

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**APOPTÓZA A PROLIFERACE  
V NÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH:**

**Radiační a medikamentózní ovlivnění**

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská chemie a biochemie

Mgr. Aleš Tichý

Ústav lékařské biochemie

Hradec Králové 2008

Disertační práce byla vypracována na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a Katedře radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany Brno.

Uchazeč: Mgr. Aleš Tichý

Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Cerman, CSc.

Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: Doc. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.

Oddělení cytokinetyky, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno

Doc. Dr.rer.nat. Friedo Zoelzer, PhD.

Katedra radiologie a toxikologie, Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice

Stanovisko k disertační práci bylo vypracováno na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Obhajoba disertační práce se koná ..... v ..... hodin před Komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie v budově teoretických ústavů na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové I.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze,

Doc. RNDr. MUDr. Milan Měška  
Předseda Komise pro obhajobu  
disertačních prací ve doktorském  
studijním programu Lékařská  
chemie a biochemie

## OBSAH

<i>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</i> .....	4
1. <i>ÚVOD</i> .....	5
2. <i>SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY</i> .....	6
2.1 Ionizující záření a biodozimetrie.....	6
2.2 Reparace DNA a ATM kinasa.....	6
2.3 Apoptóza .....	9
3. <i>CÍLE PRÁCE</i> .....	11
4. <i>MATERIÁL A METODY</i> .....	11
5. <i>SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ</i> .....	13
6. <i>ZÁVĚR</i> .....	20
7. <i>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI</i> .....	22
7.1 Původní články .....	22
7.2 Přehledové články .....	23
7.3 Abstrakta.....	23
7.4 Přednášky.....	23
7.5 Plakátová sdělení.....	24
8. <i>SOUHRN</i> .....	25
9. <i>SUMMARY</i> .....	26
10. <i>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</i> .....	27

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATM	ataxie telangiektasie-mutovaná kinasa
CLL	chronická lymfocytární leukemie
cyt-c	cytochrom c
DSB	dvojité zlom DNA
FITC	fluorescein isothiokyanát
Gy	Gray
$\gamma$ H2A.X	histon H2A.X fosforylovaný na Ser <sup>139</sup>
IRIF	ionizujícím zářením indukovaná ložiska
IZ	ionizující záření
Mcl-1	protein myeloidní buněčné line-1
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 komplex
PBS	fosfátový pufr v médiu fyziologického roztoku (pH 7,4)
p53	protein kódovaný tumor-supresorovým genem TP53
t-Bid	štěpený protein Bid
wt	wild type

# 1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí nejen v ČR ale i ve světě, proto se význam studií zaměřených na objasnění molekulárních mechanismů v nádorových buňkách neustále zvyšuje. Podle American Cancer Society je chronická lymfocytární leukemie (CLL) nejběžnější formou leukemie západního světa, čítající jenom v USA zhruba 12 000 nových případů a prevalenci 50 000 až 60 000 pacientů ročně. CLL je typickým příkladem lidské malignity způsobené zejména defektní apoptózou a naproti tomu akcelerovaným buněčným dělením, proliferací. Maligní lymfocyty, které se akumulují u pacientů s CLL, jsou převážně klidové necyklující buňky vykazující prodlouženou životnost následkem selhávající programované buněčné smrti (25).

Za normálních podmínek je životnost buněk udržována delikátní rovnováhou antiapoptotických a proapoptických genů, které fungují jako elektrický reostat (14), jenž zaručuje, že denní produkce cca 50 až 70 miliard buněk v lidském těle bude kontrolována jejich programovanou smrtí, apoptózou. Nerovnováha genů kontrolujících apoptózu pak vytváří živnou půdu pro vznik nádorových onemocnění. Porozumění daným dějům na molekulární úrovni, poznání změn apoptotických mechanismů v lidských nádorových buňkách a určení způsobu, jakým terapeutika indukují apoptózu, může nabídnout nové strategie a racionální přístupy v kombinované terapii nádorů.

Proto bylo cílem této studie bylo zjistit, jaké signální dráhy vedou ke spuštění programované smrti leukemických buněk po působení fyzikálních (ionizující záření) a chemických (kofein) faktorů a objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí signalizace a reparace poškození DNA a následné indukce apoptického procesu.

Jako modelovou buněčnou linií jsme použili buňky MOLT-4, které jsou odvozeny od lidské T-buněčné leukémie, nesoucí imuno-fenotypické charakteristiky thymocytů s expresí CD1<sup>+</sup> 49 %, CD4<sup>+</sup> 55 %, CD5<sup>+</sup> 72 % a CD7<sup>+</sup> 77 % (12) a jsou vhodným modelem pro studium molekulárních mechanismů zářením indukované apoptózy u T-lymfocytů. Druhou linií byly buňky HL-60 s nízkou úrovní diferenciací reprezentující lidskou promyelocytární leukémií. Použité linie se liší expresí významného nádorového supresoru, genu TP53.

Obecně lze říci, že indukce apoptózy u buněk MOLT-4 (p53-*wild type*; wt) po expozici dávkám do 10 Gy je rychlejší než u buněk HL-60 (p53-negativní). Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po expozici ionizujícímu záření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Při testování klonogenity MOLT-4 byla určena hodnota D<sub>0</sub> jako 0,87 Gy (dávka snižující počet přežívajících buněk na 37 %) a tyto buňky

jsou relativně radiosenzitivní ve srovnání s buňkami HL-60, jejichž  $D_0$  je 2,2 Gy (36). Buňky HL-60 se po dávkách do 5 Gy akumuluji zejména v G2-fázi a narozdíl od buněk MOLT-4, přítomnost v G2-bloku má výrazný vliv na jejich radiorezistenci a do apoptózy vstupují později.

## 2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 2.1 Ionizující záření a biodozimetrie

Experimenty byly provedeny s ionizujícím zářením (IZ) typu gama ( $^{60}\text{Co}$ ), které má povahu velmi krátkých elektromagnetických vln schopných ionizovat hmotu. Jeho fotony vyzařované atomovými jádry interagují s orbitálními elektrony hmoty za vzniku ionizace (Comptonův jev) či excitace atomu (fotoelektrický jev). V elektrickém poli se chovají neutrálně (22).

Klíčovou makromolekulou, jejíž radiační poškození může mít za následek smrt buňky, je DNA. V důsledku ozáření dochází k poklesu replikační i transkripční aktivity (22). Radiační poškození DNA má vážné biologické důsledky. Jelikož v současnosti narůstá význam IZ v medicíně či průmyslu ale i riziko teroristického zneužití, narůstá i nebezpečí, že bude záření vystavena osoba bez osobního dozimetru. Proto stoupá i význam biodozimetrie. Tento obor využívá nejúčinnějších molekulárních technik pro zpětný odečet dávky, který absorboval daný biologický systém.

