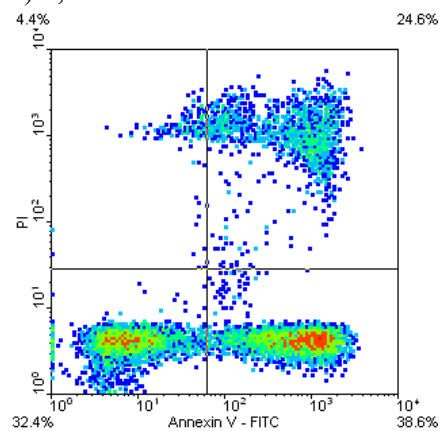
a) kontrola



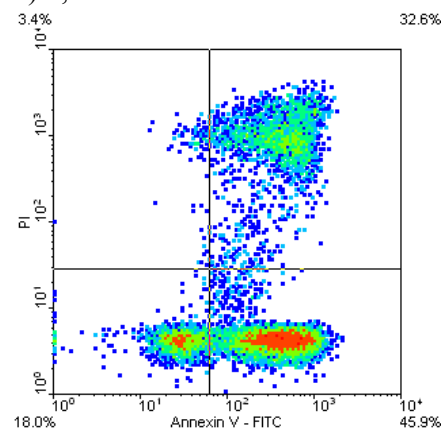
b) U0126



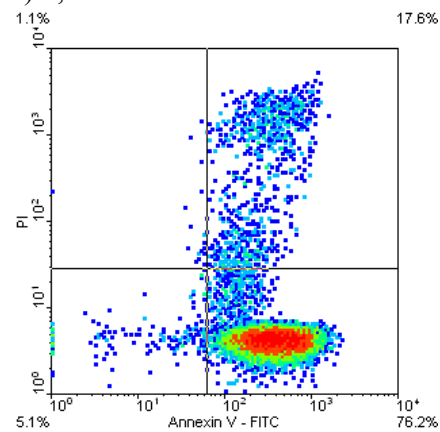
c) 0,1 nmol/l mtx



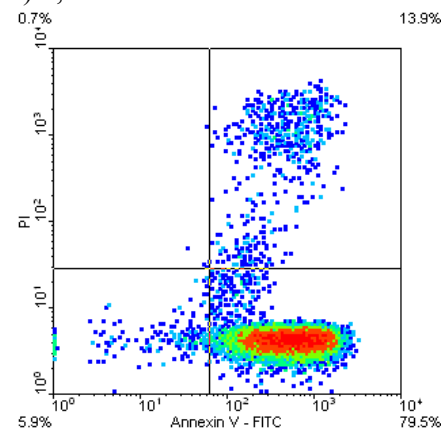
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



Obr. 14 a-f Analýza časně a pozdně apoptotických buněk MOLT-4 pomocí dvojího značení Annexinem V a PI po 72 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

V kontrolní skupině se po 24 hodinách inkubace vyskytuje 73,5 % živých buněk, 14,5 % časně apoptotických buněk a 9,1 % pozdně apoptotických buněk (obr. 13 a). Po 72 hodinách je v kontrolní skupině patrný nárůst živých buněk a pokles buněk apoptotických. Procento živých buněk činí 77,9 %, časně apoptotických 14,3 % a pozdně apoptotických 6,9 % (obr. 14 a).

Srovnáme-li kontrolní buňky a buňky ovlivněné 0,1 nmol/l mitoxantronem, po 24 hodinách ještě tato koncentrace nevede ke zvýšené apoptóze (obr. 13 a, c). Vliv 0,1 nmol/l mitoxantronu se zde projevil až po 72 hodinovém působení, kdy došlo ke snížení počtu živých buněk na 32,4 %, zvýšení počtu časně apoptotických buněk na 38,6 % a pozdně apoptotických na 24,6 % (obr. 14 c).

Při kombinaci 0,1 nmol/l mitoxantronu s inhibitorem U0126 dochází oproti působení samotného mitoxantronu ke zvýšené apoptóze. Po 24 hodinovém působení 0,1 nmol/l mitoxantronu s U0126 činí počet živých buněk 71,3 %, časně apoptotických 21,5 % a pozdně apoptotických 6,8 % (obr. 13 d). Po 72 hodinovém působení dochází k výraznějším změnám, počet živých buněk je 18 %, časně apoptotických 45,9 % a pozdně apoptotických 32,6 % (obr. 14 d). U0126 inhibicí MEK1/2 zastaví cestu napomáhající buněčné proliferaci a přežívání, a tak po poškození DNA mitoxantronem je více buněk posíláno do apoptózy.

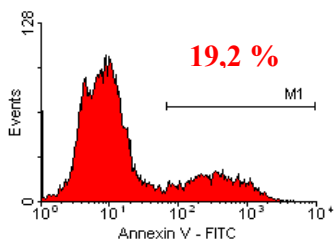
Při aplikaci 0,5 nmol/l mitoxantronu je po 24 hodinách působení patrný nárůst časně apoptotických buněk na 24,3 %, pozdně apoptotických buněk je 9,8 %, živých 64,9 % (obr. 13 e). Po 72 hodinovém působení 0,5 nmol/l mitoxantronu jsou téměř veškeré buňky poslány do apoptózy, časně apoptotických buněk je 76,2 %, pozdně apoptotických 17,6 %, živých pouze 5,1 % (obr. 14 e).

Po 24 hodinovém působení 0,5 nmol/l mitoxantronu s U0126 činí počet časně apoptotických buněk 36 %, pozdně apoptotických 42,4 % a živých 16,9 % (obr. 13 f). Po 72 hodinách je počet časně apoptotických buněk 79,5 %, pozdně apoptotických 13,9 % a živých pouze 5,9 % (obr. 14 f). Srovnáme-li působení samotného 0,5 nmol/l mitoxantronu a 0,5 nmol/l mitoxantronu s inhibitorem U0126, je opět patrné, že inhibicí MEK1/2 dochází vlivem působení mitoxantronu ke zvýšené apoptóze než bez inhibice této kinázy, což je patrné zejména 24 hodin po ovlivnění.

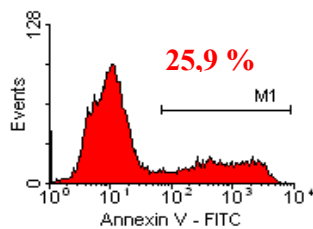
4.3.2 Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC

4.3.2.1 Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC za 24 hodin

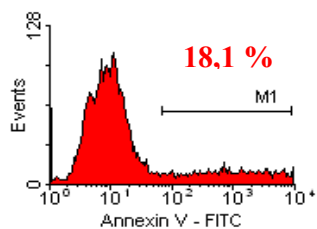
a) kontrola



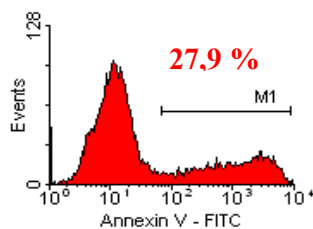
b) U0126



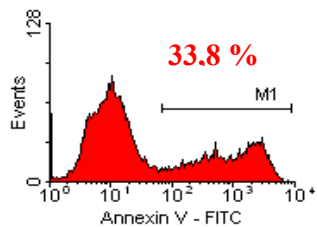
c) 0,1 nmol/l mtx



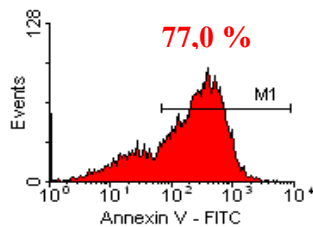
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



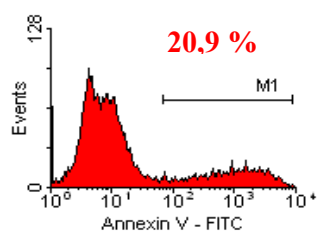
f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



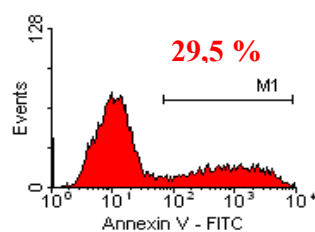
Obr. 15 a-f Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC po 24 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

4.3.2.2 Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC za 24 hodin

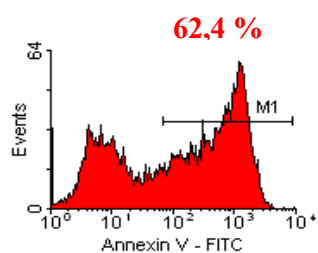
a) kontrola



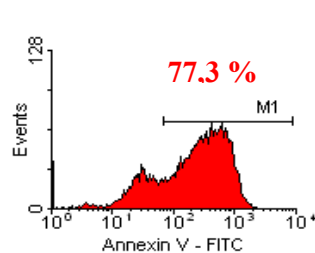
b) U0126



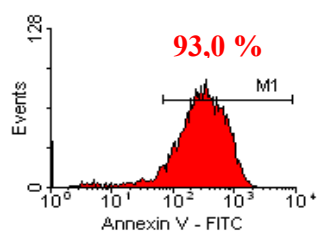
c) 0,1 nmol/l mtx



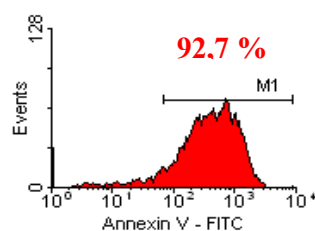
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



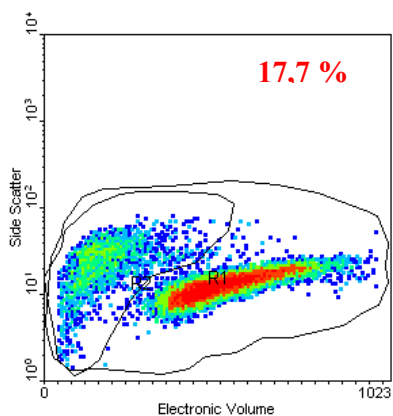
Obr. 16 a-f Jednparametrické histogramy Annexin V/FITC po 72 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

Na histogramech je pro lepší přehlednost ukázáno zastoupení apoptotických buněk (obr. 15 a-f, 16 a-f). Na ose x je znázorněna intenzita fluorescence Annexin V-FITC, na ose y počet buněk. Procenta udávají celkový počet apoptotických buněk a korelují s předchozí analýzou Annexin V/PI.

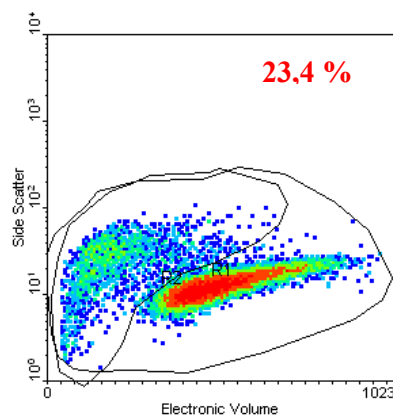
4.3.3 Dvouparametrická analýza Side-scatter/objem

4.3.3.1 Dvouparametrická analýza Side-scatter/objem za 24 hodin

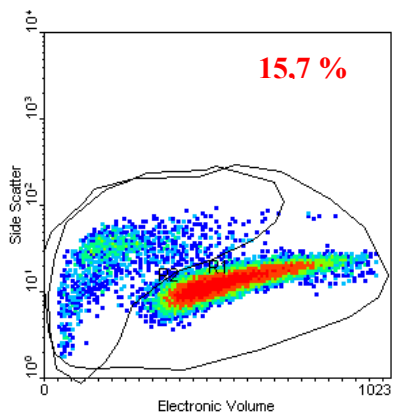
a) kontrola



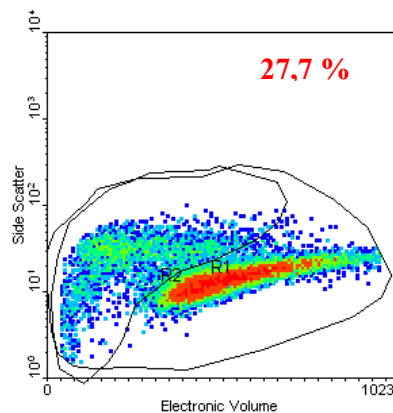
b) U0126



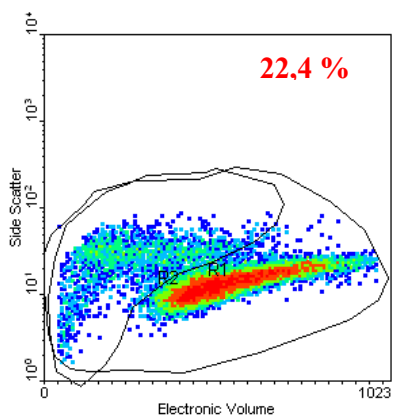
c) 0,1 nmol/l mtx



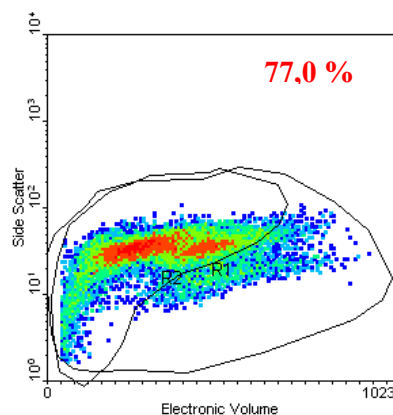
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



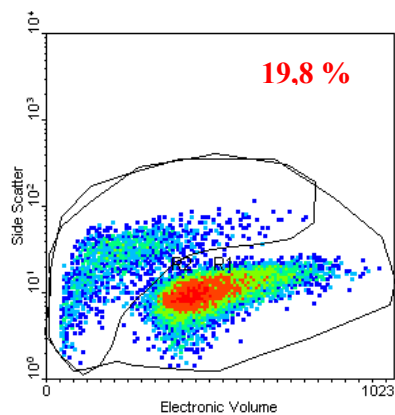
f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



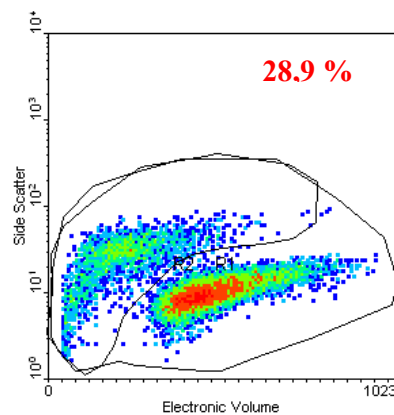
Obr. 17 a-f Detekce apoptózy u buněk MOLT-4 pomocí dvouparametrické analýzy Side-scatter/objem po 24 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