IZ vede ke změnám genové a proteinové exprese, které by mohly být využity jako biologické indikátory obdržené dávky, zejména při ozáření nízkými dávkami záření (5). Jedná se především o expresi genů spojených s indukcí apoptózy případně onkogenů či tumor-supresorových genů. Proto jsme se v této práci kromě molekulárních mechanismů zabývali i hodnocením dávkových závislostí studovaných proteinů. Významným limitem, který je společný pro všechny současné biodozimetrické metody (stanovení mutací DNA a chromosomálních aberací a translokací mikroskopickými technikami, analýza mutací DNA pomocí PCR), je velká časová i technická náročnost. Z tohoto důvodu jsme se snažili použít metody technicky méně náročné a jednoduše aplikovatelné.

### 2.2 *Reparace DNA a ATM kinasa*

Působení fyzikálních nebo chemických faktorů může vést ke vzniku lézí DNA jako jsou poškození bazí, intramolekulární zesíťování vláken DNA, jednoduché či dvojité zlomy vláken a další (13). Dvojité zlomy DNA (*double strand breaks*, DSB) způsobují remodelaci

chromatinu a formování tzv. foků (*ionising radiation-induced foci*, IRIF), kde se již během prvních minut po ozáření lokalizují proteiny podílející se na opravě radiačního poškození jako jsou ATM kinasa (ATM), Mre11, Rad50, Nbs1 (proteiny reparačního komplexu MRN), Mdc1, 53BP1 (p53-vazebný protein 1) a BRCA1 (4).

ATM se odvozuje od ataxie-telangiektasie (A-T), lidské autosomálně recesivní poruchy, jejíž odpovědný gen je mutovaný. A-T buňky vykazují specifický genotyp a kromě zvýšené radiosensitivitu nalezneme u těchto buněk i genomovou nestabilitu, nádorové predispozice a zvýšenou citlivost k radiomimetikům a inhibitorům topoizomeras aj. (16). Význam ATM je nesporný, neboť reguluje všechny tři kontrolní body buněčného cyklu. Dále funguje při reparaci DNA a regulaci apoptózy a je tedy klíčovým a kontrolním článkem buněčné odpovědi na vznik DSB (13).

V průběhu let byla identifikovaná celá řada substrátů, které ATM pomocí fosforylace aktivuje. V této práci jsme se zaměřili na ty, které jsou vyžadovány pro zástavu buněčného cyklu a DNA reparaci a participují na G1/S kontrolním bodu. Jsou jimi *checkpoint* kinasa-2 (Chk-2) a *murine-double minute* protein (Mdm2). ATM je využívá k tomu, aby nastavila patřičnou aktivitu a stabilitu proteinu p53 (TP53 nádorový supresor). Protein p53 indukuje transkripci Mdm2 a ten se obratem váže na N-konec p53, čímž znemožní další transkripční aktivity a podpoří jeho degradaci (20). Pokud je buňka vystavena stresu indukujícím tvorbu DSB jako je IZ, je p53 fosforylován přímo ATM na Ser<sup>15</sup> a nepřímo fosforylací na Ser<sup>20</sup>, kterou zajišťuje Chk-2 aktivovaná opět ATM na Thr<sup>68</sup> (2, 19) Tyto fosforylace stabilizují p53, činí jej odolnějším vůči inhibičním efektům Mdm2 a navíc podněcují jeho transkripční aktivitu (29, 10). Kromě těchto postranslačních modifikací jsme se zabývali fosforylací na Ser<sup>392</sup>, která zvyšuje schopnost p53 vázat se na specifické sekvence DNA (8).

Transkripční aktivitu p53 také podporuje 53BP1. Obsahuje dvě BRCA1 C-koncové domény pro vazbu s p53 a jednu doménu zodpovědnou pro vazbu s fosforylovaným histonem H2A.X, která je nutná pro retenci 53BP1 v místě DSB (21). Jeho největší význam spočívá v tvorbě IRIF důležitých pro reparaci DSB a v nádorové supresi (38).

Hlavním transkripčním cílem p53, který ovlivňuje G1/S blok, je protein p21 (WAF1/Cip/Sdi1), který je schopný inhibovat celou řadu cyklin-dependentních kinas (30). Pokud však k této inhibici nedochází, buněčný cyklus může pokračovat (24).

ATM kontroluje nejen průběh buněčného cyklu, ale přes p53 zasahuje i do kontroly reparace poškozené DNA a programované buněčné smrti. Proto jsme se věnovali i dalším substrátům ATM jako jsou histon H2A.X a proteiny spojené s reparací DNA - proteiny komplexu Mre11/Rad50/Nbs1.

Při aktivaci ATM po ozáření hraje hlavní roli rychlá intermolekulární fosforylace na Ser<sup>1981</sup>, která způsobuje disociaci inaktivního dimeru a spouští aktivitu ATM (1). Pro její aktivaci je však zapotřebí také specifického komplexu proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 neboli MRN komplexu (33). Tento komplex je vlastním senzorem DSB a bylo prokázáno, že bez něj ATM aktivována není a že mutace komponentů MRN vedou ke genetickým poruchám jako jsou neurologické abnormality, radiosenzitivita, defekty buněčného cyklu, genomová nestabilita a nádorové predispozice (17). MRN komplex je asociován s chromatinem během replikace DNA a je schopen rozpoznat DSB a předat tuto informaci ATM tím, že atrahuje ATM k poškozeným molekulám DNA (18).

Důležitým poznatkem je skutečnost, že Nbs1 je sice postradatelný pro aktivaci ATM, ale jeho C-terminální motiv je nutný pro lokalizaci ATM v místě poškození (11). Velmi neobvyklé autosomálně recesivní onemocnění „*Nijmegen Breakage Syndrome*“ je charakterizované mikrocefalií, imunitní deficiencí a predispozicí k hematologickým maligním onemocněním. Syndrom je způsoben mutací Nbs1 genu (9).

Velmi časný krok v odpovědi na poškození DNA je fosforylace histonu subtypu H2A, třídy H2A.X. Je to děj, který mohou nezávisle na sobě provést dvě kinasy - ATM a DNA-dependentní proteinkinasa - a proto je pozorován i v A-T buněčných liniích (31). Fosforylovaný H2A.X na Ser<sup>139</sup> ( $\gamma$ H2A.X) může být vhodnou protilátkou vizualizován za pomoci imunofluorescence jako diskretní skvrna (fokus), a bylo zjištěno, že je lokalizován v oblasti do  $2 \times 10^6$  bází od místa DSB (27). Spíše než pro vazbu je  $\gamma$ H2A.X zřejmě nutný pro retenci některých proteinů účastnících se na reparaci DNA a sestavení reparačního komplexu v místě DSB (7).