4.3.3.2 Dvouparametrická analýza Side-scatter/objem za 72 hodin

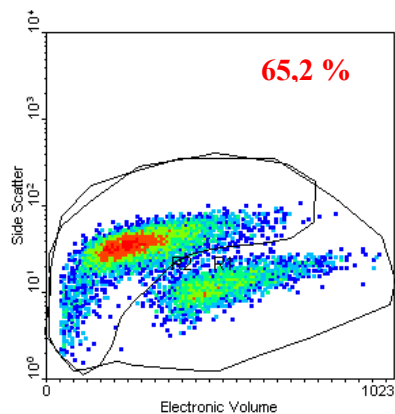
a) kontrola



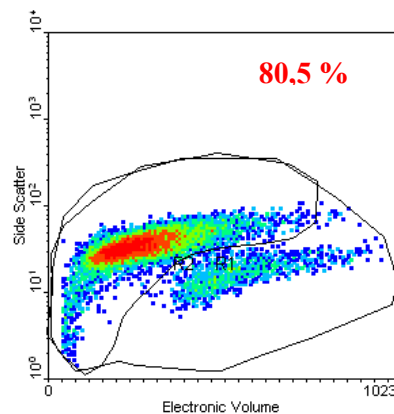
b) U0126



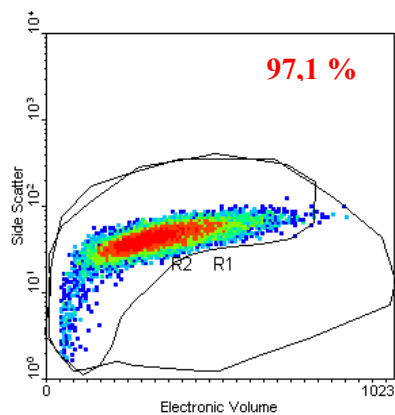
c) 0,1 nmol/l mtx



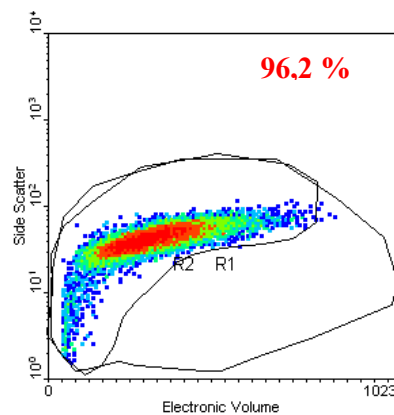
d) 0,1 nmol/l mtx + U0126



e) 0,5 nmol/l mtx



f) 0,5 nmol/l mtx + U0126



Obr. 18 a-f Detekce apoptózy u buněk MOLT-4 pomocí dvouparametrické analýzy Side-scatter/objem po 72 hodinovém působení U0126, 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu a jejich kombinací

Při této analýze sledujeme dva optické parametry: boční rozptyl paprsku (side scatter), jenž určuje strukturu membránového povrchu a cytoplazmy, a dopředný rozptyl paprsku (forward scatter), který určuje velikost buněk. U průtokového cytometru Cell Lab Quanta odpovídá hodnota dopředného rozptylu elektronickému objemu (EV). U apoptotických buněk dochází typicky ke snížení objemu a ke zvýšení granularity, což je na grafech patrné jako snížení EV a zvýšení bočního rozptylu.

Pomocí této metody jsme také detekovali množství apoptotických buněk. Po 24 hodinovém působení 0,1 nmol/l mitoxantronu je v apoptóze 15,7 % buněk, zatímco v kombinaci s inhibitorem se jejich počet zvyšuje na 27,7 % (obr. 17 c, d). U 0,5 nmol/l mitoxantronu je tendence stejná, v apoptóze se nachází 22,4 % buněk a v kombinaci s inhibitorem U0126 je to již 77 % (obr. 17 e, f). Stejný trend je patrný i po 72 hodinovém působení 0,1 nmol/l mitoxantronu, kdy je apoptotických buněk 65,2 % a v kombinaci s inhibitorem U0126 činí apoptotické buňky 80,5 % (obr. 18 c, d). Po 72 hodinovém působení samotného 0,5 nmol/l mitoxantronu a jeho kombinaci s U0126 už nelze hodnotit rozdíly, všechny buňky jsou již mrtvé (obr. 18 e, f). Opět je tedy patrné, že inhibice MEK1/2-ERK1/2 kaskády zvyšuje citlivost buněk MOLT-4 k indukci apoptózy mitoxantronem.

Srovnáme-li působení samotného inhibitoru U0126 na buňky MOLT-4 s kontrolou, je patrné, že po 24 i 72 hodinovém působení inhibitoru umírá apoptózou o něco více buněk (obr. 17 b, 18 b). Můžeme konstatovat, že U0126 inhibicí MEK1/2 má jistý vliv na proliferaci buněk MOLT-4, a to v proapoptotickém smyslu.

4.4 DNA analýza

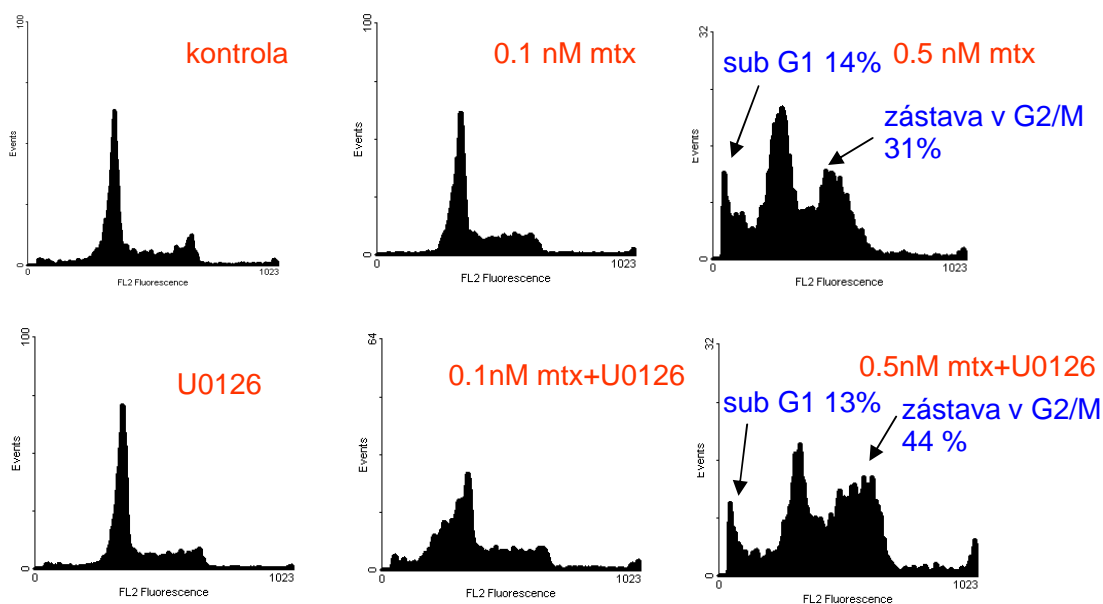
Obsah DNA v buňce se v jednotlivých fázích buněčného cyklu mění. Buňky v G1 fázi mají jednu sadu chromosomů, v S fázi dochází k replikaci jaderné DNA a na konci této fáze jádro obsahuje dvojnásobné množství DNA. V G2/M fázi tedy jádro obsahuje diploidní počet chromosomů. Působí-li na buňky proapoptotické agens, dochází k fragmentaci DNA, k narušení cytoplazmatické membrány, a tak k úniku DNA z buňky. Snížené množství DNA detekujeme v tzv. sub G1 vrcholu, který představuje apoptotické buňky.

Na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC jsme analyzovali obsah DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Obsah DNA jsme detekovali pomocí

fluorescenčního barviva propidium jodidu, které se specificky a stechiometricky váže na jadernou DNA. Intenzita fluorescence tak odpovídá množství DNA v buňce. Stanovili jsme změny buněčného cyklu v reakci na 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantron, na inhibitor U0126 a jejich kombinace po 24 a 72 hodinovém působení.

Výsledné grafy byly zpracovány v programu WinMDI2.8 a znázorňují závislost množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu na obsahu jaderné DNA.

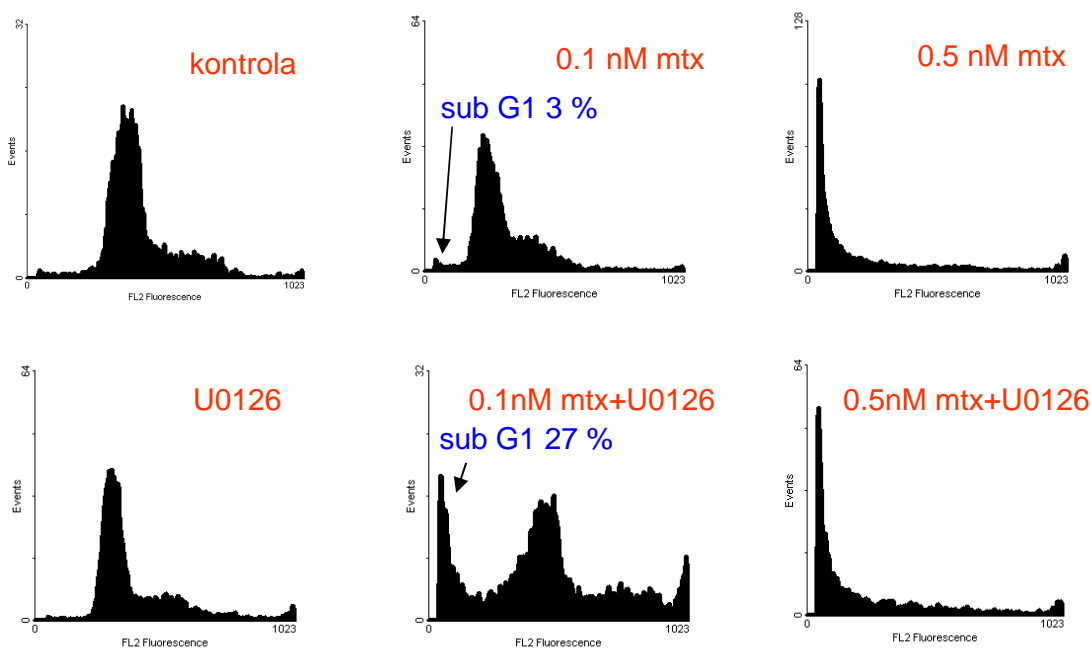
4.4.1 DNA analýza 24 hodin



Obr. 19 DNA analýza buněk MOLT-4 po 24 hodinovém působení 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu, U0126 a jejich kombinací

DNA analýza za 24 hodin ukázala podstatnější změny v buněčném cyklu po působení 0,5 nmol/l mitoxantronu, kdy dochází k nárůstu apoptotických buněk na 14 % a k akumulaci 31 % ovlivněných buněk v G2/M fázi. K podobným změnám dochází po působení 0,5 nmol/l mitoxantronu v kombinaci s inhibitorem U0126. V sub G1 vrcholu se nachází okolo 13 % apoptotických buněk a v G2/M fázi je zastaveno 44 % buněk. U kontrolní skupiny je v G2/M fázi 11 % buněk (obr. 19).

4.4.2 DNA analýza 72 hodin



Obr. 20 DNA analýza buněk MOLT-4 po 72 hodinovém působení 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu, U0126 a jejich kombinací

Po 72 hodinách působení 0,5 nmol/l mitoxantronu jsou již všechny buňky usmrceny, po působení 0,1 nmol/l mitoxantronu je znatelný mírný nárůst apoptotických buněk, v sub G1 fázi se nachází 3 % buněk. V kombinaci 0,1 nmol/l mitoxantronu s inhibitorem U0126 se počet apoptotických buněk zvyšuje, v sub G1 fázi se jich vyskytuje 27 % (obr. 20).

Závěrem lze konstatovat, že mitoxantron způsobuje u buněk MOLT-4 zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi následovanou rozvojem apoptózy, což je v souladu s mechanismem jeho působení (indukce DSB inhibicí topoisomerázy II). Inhibice MEK1/2 kinázy pomocí U0126 tuto zástavu buněčného cyklu nenarušuje. Zároveň je patrná zvýšená citlivost buněk MOLT-4 s inhibovanou MEK1/2 k apoptóze vyvolané mitoxantronem.

4.5 Elektroforéza a Western blotting

Pomocí těchto metod jsme stanovili expresi a posttranslační modifikace proteinu p53 a dalších proteinů. Celkem jsme si připravili 4 skupiny vzorků. První skupinu sledovaných buněk tvořila kontrola, ve druhé skupině jsme buňky vystavovali působení 0,5 nmol/l mitoxantronu, v další samotnému inhibitoru U0126 a na poslední skupinu jsme působili 0,5 nmol/l mitoxantronem v kombinaci s inhibitorom U0126. Tyto 4 vzorky jsme zlyzovali po 4 a 24 hodinách po aplikaci uvedených látek.

Po elektroforetickém rozdělení jsme proteiny přeblotovali na polyvinylidifluoridovou membránu a detekovali pomocí příslušných chemiluminiscenčně značených protilátek. Výsledný signál určující množství proteinů v buňce jsme zachytili na modrocitlivé filmy.

Ke kvantifikaci množství proteinů jsme použili počítačové měření integrované optické denzity. Fotografické snímky jednotlivých skupin proteinů jsme analyzovali pomocí programu Bio-Rad Laboratories Quantity One 1-D Analysis Software. Výsledky integrované optické denzity jsme graficky zpracovali do sloupcových grafů, které ukazují kvantitativní zastoupení proteinů v jednotlivých testovaných skupinách buněk.

Zaměřili jsme se na expresi proteinů podílejících se na zástavě buněčného cyklu, reparaci poškození DNA a na procesu apoptózy. Sledovali jsme protein p53, který spouští v závislosti na míře poškození DNA buď mechanismy vedoucí k programované smrti buňky nebo indukuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, dále jeho posttranslační modifikace, fosforylaci p53 na serinu 15 a fosforylaci p53 na serinu 392. Dále jsme detekovali p21, protein inhibující cyklin dependetní kinázy a hrající tak důležitou úlohu při kontrole buněčné proliferace. V jednotlivých skupinách jsme dále stanovili kinázu ERK1/2, fragmentaci proteinu jaderné membrány laminu B a na závěr jsme detekci aktinu zkontrolovali nanášku proteinů.

4.5.1 Expese proteinů

Dle předpokladu je expese proteinu p53 v kontrolní skupině velmi malá. V odpovědi na mitoxantronem vyvolané poškození DNA došlo k výraznému zvýšení množství p53, a to po 4 i 24 hodinách působení tohoto cytostatika (obr. 21 - 2, 6 a). Po ovlivnění buněk mitoxantronem v kombinaci s inhibitorom U0126 (obr. 21 - 4, 8 a)

došlo ke srovnatelné akumulaci tohoto proteinu v buňce jako po ovlivnění samotným mitoxantronem (obr. 21 – 2, 6 a). Můžeme předpokládat, že inhibice MEK1/2 pomocí U0126 u mitoxantronem ovlivněných buněk MOLT-4 nemá vliv na expresi proteinu p53. Po působení samotného inhibitoru U0126 avšak pozorujeme mírný nárůst množství p53. Zdá se, že námi inhibovaná cesta MEK1/2-ERK1/2 je u leukemických buněk MOLT-4 nějakým způsobem zapojena do kaskád regulujících hladinu proteinu p53. Bylo prokázáno, že u některých buněčných typů se kinázy MEK1/2-ERK1/2 podílí na aktivaci negativního regulátoru p53 proteinu Mdm-2 jeho fosforylací na serinu 166 (Malmlof et al., 2007) a zvýšením jeho syntézy (Phelps et al., 2005), což by vysvětlovalo námi pozorovanou mírnou akumulaci p53 po působení samotného U0126.