Z výše uvedeného přehledu není pochyb o významu ATM v molekulárních cestách aktivovaných po ozáření nejen nádorových buněk. IZ vyvolává její aktivaci a je také jedním z nejrozšířenějších prostředků protinádorové terapie. Významným krokem v radioterapii je však hledání dalších agens, které mohou zvýšit senzitivitu buněk k cytotoxickým účinkům IZ. Farmakologické zrušení G2 kontrolního bodu by mohlo být jednou z potenciálních možností, jak zvýšit efekt radioterapie, jelikož by u buněk nedošlo k zástavě buněčného cyklu potřebné pro reparaci poškozené DNA.

Jednou z látek, které disponují touto vlastností, je inhibitor ATM, kofein (35, 37). Míra inhibice ATM je závislá na koncentraci kofeinu. V této práci jsme používali koncentraci 2 mmol/l, což je koncentrace, při níž kofein ještě efektivně ruší G2 blok buněčného cyklu a zvyšuje cytotoxicitu IZ, ale sám ještě není toxický (28). V této práci jsme se zabývali



kombinovaným vlivem IZ a kofeinu na molekulární signalizaci a reparaci poškození DNA (ATM-p53 signální dráha) a indukci apoptózy u leukemických buněk MOLT-4.

### 2.3 Apoptóza

Pokud poškození DNA dosáhne takové míry, že je nereparovatelné, je spuštěna programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Tento proces buněčného zániku s charakteristickými morfologickými rysy je důležitý jak pro embryonální vývoj a udržení buněčné homeostázy, tak pro patogenezí mnoha nemocí (34). Ke spuštění apoptózy je zapotřebí specifických impulsů, které vedou na rozdíl od nekrózy nikoli k zánětu a dalším patologickým stavů, nýbrž k organizovanému štěpení důležitých celulárních komponent, jehož výsledkem je zabalení buňky do neškodné formy - apoptotického tělíska. Tyto stimuly jsou buď fyzikální (IZ, UV-záření, teplota) nebo chemické (specifické ligandy, nedostatek růstových faktorů a celá řada chemikálií).

V inicializaci tohoto geneticky uchovávaného programu smrti mají hlavní slovo dva základní mechanismy, a to vnější, která zprostředkovává přenos signálu do nitra buňky membránovým receptorem smrti, a vnitřní, iniciovaná vznikem DSB, kde hrají důležitou roli mitochondrie. Oba tyto mechanismy vedou k zásadnímu a pro apoptózu charakteristickému ději. Tím je aktivace specifických proteas, kaspas, které jsou označovány za exekutory apoptózy. Jsou zodpovědné za zánik buňky (štěpení strukturálních, jaderných a dalších proteinů) a výsledný morfologický obraz (32).

Esenciálním krokem exekuční fáze apoptotického programu je kaskádovité štěpení a aktivace cystein-aspartátových proteas, kaspas. V intaktních buňkách jsou minimálně aktivní, uchovávané ve formě zymogenů, které vyžadují specifickou enzymatickou aktivaci. Kaspasy mohou být rozděleny na iniciační, zahrnující tzv. apikální kaspasy -2, -8, -9, -10 a pravděpodobně i -11 a exekuční, mezi než řadíme kaspasu-3, -6 a -7 (23).

Exekuční kaspasy jsou efektory apoptózy a štěpí buněčné substráty. Jsou zodpovědné za celou řadu morfologických a biochemických rysů apoptózy jako rozklad jádra či cytoskeletu, formaci apoptotických tělísek, expozici fosfatidylserinu na povrch buňky, což je pro makrofágy signálem k fagocytóze, a další.

Receptorová cesta je uplatňována prostřednictvím receptorů smrti a faktorů TNF rodiny. Existuje však také pozitivní zpětná vazba, kterou se tato cesta prolíná s mitochondriální cestou. K amplifikaci dochází v případě slabé iniciace kaspasy-8. Za těchto podmínek aktivuje kaspasa-8 proapoptotický protein Bid, který se translokuje na povrch mitochondrie a indukuje zde aktivaci vnitřní cesty (3).

Řada apoptotických stimulů nezávislých na receptorech smrti může spustit apoptózu vnitřní neboli mitochondriální cestou: IZ, UV-zářením, chemoterapeutika, viry, bakterie, nedostatek cytokinů a růstových faktorů či *anoikis* – oddělení od extracelulární matrix (6). Přesný mechanismus sice není znám, ale ví se, že vnější mitochondriální membrána se stává propustnou pro některé proteiny. Nejznámější a nejprozkoumanější z těchto proteinů je cytochrom c (cyt-c).

Cyt-c se v cytoplazmě spojuje s proteinem Apaf-1 a tím indukuje ATP-dependentní oligomerizaci a formaci tzv. apoptosomu, velkého apoptosomálního komplexu (1,4 MDa). Tento komplex přitahuje kaspasu-9 a allostericky zvyšuje její aktivitu (asi tisíckrát). Aktivovaná kaspasa-9 pak štěpí prokaspasu-3 a -7 (26). K uvolnění cyt-c z mitochondrie dochází prostřednictvím mitochondriálního póru.

Nejdůležitějšími regulátory mitochondriální cesty jsou proteiny rodiny Bcl-2 (15). V eukaryotických buňkách se vyskytuje asi 30 homologních proteinů rodiny Bcl-2, které mohou mít protichůdný vliv na osud buňky tím, že indukují nebo inhibují proces apoptózy. Závisí to na jejich strukturálních rysech, kterými jsou tzv. Bcl-2 homologní domény (BH). Jejich klasifikace je odvozena od homologů kódovaných v *Caenorhabditis elegans* (hlíst, na kterém byly provedeny první apoptotické studie) a člení se do tří podskupin: a) antiapoptotické Bcl-2-příbuzné faktory přežití jako Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Divia/Bcl-2-L-10 a Bcl-B; b) proapoptotické Bax-příbuzné faktory smrti jako Bax, Bak, Bok/Mtd a Bcl-x<sub>S</sub>; a konečně c) BH3-příbuzné proapoptotické faktory smrti mající jen doménu BH3 (tzv. BH3-onlies) jako Bid, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, BimL/Bod, Bad, Noxa, PUMA/Bbc3 a Bmf (6). Bcl-2-příbuzné faktory přežití jsou zakotveny v intracelulárních membránách (mitochondriální, jaderné, retikulární) a fungují jako „vychytávače“ proapoptotických faktorů a na rozdíl od faktorů smrti tak činí bez výrazné změny v subcelulární lokalizaci (6).

V této práci jsme se zabývali proteiny Mcl-1 (zástupce antiapoptotických) a Bid (zástupce proapoptotických členů Bcl-2 rodiny), cytochromem c a iniciačními kaspasami-8 a -9, abychom zhodnotili jejich chování a funkci v apoptóze indukované IZ v lidských leukemických buňkách.

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem této studie bylo zjistit, jaké signální dráhy vedou k reparaci poškození DNA a následně ke spuštění apoptózy lidských leukemických buněk po působení fyzikálních (ionizující záření) a chemických (kofein) faktorů. Použité buněčné linie se liší expresí proteinu p53 (T-lymfocytární MOLT-4 - p53-pozitivní a promyelocytární HL-60 - p53-negativní) a předpokládáme tedy i rozdílné molekulární mechanismy odpovědi na ozáření. Jednotlivé cíle byly stanoveny takto:

- objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí signalizace a reparace poškození DNA,
- objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí následné indukce apoptotického procesu,
- zhodnotit chování proteinů účastnících se zmíněné signalizace v kontextu obdržené dávky s ohledem na využití v biologické dozimetrii.

### 4. MATERIÁL A METODY

Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 a T-lymfocytární leukemie MOLT-4 jsme získali z evropské sbírky buněčných kultur (European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány v Iskově modifikaci Dulbeccova média. V této práci byly použity buňky, které prošly maximálně 20 pasážemi. Exponenciálně rostoucí buňky byly ozářeny při pokojové teplotě za použití zářiče  $^{60}\text{Co}$  dávkovým příkonem 0,4 - 0,5 Gy/min, ze vzdálenosti 1 m od zdroje. Po ozáření byly lahvičky umístěny do inkubátoru při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$  a alikvotní části byly odebrány v různých časech. Pro následnou analýzu byly buňky spočítány a viabilita byla určena metodou barvení Trypanovou modří. V experimentech s medikamentózním ovlivněním, byl 30 min před ozářením do kultivačních nádob s buňkami přidán kofein (Sigma, Saint Louis, MS, USA) tak, aby finální koncentrace byla 2 mmol/l.

Proteiny celobuněčných lyzátů byly separovány elektroforeticky (MiniProtean 3, Bio-Rad, Herkules, CA, USA) na polyakrylamidovém gelu, přeneseny na polyvinylidfluoridovou membránu (Bio-Rad), detekovány specifickou monoklonální protilátkou (anti-ATM (Ser<sup>1981</sup>), anti-Chk-2 (Thr<sup>68</sup>), anti-COX IV, anti-Mdm2 (Ser<sup>166</sup>), anti-Mre11 a anti-Nbs1 (Ser<sup>343</sup>) - Cell Signaling, Danvers, MA, USA; anti-p53 a anti-p53 (Ser<sup>392</sup>) - (Exbio, Prague, CZE); anti-p53

(Ser<sup>15</sup>) - Calbiochem, San Diego, CA, USA; anti-lamin B - Oncogene, Cambridge, MA, USA; anti-Bid - BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; anti-kaspasa-8, anti-kaspasa-9 a anti-Nbs1 - Upstate, Chicago, IL, USA; anti-Mcl-1, anti- $\beta$ -aktin, anti-p21 a anti-Rad50 - Sigma, Saint Luis, MS, USA; anti-cytochrom c - NeoMarkers, Westinghouse, CA, USA) a vizualizovány na film pomocí chemiluminiscence. Následně byly filmy naskenovány a densitometricky analyzovány.

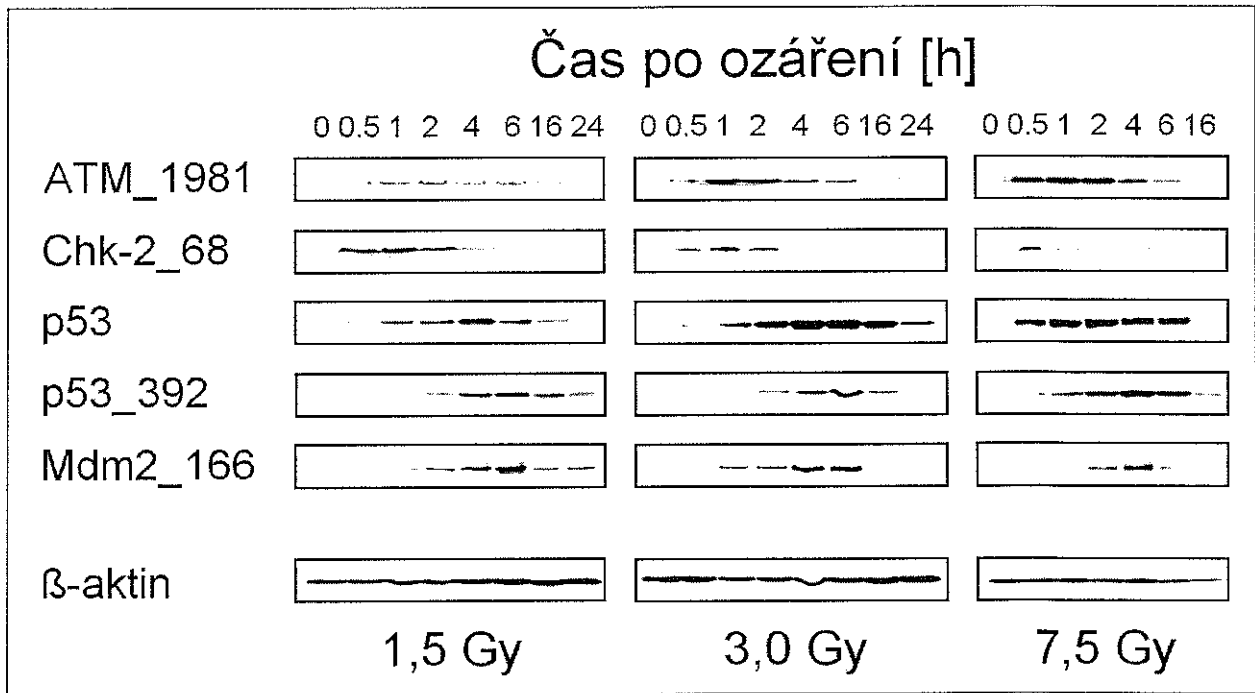
Pro analýzu fosforylace proteinu p53 byl použit PathScan ELISA Sandwich kit (Upstate, Chicago, IL, USA) s protilátkou proti nefosforylované a fosforylované (Ser<sup>15</sup>) formě proteinu p53.

Průtokovou cytometrií (cytometr Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA) byla v buňkách stanovena apoptóza pomocí detekce vazby annexinu V na fosfatidylserin (expozice fosfatidylserinu na plazmatické membráně svědčí o její porušenosti a je známkou apoptotického procesu) a detekcí APO2.7 (protein lokalizovaný na mitochondriální membráně, jehož exprese je omezená na buňky zadané do apoptózy). Dále byl průtokovou cytometrií analyzován obsah DNA (apoptotické buňky v sub-G1 fázi).