Dále jsme hodnotili posttranslační modifikace p53, konkrétně fosforylací na serinu 15 a na serinu 392, které jsou nutné pro jeho správnou funkci (obr. 21 b, c, 22). Obě tyto modifikace stabilizují protein p53. Fosforylace na serinu 15 vede k inhibici interakce s Mdm2, což vede k prodloužení životnosti p53 (Tichý, 2008). Nejvyšší fosforylace p53 na Ser_15 je patrná po působení mitoxantronu samotného a v jeho kombinaci s U0126 24 hodin po expozici. Míra fosforylace u obou skupin se zdá být totožná (obr. 21 - 6, 8 b), inhibice MEK1/2 v buňkách MOLT-4 pravděpodobně nijak neovlivňuje fosforylací p53 vyvolanou mitoxantronem. V menší míře dochází k fosforylací p53 na Ser_15 i po 4 hodinách působení mitoxantronu samotného i v jeho kombinaci s U0126 (obr. 21 - 2, 4 b).

Fosforylace na serinu 392 zprostředkovává stabilizaci proteinu p53 tím, zvyšuje jeho schopnost vázat se na specifické sekvence DNA (Thompson et al., 2004). Fosforylace p53 na Ser_392 koreluje v našich výsledcích s výše popsanou fosforylací na Ser_15. Nejvyšší fosforylace na Ser_392 je viditelná po 24 hodinovém působení samotného mitoxantronu a v jeho kombinaci s U0126. Množství fosforylovaného p53 na Ser_392 u obou skupin se opět rámcově shodují (obr. 21 - 6, 8 c). Stejně jako u fosforylace p53 na Ser_15, i zde není zde patrný vliv U0126 na fosforylací p53. Dle předpokladu se u kontrolních skupin nevyskytuje žádná ze sledovaných fosforylovaných forem p53. Toto zjištění rovněž podporuje naši hypotézu, že akumulace p53 v buňkách MOLT-4 po působení samotného U0126 nesouvisí s modifikacemi p53, ale s regulací aktivity Mdm-2.

Současné znalosti charakterizující vzájemné ovlivnění signálních drah MEK1/2-ERK1/2 a ATM-p53 v reakci na poškození DNA jsou nedostatečné. Golding et al. (2007) prokazují u buněk maligního gliomu, že inhibice MEK1/2-ERK1/2 snižuje

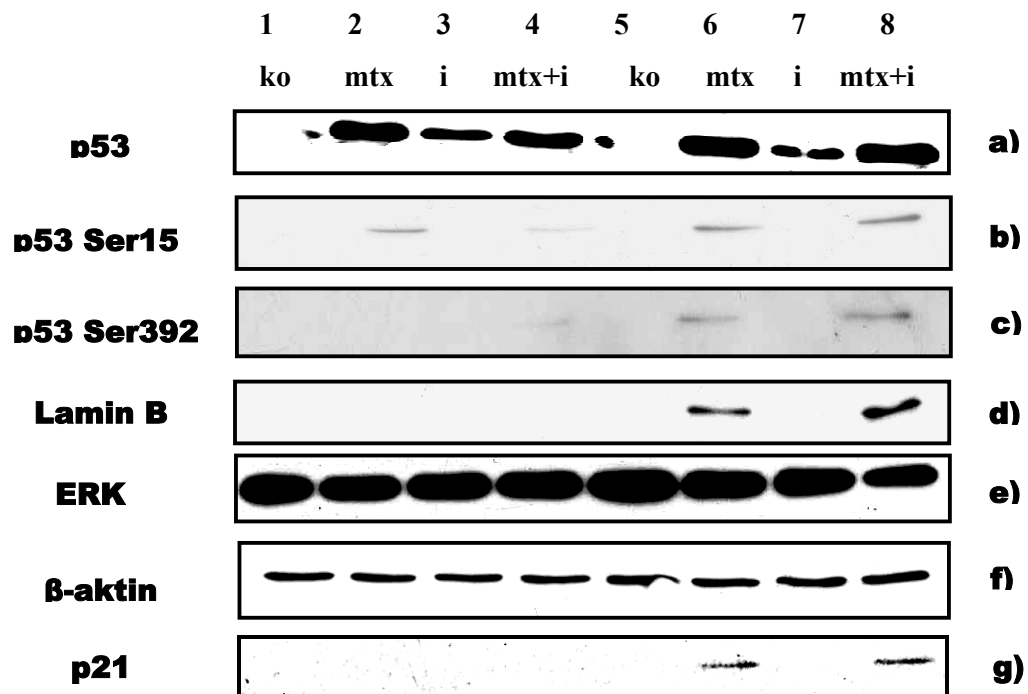
významně aktivaci ATM kinázy v odpovědi na DSB a zároveň že inhibice ATM snižuje zářením indukovanou aktivaci ERK1/2. Yan et al. (2007) při inhibici MEK1/2-ERK1/2 u buněk karcinomu prsu MCF-7 po ozáření nepozorovali snížení aktivace ATM, avšak prokazují snížení aktivace ATR, a zároveň při inhibici ATM a ATR nepozorovali pokles zářením vyvolané aktivace ERK1/2. Naše zjištění u leukemické linie MOLT-4 vedou k závěru, že u tohoto buněčného typu inhibice signální kaskády MEK1/2-ERK1/2 zvyšuje citlivost buněk k mitoxantronem indukované apoptóze, avšak neovlivňuje významně aktivaci a akumulaci p53.

Po poškození DNA vyvolá protein p53 transkripci genu pro protein p21, který inhibuje cyklin dependentní kinázy. V důsledku této inhibice pak dochází k pozastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Agarwal et al., 1998). Po 4 hodinách působení mitoxantronu, ani v jeho kombinaci s U0126, ještě nedochází k expresi proteinu p21, exprese tohoto proteinu je patrná po 24 hodinovém působení samotného mitoxantronu a v jeho kombinaci s U0126 (obr. 21 – 6, 8 g, 23). Výsledek logicky koreluje s výsledky p53 a jeho fosforylovaných forem po 24 hodinách, můžeme předpokládat návaznost dějů, kdy po 24 hodinách aktivovaný p53 vyvolává u buněk MOLT-4 transkripci genu pro protein p21. V kontrolní skupině není protein p21 exprimován, stejně tak je tomu i u buněk vystavených působení inhibitoru U0126.