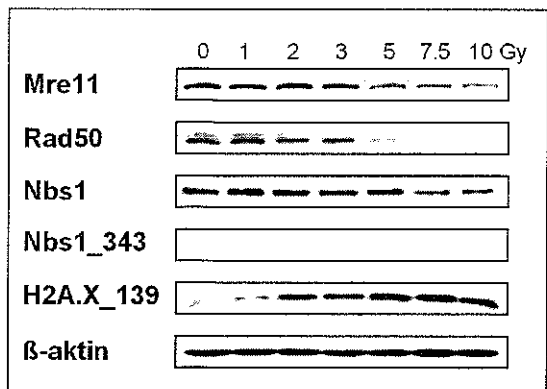
Pro hodnocení fosforylace histonu H2A.X (Ser<sup>139</sup>) a vzniku IZ indukovaných ložisek byla použita imunocytochemická detekce protilátkou (anti-H2A.X – Upstate; anti-53BP1 - Cell Signaling; sekundární protilátky FITC-konjugovaná nebo Cy3-konjugovaná - Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Fotografie byly získány na konfokálním cytometru s vysokým rozlišením pomocí automatizovaného fluorescenčního mikroskopu DM RXA s CSU-10a konfokální jednotkou (Leica, Yokogawa, JAP) a CoolSnap HQ kamerou (Photometrix, Melbourne, Rakousko). Pro každé jádro bylo zaznamenáno 40 řezů po 0,3  $\mu$ m.

## 5. SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ

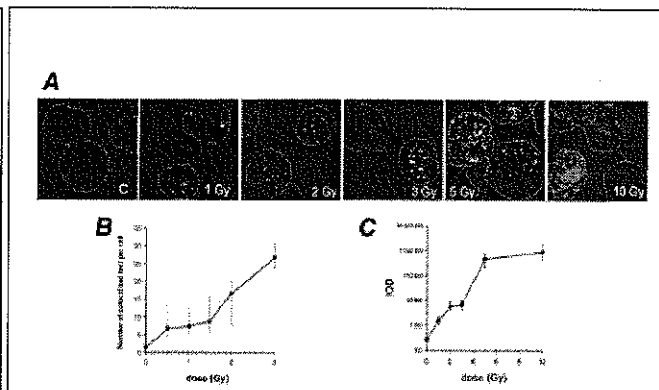
- U buněk MOLT-4 jsme prokázali indukci signální dráhy ATM/Chk-2/p53, která je aktivována časně po expozici IZ (obr. 1). Navzdory funkci ATM kinase jsme však u těchto buněk prokázali, že ozáření nevede k fosforylaci Nbs1, důležitého komponentu reparačního komplexu MRN. V důsledku snížené aktivace proteinů MRN nedochází k dostatečné reparaci zářením indukovaného poškození DNA, což pokládáme za jeden z důvodů zvýšené radiosenzitivity těchto buněk (obr.2).
- U této linie se nám podařilo prokázat dávkově závislý vzestup fosforylace histonu H2A.X na Ser<sup>139</sup> a IRIF (obr. 3). Dále jsme prokázali fosforylaci proteinu p53 na Ser<sup>15</sup>, což dosud u buněk MOLT-4 nebylo pozorováno. Tento protein (resp. danou formu) jsme proto navrhli jako potenciální marker využitelný v biodozimetrii pro zpětný odečet obdržené dávky IZ (obr. 4).
- Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po ozáření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Prokázali jsme aktivaci obou iniciačních kaspas-8 a -9 po působení IZ, která probíhá simultánně (obr. 5).
- Naproti tomu buňky HL-60 podléhají po nízkých dávkách tzv. oddálené apoptóze, které předchází akumulace buněk v G2 bloku nutná pro opravu poškozené DNA. Druhou možností je rychlá apoptóza, která je navozena supra/letálními dávkami několik hodin po ozáření. V p53-negativních buňkách HL-60 dochází nejprve k aktivaci kaspasy-8 a později k aktivaci kaspasy-9. To naznačuje, že při radiaci indukované apoptóze zastává důležitější roli kaspasa-8, která pomáhá zprostředkovat přenos apoptotického signálu v p53-negativních podmínkách.
- V obou liniích po subletální nikoli letální dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 narůstá a s nástupem apoptózy klesá. IZ také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid a uvolnění cyt-c (obr. 6 a 7).
- Prokázali jsme radiosenzibilizující efekt kofeinu na buňky MOLT-4. Inhibice signální dráhy ATM/Chk-2/p53 vede přes sníženou aktivaci proteinu p21 ke zrušení G2 bloku a zářením indukované poškození DNA pak nemůže být efektivně opraveno (obr. 8). Látky snižující schopnost nádorových buněk reparovat radiaci poškození jsou potenciálně významné v kombinované terapii nádorových onemocnění.



Obr. 1. MOLT-4. Ionizující záření indukuje fosforylaci ATM kinasy a jejích substrátů. Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. IZ indukovalo rychlou fosforylaci ATM a Chk-2, která byla následována upregulací a fosforylaci p53 a Mdm2. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.