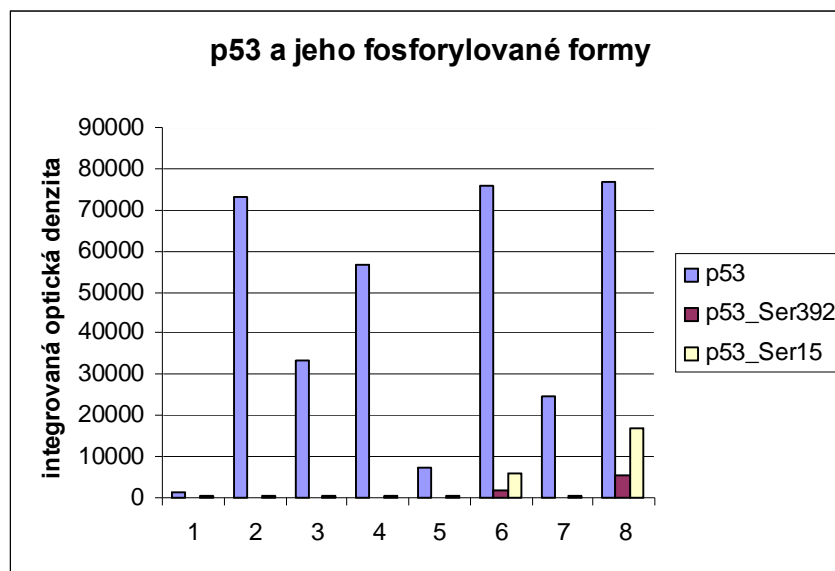
Lamin B je strukturní protein jaderné membrány o velikosti 68 kDa. Při aktivaci apoptotických drah dochází k jeho štěpení kaspázami na fragment o velikosti 28 kDa. Po 4 hodinovém působení mitoxantronu ještě není patrné štěpení tohoto proteinu, avšak po 24 hodinovém působení jsou již kaspázy plně aktivovány a apoptotický proces je spuštěn. Na obr. č. 21 - 6 d jsou zachyceny fragmenty laminu B. Větší množství fragmentů jsme detekovali po působení mitoxantronu v kombinaci s U0126 (obr. 24), což koreluje se zvýšením apoptózy detekovaným pomocí průtokové cytometrie.

ERK kinázy patří do rodiny mitogeny aktivovaných protein kináz (MAPK). Vyskytují se v každé buňce, kde slouží jako významní regulátoři buněčné proliferace (Qi a Elion, 2005). Exprese ERK1/2 je u všech sledovaných skupin totožná, tyto kinázy jsou exprimovány nezávisle na působení námi sledovaných látek (obr. 21 e).

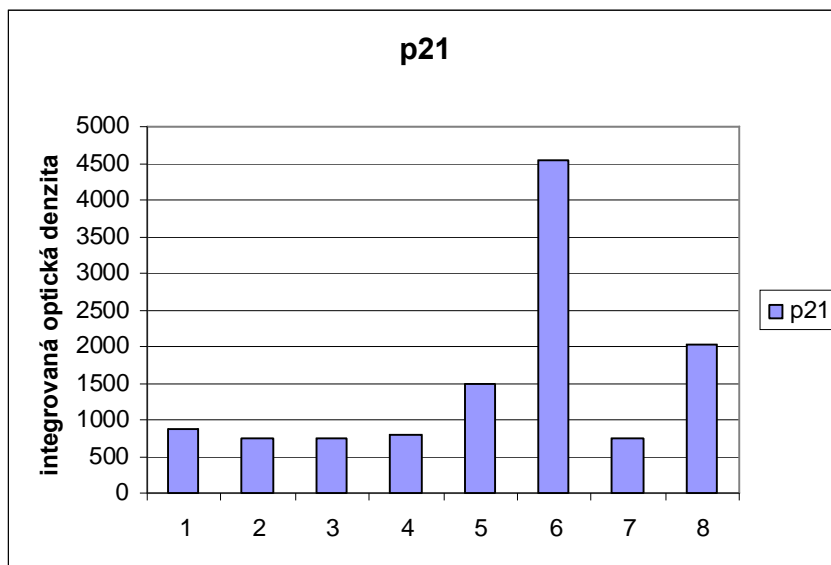
Pro kontrolu správné nanášky jsme stanovili β -aktin. Jedná se o cytoskeletární protein vyskytující se v každé buňce. Všechny námi sledované skupiny obsahují stejné množství tohoto proteinu (obr. 21 f).



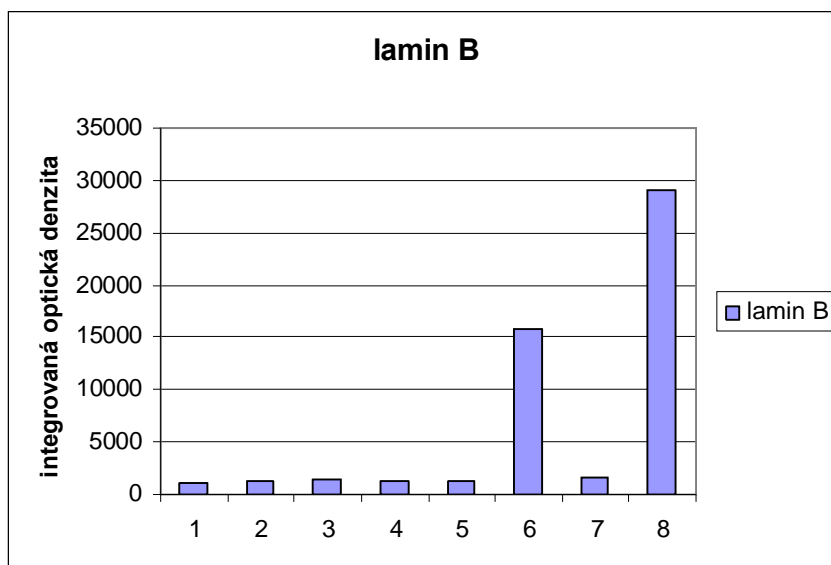
Obr. 21 a-g Fotografické snímky z Western blottingu, vzorky : 1, 5 – kontrola, 2, 6 – mitoxantron, 3, 7 – inhibitor U0126, 4, 8 – mitoxantron v kombinaci s U0126 po 4 (vz. č. 1, 2, 3, 4) a 24 (vz. č. 5, 6, 7, 8) hodinovém působení



Obr. 22 Expres proteinů p53, p53_Ser15, p53_Ser392 u buněk MOLT-4 vyjádřena pomocí integrované optické denzity : 1, 5 – kontrola, 2, 6 – mitoxantron, 3, 7 – inhibitor U0126, 4, 8 – mitoxantron v kombinaci s U0126 po 4 (vz. č. 1, 2, 3, 4) a 24 (vz. č. 5, 6, 7, 8) hodinovém působení



Obr. 23 Expresse proteinu p21 u buněk MOLT-4 vyjádřená pomocí integrované optické denzity : 1, 5 – kontrola, 2, 6 – mitoxantron, 3, 7 – inhibitor U0126, 4, 8 – mitoxantron v kombinaci s U0126 po 4 (vz. č. 1, 2, 3, 4) a 24 (vz. č. 5, 6, 7, 8) hodinovém působení



Obr. 24 Expresse laminu B u buněk MOLT-4 vyjádřená pomocí integrované optické denzity : 1, 5 – kontrola, 2, 6 – mitoxantron, 3, 7 – inhibitor U0126, 4, 8 – mitoxantron v kombinaci s U0126 po 4 (vz. č. 1, 2, 3, 4) a 24 (vz. č. 5, 6, 7, 8) hodinovém působení

5 Závěr

V naší práci jsme na modelové buněčné linii MOLT-4 odvozené od lidské T-lymfocytární leukémie studovali, jakým způsobem ovlivňuje biochemické cesty inhibice MEK1/2 kinázy po mitoxantronem vyvolaném poškození DNA. Ke studiu této problematiky jsme použili flow-cytometrické metody, elektroforézu a Western blotting s následnou imunodetekcí.

Na počátku naší práce jsme hodnotili vliv různých dávek mitoxantronu na proliferační aktivitu buněk MOLT-4 s cílem vybrat vhodné dávkové schéma pro další studii. Buňky jsme vystavovali působení mitoxantronu v rozmezí koncentrací 0,1 - 10 nmol/l a sledovali jejich proliferační aktivitu v čase. Pro další studie jsme podle výsledných závislostí vybrali koncentrace 0,1 a 0,5 nmol/l.