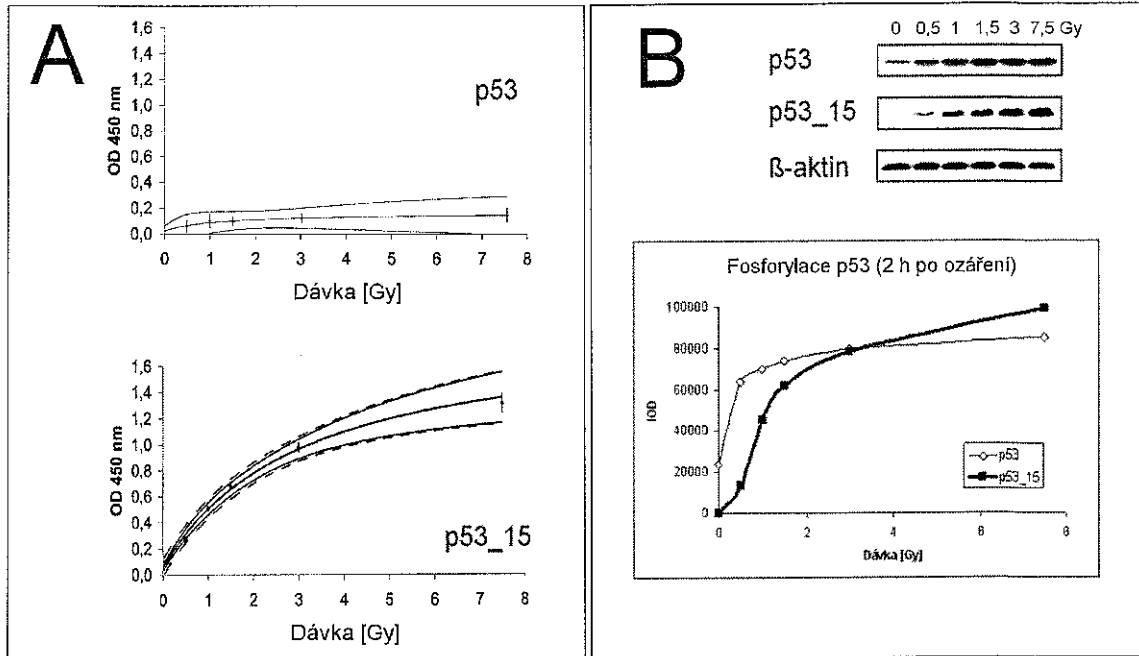


**Obr. 2. MOLT-4. Dávková závislost reparačních proteinů.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Ionizující záření nevede k fosforylaci Nbs1 na Ser<sup>343</sup> (nebyla vůbec detekována) a 1 h po ozáření dávkami 5 - 10 Gy je indukován pokles proteinů MRN komplexu. Naopak fosforylace H2A.X na Ser<sup>139</sup> se vzrůstající dávkou stoupá. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty nejméně ze tří nezávislých experimentů. Graf vyjadřuje densitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce. *IOD*, integrovaná optická densita.



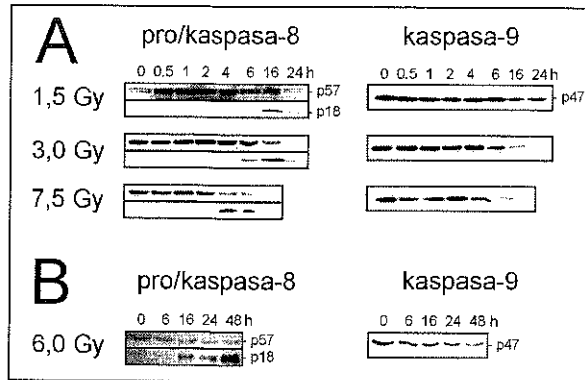
**Obr. 3. MOLT-4. Dávková závislost tvorby IRIF  $\gamma$ H2A.X 1 h po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno.

- (A) Ložiska  $\gamma$ H2A.X detekovaná imunocytochemicky na konfokálním mikroskopu.  
 (B) Počet IRIF (kolokalizace  $\gamma$ H2A.X a 53BP1) na jádro se zvyšuje v závislosti na dávce záření do 3 Gy.  
 (C) Dávková závislost vzestupu intenzity fluorescence  $\gamma$ H2A.X (měřeno pomocí softwaru pro analýzu obrazu). Patrná je lineární dávková závislost do 5 Gy.

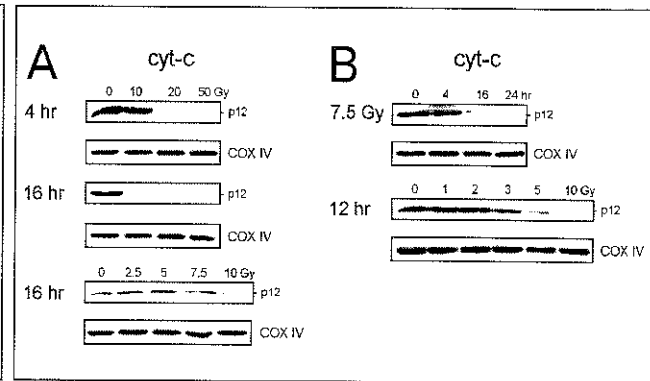


Obr. 4. MOLT-4. Fosforylace p53 na Ser<sup>15</sup> po ozáření je dávkově závislá. Buňky byly ozářeny a zlyzovány, jak je indikováno. Experimenty byly provedeny 2 h po ozáření. (A) ELISA. Množství nefosforylovaného p53 se zvýšilo jen nepatrně. Množství fosforylované formy na Ser<sup>15</sup> se však zvýšilo dávkově závislým způsobem. (B) Western blotting. Data získaná Western blottingem korelují s výsledky předchozí analýzy. Graf vyjadřuje jeditu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce IZ. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. IOD, integrovaná optická denzita.