Dále jsme pomocí sledování proliferační aktivity, stanovení apoptózy a analýzy buněčného cyklu hodnotili vliv inhibitoru U0126 na působení mitoxantronu. Nejprve jsme stanovili počet a viabilitu buněk MOLT-4 v reakci na 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantron, na inhibitor U0126 a jejich kombinace. Zjistili jsme, že po působení mitoxantronu v kombinaci s U0126 je počet živých buněk nižší než po působení samotného mitoxantronu a zároveň stoupá procento buněk mrtvých. Z experimentu je patrné, že inhibice MEK1/2 kinázy pomocí U0126 vede po mitoxantronem vyvolaném poškození DNA ke zvýšenému odumírání buněk. Po působení samotného U0126 dochází oproti kontrole k mírně snížené proliferaci a ke snížení viability. Inhibujeme-li kinázu MEK1/2, nedochází k aktivaci ERK1/2 a vlivem blokace této cesty pro přežití umírá více buněk. Následně jsme průtokovou cytometrií sledovali indukci apoptózy pomocí duálního značení Annexinem V a propidium jodidem a analýzy optických parametrů rozptylu světla. Indukci apoptózy u buněk MOLT-4 jsme stanovili v reakci na 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantron, na inhibitor U0126 a jejich kombinace po 24 a 72 hodinách působení. Prokázali jsme, že u buněk MOLT-4 vede působení 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu v kombinaci s inhibitorem U0126 ke zvýšené apoptóze než při působení samotného 0,1 a 0,5 nmol/l mitoxantronu. Je opět patrné, že inhibicí MEK1/2 dochází vlivem působení mitoxantronu ke zvýšené apoptóze než bez inhibice této kinázy. Můžeme konstatovat, že inhibice MEK1/2-ERK1/2 kaskády zvyšuje citlivost buněk MOLT-4 k indukci apoptózy vyvolané mitoxantronem. Pro lepší přehled o průběhu buněčného cyklu jsme u jednotlivých skupin zanalyzovali obsah DNA v buňce za 24 a 72 hodin po ovlivnění. DNA analýza za 24 hodin ukázala podstatnější změny

v buněčném cyklu po působení 0,5 nmol/l mitoxantronu, kdy dochází k nárůstu apoptotických buněk na 14 % a k akumulaci 31 % ovlivněných buněk v G2/M fázi. K podobným změnám dochází po působení 0,5 nmol/l mitoxantronu v kombinaci s inhibítorem U0126. Lze říci, že mitoxantron u buněk MOLT-4 způsobuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi následovanou rozvojem apoptózy, což je v souladu s mechanismem jeho působení. Inhibice MEK1/2 kinázy pomocí U0126 tuto zástavu buněčného cyklu nenarušuje.

V další části práce jsme studovali změny v expresi proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a rozvoji apoptózy po vystavení buněk MOLT-4 0,5 nmol/l mitoxantronu, inhibítoru U0126 a jejich kombinaci. Sledovali jsme zejména protein p53 a jeho posttranslační modifikace, fosforylaci p53 na serinu 15 a fosforylaci p53 na serinu 392, dále protein p21, kinázu ERK1/2 a lamin B. Expresi proteinů jsme detekovali pomocí elektroforézy a Western blottingu s následnou imunodetekcí. Zjistili jsme, že po ovlivnění buněk mitoxantronem v kombinaci s inhibítorem U0126 dochází ke srovnatelné akumulaci tohoto proteinu v buňce jako po ovlivnění samotným mitoxantronem. Předpokládáme tak, že inhibice MEK1/2 pomocí U0126 u buněk MOLT-4 ovlivněných mitoxantronem nemá vliv na expresi proteinu p53. Po působení samotného inhibítoru U0126 jsme ovšem pozorovali mírný nárůst množství p53, a tak se zdá, že námi inhibovaná cesta MEK1/2-ERK1/2 je u leukemických buněk MOLT-4 nějakým způsobem zapojena do kaskád regulujících hladinu proteinu p53. Je známo, že interakce mezi transkripčním faktorem p53 a jeho negativním regulátorem Mdm2 je klíčovým bodem v mnoha signálních cestách, které regulují buněčnou proliferaci a přežívání. Ukázalo se, že nejen protein p53 může regulovat hladinu Mdm2. U některých buněčných typů také kaskáda MEK1/2-ERK1/2 může nezávisle na p53 regulovat expresi Mdm2. Oba tyto proteiny jsou navzájem v autoregulatorní vazbě, což by vysvětlovalo námi pozorovanou mírnou akumulaci p53 po působení samotného U0126. Dále jsme zjistili, že inhibice MEK1/2 u buněk MOLT-4 pravděpodobně nijak neovlivňuje fosforylaci p53 vyvolanou mitoxantronem. K nejvyšší fosforylaci p53 na serinu 15 došlo za 24 hodin po expozici mitoxantronu a mitoxantronu v kombinaci s U0126. Množství fosforylovaného p53 na serinu 15 se u obou skupin rámcově shodují. Stejný trend je patrný i u fosforylace p53 na serinu 392, i zde není patrný vliv U0126 na tuto fosforylaci. Toto zjištění rovněž podporuje naši hypotézu, že akumulace p53 v buňkách MOLT-4 po působení samotného U0126 nesouvisí s modifikacemi p53, ale s regulací aktivity Mdm-2. Dále jsme po 24 hodinách působení mitoxantronu a

mitoxantronu s U0126 prokázali expresi proteinu p21. Výsledek koreluje s výsledky p53 a jeho fosforylovaných forem po 24 hodinách, můžeme předpokládat návaznost dějů, kdy po 24 hodinách aktivovaný p53 vyvolává u buněk MOLT-4 transkripci genu pro protein p21. Dále jsme jako signál apoptotického procesu zachytili fragmenty proteinu laminu B po 24 hodinovém působení mitoxantronu, i v jeho kombinaci s U0126. Větší množství fragmentů jsme detekovali po působení mitoxantronu v kombinaci s U0126, což koreluje se zvýšením apoptózy detekovaným pomocí průtokové cytometrie.

Souhrnně můžeme říci, že u leukemické linie MOLT-4 inhibice signální kaskády MEK1/2-ERK1/2 zvyšuje citlivost buněk k mitoxatronem indukované apoptóze, avšak neovlivňuje významně aktivaci a akumulaci p53. Jakým způsobem je cesta MEK1/2-ERK1/2 zapojena do signálních drah p53 není doposud známo a současné znalosti charakterizující vzájemné ovlivnění těchto signálních drah v reakci na poškození DNA jsou nedostatečné. Přesné zapojení jednotlivých částí MEK1/2-ERK1/2 kaskády a jejich propojení s ostatními cestami regulujícími odpověď na DNA poškození, jeho reparaci, zástavu buněčného cyklu a indukci apoptózy zůstává předmětem intenzivního výzkumu.

6 Seznam zkratek

ATM – ataxie telangiectasie-mutovaná kináza

ATP – adenosin trifosfát

DISC – smrt indukující signální komplex

DMSO – dimethyl sulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DR – death receptor

DSB – dvojitý zlom DNA

EGF – epidermální růstový faktor

EV – elektronický objem

FITC – fluorescein isothiokyanát

FSC – dopředný rozptyl světla

GDP – guanosin difosfát

GTP – guanosin trifosfát

HR – homologní rekombinace

I - inhibitor

IMDM – Iskova modifikace Dulbeccova média

MTX – mitoxantron

NHEJ – nehomologní spojování konců

NK – natural killer

PI – propidium jodid

Rb – retinoblastoma protein

SDS – dodecyl sulfát sodný

SSC – boční rozptyl světla

TEMED – tetramethylethylen diamin

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

7 Seznam literatury

Abraham RT: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes and development* **2001**;15:2177-2191.

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR: The p53 network. *J Biol Chem* **1998**;273:1-4.

Alarcon-Vargas D, Ronai Z: p53-mdm2 - the affair that never ends. *Carcinogenesis* **2002**;23:541-547.

Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damaged activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **2003**; 421:486-488.

Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J: Spatial organization genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biology* **2006**; 173:195-206.

Burgermeister E, Seger R: PPARgamma and MEK Interactions in Cancer. *PPAR Research*, Volume 2008, **2008**; Article ID:309469.

Buschmann T, Adler V, Matusevich E, Fuchs SY, Ronai Z: p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* **2000**;60:896-900.

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **1998**;281(5383):1677-9.

Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol.today* **1993**;14:126-130.

Cushing P, MEK Inhibition as a Novel Drug Target in BRAF Mutant Cancer [online]. c2005. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.dartmouth.edu/~brenner/gene144-06/cushing.html>>.

Česká onkologická společnost [online]. c2004. Dostupné na World Wide Web: <http://www.linkos.cz/vzdelavani/1_00/03.php>.

Demedts et al., *Respiratory Research* [online]. c2006. Dostupné na World Wide Web: <<http://respiratory-research.com/content/7/1/53/figure/F2>>.

Dent P, Jarvis WD, Birrer MJ, Fisher PB, Schmidt-Ullrich RK, Grant S: The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo-sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. *Leukemia*. **1998**;12(12):1843-50.

Dent P, Yacoub A, Fischer PB, Hagan MP, Grant S: MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* **2003**;22(37):5885-96.

- Dent P, Reardon DB, Park JS, Bowers G, Logsdon C, Valerie K, Schmidt-Ullrich R: Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell*. **1999**;10(8):2493-506.
- Dulic V, Kaufman WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*. **1994**;76(6):1013-23.
- Ehrmann J: Význam exprese genů regulujících buněčný cyklus apoptózu u astroglálních nádorů. Lékařská fakulta Palackého Univerzity, Olomouc **2001**;7-8.
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J: The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **2001**;410(6830):842-7.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. **1998**;273(29):18623-32.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC and Williams GT: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* **1996**;236:1-26.
- Harris CC: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **1996**;17:1187-1198.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW: DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **2000**;287:1824-1827.
- Chen X, Ko LJ, Javaraman L, Prives C: p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*. **1996**;10(19):2438-51.
- Inder K, Harding A, Plowman SJ, Philips MR, Parton RG, Hancock JF: Activation of the MAPK module from different spatial locations generates distinct system outputs. *Mol Biol Cell*. **2008**;19(11):4776-84.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**;26:239-257.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD: ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ*. **2001**;8(11):1052-65.
- Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM and Hajimohamadreza I: The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* **1999**;20:35-42.

- Klener P: Protinádorová chemoterapie. Galén **1996**;334-335.
- Ko JL, Prives C: p53: Puzzle and paradigm. Genes Dev **1996**;10:1054-1072.
- Kokontis JM, Wagner AJ, O'Leary M, Liao S, Hay N: A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. Oncogene **2001**;20(6):659-68.
- Kotala V, Uldrijan S, Nenutil R, Vojtěšek B: Protein p53 a protinádorová terapie, Klinická onkologie **2002**;15:98-100.
- Krajská centra primární péče: Nejznámější signální dráhy [online]. c2005. Dostupné na World Wide Web: <https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1469.html>.
- Krejsek J, Kopecký O: Klinická imunologie. Nukleus, Hradec Králové **2004**;73-84.
- Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev. **2001**;81(2):807-69.
- Kyriakis JM: Thinking outsider the box about Ras. J Biol Chem. **2008**; Epub ahead of print.
- Li W, Chong H, Guan KL: Function of the Rho Family GTPases in Ras-stimulated Raf Activation. J. Biol. Chem. **2001**; 276:34728-34737.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell **1996**;86:147-157.
- Lowe SW, Ruley HE: Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. Genes Dev. **1993**;7(4):535-45.
- Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, Sehested M, Lukas J, Bartek J: DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. Cancer res. **2001**;61(13):4990-3.
- Ma Y, Lu H, Schwarz K, Lieber MR: Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. Cell Cycle **2005**;4(9):1193-200.
- Michael D, Oren M: The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Semin Cancer Biol. **2003**;13(1):49-58.
- Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreeff M: Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. J Clin Invest. **2001**;108(6):851-9.
- Nakano H, Shinohara K: Correlation between unirradiated cell TP53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 cells. Radiat Res. **1999**;151(6):686-93.

Newton R, Cambridge L, Hart LA, Stevens DA, Lindsay MA, Barnes PJ: The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1beta-dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes. *Br J Pharmacol.* **2000**;130(6):1353-61.

Nigg EA: Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **1995**;17(6):471-80.

Park JS, Carter S, Reardon DB, Schmidt-Ullrich R, Dent P, Fisher PB: Roles for basal and stimulated p21(Cip-1/WAF1/MDA6) expression and mitogen-activated protein kinase signaling in radiation-induced cell cycle checkpoint control in carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* **1999**;10(12):4231-46.

Pirollo KF, Hao Z, Rait A, Ho CW, Chang EH: Evidence supporting a signal transduction pathway leading to the radiation-resistant phenotype in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**;230(1):196-201.

Platanias LC: Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **2003**;101(12):4667-4679.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **1997**;389(6648):300-5.

Qi M, Elion EA: MAP kinase pathways. *J.Cell Sci* **2005**;118:3569-3572.

Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG Jr, Adams PD: Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**;91(23):10918-22.

Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E: The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**;89(16):7742-6.

Reis S, Beiderer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki R, McMahon M, Oren M, McCormick F: Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* **2000**;103:321-330.

Roux PP, Blenis J: ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2004**;68(2):320-344.

Řezáčová M: Regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy u nádorových buněk. *Ústav lékařské biochemie Hradec Králové* **2004**;13-14.

Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **1999**;13(12):1501-12.

Song Z and Steller H: Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol* **1999**;9:49-52.

Sridhar SS, Hedley D, Siu LL: Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* **2005**;4(4):677-685.

The TP53 Web Site [online]. c1994, [cit. 30.10.2008]. Dostupné na World Wide Web: <http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html>.

Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbrosk DC, Vassilev LT: Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem*. **2004**;279(51):53015-22.

Thornberry NA and Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* **1998**;281:1312-1316.

Tichý A, Zászkodová D, Rezacová M, Vávrová J, Vokurková D, Pejchal J, Vilasová Z, Cerman J, Osterreicher J: Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochim Pol*. **2007**;54(2):281-7.

Tichý A: Apoptóza a proliferace v nádorových buněčných liniích: Radiační a medikamentózní ovlivnění. Ústav lékařské biochemie, Hradec Králové **2008**;8-12.

Tomšík P: Inhibice biosyntézy nukleových kyselin a bílkovin v nádorech. Ústav lékařské biochemie, Hradec Králové **2008**;19-21.

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

Ullrich SJ, Sakaguchi K, Lees-Miller SP, Fiscella M, Mercer WE, Anderson CW, Appella E: Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**;90:5954-5958.

Vávrová J, Stulík J, Mareková M, Vokurková D: Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. Učební texty Vojenské lékařské akademie Jana Evangelisty Turkyň v Hradci Králové **2002**; svazek 333; vydání 1.:44.

Warenius HM, Jones MD, Thompson CC: Exit from G2 phase after 2 Gy gamma irradiation is faster in radiosensitive human cells with high expression of the RAF1 proto-oncogene. *Radiat Res*. **1996**;146(5):485-93.

Wilkinson MG, Miller JBA: Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The FASEB Journal*. **2000**;14:2147-2157.

Zima T, Štern P: Signální transdukce (část II). *Labor Aktuell* **2002**;(1):14 – 17.