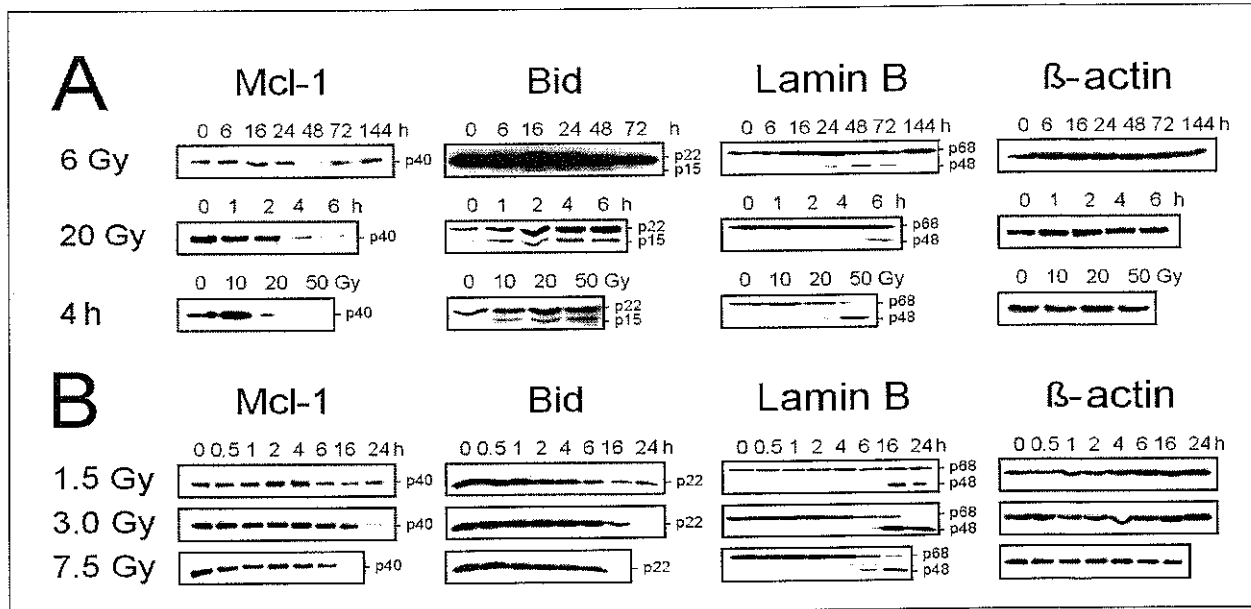




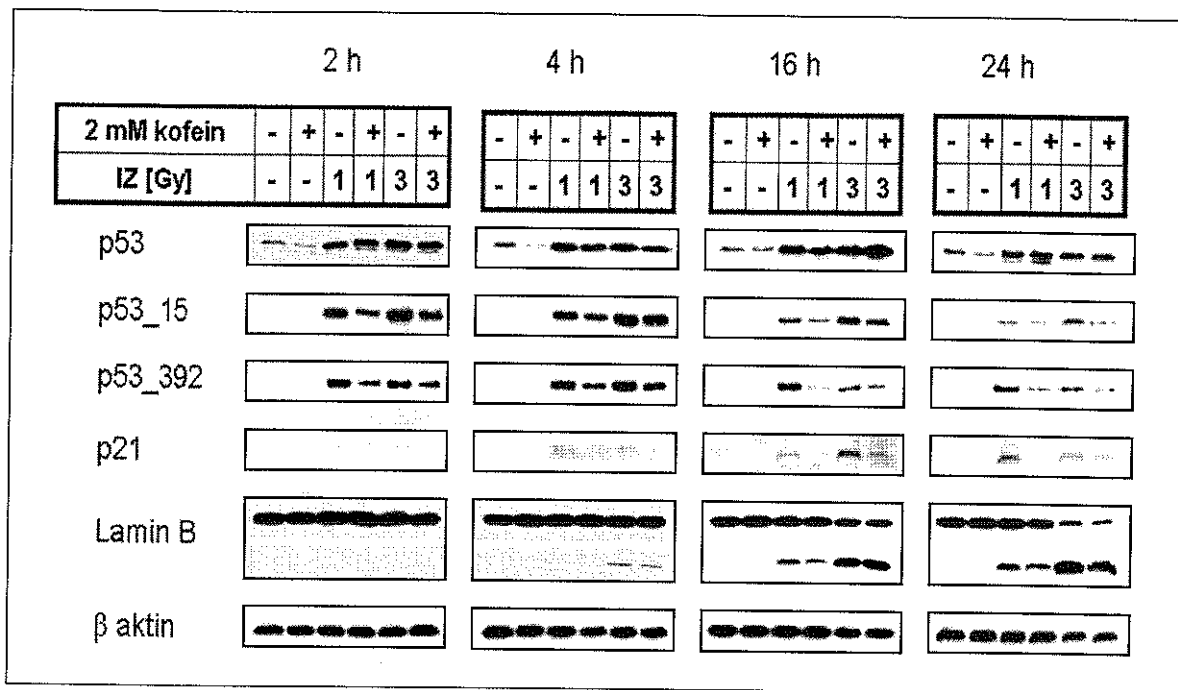
**Obr. 5. Aktivace iniciačních kaspas po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány. **(A) MOLT-4.** Po ozáření všemi dávkami jsme detekovali simultánní aktivaci kaspasy-8 (inaktivní proforma 57 kDa byla štěpena ve funkční kaspasovou podjednotku 18 kDa) a pokles prokaspasy-9. **(B) HL-60.** Po ozáření dávkou 6 Gy jsme detekovali aktivní kaspasu-8 po 16 h, tedy v čase, kdy byl štěpen Bid a pokles prokaspasy-9 byl zaznamenán s časovým zpožděním (24-48 h). Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze 3 nezávislých experimentů.



**Obr. 6. Uvolnění cyt-c z mitochondriální matrix po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a mitochondriální frakce byly izolovány. **(A) HL-60.** Uvolnění cyt-c z mitochondrií je časově závislé na dávce. Po dávkách 20 a 50 Gy dochází k uvolnění velmi rychle (4 h po ozáření). Dávka 10 Gy indukuje jeho uvolnění za 16 h ovšem dávky menší než 10 Gy až později. **(B) MOLT-4.** Po dávce 7,5 Gy dochází k uvolnění mezi 4 a 16 h po ozáření. Za 12 h po ozáření je dynamika uvolnění dávkově závislá zejména v oblasti nad 2 Gy. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze 3 nezávislých experimentů.



**Obr. 7. Ionizující záření působí pokles Mcl-1 a Bid.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. **(A) Buňky HL-60.** Po ozáření dávkou 6 Gy nikoliv po dávce 20 Gy množství Mcl-1 narůstá, později klesá s nástupem apoptózy (potvrzena detekcí štěpení nukleárního laminu B). Před indukcí apoptózy je Bid (22 kDa) štěpen na proapoptotický t-Bid (15 kDa). Po subletální dávce dojde za 72 h k obnově buněčného cyklu, což se projeví nárůstem Mcl-1 a poklesem t-Bid a štěpeného laminu B. **(B) Buňky MOLT-4.** Stejně jako u buněk HL-60 dochází po cytostatické a subletální (1,5 a 3 Gy) nikoliv po letální dávce (7,5 Gy) k iniciálnímu nárůstu množství Mcl-1. S nástupem apoptózy jeho množství klesá. Pokles plně formy Bid (22 kDa) koreluje s nástupem apoptózy (potvrzena detekcí štěpení nukleárního laminu B).



Obr. 8. MOLT-4. Kofein inhibuje fosforylaci p53. Buňky byly ovlivněny kofeinem, ozářeny, zlyzovány a analyzovány. Kofein tlumí expresi p53 a dále inhibuje ATM-dependentní fosforylaci na Ser<sup>15</sup> a na Ser<sup>392</sup>. Patrná je také inhibice upregulace proteinu p21 a kaspasového štěpení laminu B v kombinaci s oběma použitými dávkami. Uvedeny jsou reprezentativní Western bioty ze tří nezávislých experimentů.

## 6. ZÁVĚR

V této práci jsme se věnovali studiu molekulárních mechanismů aktivovaných ionizujícím zářením (IZ) v lidských nádorových buňkách. Hlavními metodickými přístupy byla SDS-elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s imunodetekcí a průtoková cytometrie. Experimenty byly provedeny na T-lymfocytární leukemické linii MOLT-4, která exprimuje protein p53 (p53-wt) a na promyelocytární leukemické linii HL-60, která je p53-negativní. Při testování klonogenity MOLT-4 byla určena hodnota  $D_0$  jako 0,87 Gy (dávka snižující počet přežívajících buněk na 37 %) a tyto buňky jsou relativně radiosenzitivní ve srovnání s buňkami HL-60, jejichž  $D_0$  je 2,2 Gy (Vávrová et al., 2004).

IZ způsobuje dvojité zlomy DNA (DSB) a primární molekulou odpovídající na vznik DSB a regulující reparaci poškozené DNA je ATM kinasa (ATM). Zabývali jsme se mechanismy spojenými s aktivací (fosforylací) ATM a jejich substrátů *checkpoint* kinasy-2 (Chk-2), histonu H2A.X, proteinu p53 a jeho negativního regulátoru Mdm2 a dále proteiny DNA reparačního komplexu Mre11/Rad50/Nbs1.

Naše práce ukázala, že v buňkách MOLT-4 byla velmi časně po ozáření aktivována ATM na Ser<sup>1981</sup> a také Chk-2 na Thr<sup>68</sup>. Krátce po jejich aktivaci byl upregulován p53, který byl fosforylován na Ser<sup>392</sup>, což usnadňuje jeho vazbu na DNA a podporuje transkripční aktivitu, a dále na Ser<sup>15</sup>, což tlumí interakci s Mdm2. IZ také indukovalo autoregulační zpětnou vazbu v podobě aktivace onkoproteinu Mdm2 (Ser<sup>166</sup>), který byl fosforylován v době maximální fosforylace p53.

Velmi časný krok v odpovědi na poškození DNA je fosforylace H2A.X, který byl 1 h po ozáření detekován především imunocytochemicky pomocí konfokální mikroskopie v místě DSB, kde byl kolokalizován s proteinem 53BP1. V ozářených buňkách však nebyla 1 h po expozici detekována fosforylovaná forma Nbs1 a množství nefosforylovaných reparačních proteinů Nbs1, Mre11 i Rad50 se po letálních dávkách snížilo. Navzdory funkční ATM není tedy reparace radiačního poškození DNA u buněk MOLT-4 dostatečná, což může být jeden z důvodů zvýšené radiosenzitivity těchto buněk.

Pokud poškození DNA dosáhne takové míry, že je nreparovatelné, je spuštěna programovaná buněčná smrt. U studovaných buněčných linií je patrný odlišný způsob indukce apoptózy. Apoptóza má u buněk HL-60 po ozáření dávkami nad 10 Gy rychlý nástup a je prokazatelná za 6 h. Po nižších dávkách (do 10 Gy) přechází buňky do G2 bloku a pokouší se reparovat vzniklé poškození. Apoptóza je pak navozena s maximem za 48 až 72 h

po ozáření. Buňky MOLT-4 se akumulují v S- a částečně v G2-fázi a hynou převážně mitotickou apoptózou v rozmezí 12 až 24 h po ozáření.

Apoptotický proces je kontrolován zejména proteiny rodiny Bcl-2. Naše výsledky ukázaly, že v obou buněčných liniích po subletální, ale nikoli po letální dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 narůstá a s nástupem apoptózy klesá. IZ také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid. Následně byly aktivovány obě iniciační kaspasy-8 a -9 a tedy i obě cesty indukce apoptózy (receptorová a mitochondriální). Tuto aktivaci jsme pozorovali v obou liniích a můžeme tedy říci, že byla nezávislá na přítomnosti p53 v buňkách. Zajímavým zjištěním však bylo, že v p53-negativních buňkách dochází k nejprve k aktivaci kaspasy-8 a později k aktivaci kaspasy-9, kdežto v p53-positivních buňkách jsou obě kaspasy aktivovány simultánně. To naznačuje, že při radiaci indukované apoptóze zastává důležitější roli kaspasa-8, která pomáhá zprostředkovat přenos apoptotického signálu v p53-negativních podmínkách.

Kromě objasnění některých molekulárních mechanismů aktivovaných po ozáření bylo důležitým výstupem naší práce zhodnocení chování proteinů účastnících se této signalizace v kontextu obdržené dávky. Množství fosforylované ATM se po ozáření ve srovnání s neozářenými buňkami zvyšuje, ale stejně jako fosforylace Chk-2 nejeví žádnou dávkově závislou odpověď. Fosforylace H2A.X a ko lokalizace s 53BP1 vykazuje dávkovou závislost především do 3 Gy. Fosforylace Mdm2 se sice po nižších dávkách (do 2 Gy) zvyšuje, ale vyšší dávky pak působí úbytek fosforylované formy. Podařilo se nám ovšem prokázat, že protein p53 (forma fosforylovaná na Ser<sup>15</sup>) reaguje na ozáření dávkově závislým vzestupem (v čase 2 h) a proteiny Mcl-1 a cyt-c reagují na ozáření dávkově závislým poklesem (za 16 a 12 h). Zejména protein p53, u kterého byla ověřena dávkově závislá odpověď též metodou ELISA, je tedy možné doporučit jako potenciální molekulární indikátor využitelný v biologické dozimetrii pro zpětné určení obdržené dávky IZ.

Dále byl na ozařovaných buňkách MOLT-4 studován vliv preinkubace s kofeinem (2 mmol/l). Prokázali jsme inhibiční efekt kofeinu na signální dráhu ATM/Chk-2/p53. Obě fosforylace jak na Ser<sup>15</sup>, tak na Ser<sup>392</sup> byly výrazně inhibovány. Díky tomu nedošlo prostřednictvím p53 k aktivaci proteinu p21. Ten funguje jako inhibitor cyklin-dependentních kinas a při jeho snížené expresi dochází ke zrušení G2 bloku, který je nutný pro efektivní reparaci radiačního poškození DNA. Kofein použitý v koncentraci, při které není pro buňky toxický, zvyšuje cytotoxické účinky IZ a je potenciální látkou využitelnou při kombinované léčbě nádorových onemocnění.

## 7. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### 7.1 Původní články

- Tichý A**, Zášková D, Pejchal J, Řezáčová M, Österreicher J, Vávrová J, Cerman J. Gamma irradiation of human leukaemic cells HL-60 and MOLT-4 induces decrease in Mcl-1 and Bid, release of cytochrome c, and activation of caspase-8 and caspase-9. *International Journal of Radiation Biology* 2008; přijato k tisku, IF = 1,312.
- Tichý A**, Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Pejchal J, Vilasová Z, Cerman J, Österreicher J. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochimica Polonica* 2007; **54**: 281-287. IF = 1,363.
- Řezáčová M, **Tichý A**, Vávrová J, Vokurková D, Lukášová E. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? *Leukemia Research* 2008; přijato k tisku, IF = 2,483.
- Pejchal J, Österreicher J, Vilasova Z, **Tichy A**, Vavrova J. Expression of activated ATF-2, CREB and c-Myc in rat colon transversum after whole-body gamma-irradiation and its contribution to pathology and biodosimetry. *Int J Rad Biol* 2008; přijato k tisku, IF = 1,312.
- Pejchal J, Österreicher J, Kassa J, **Tichy A**, Mokry J. Activation of Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways after soman poisoning in rat cerebellar granule neurons. *J App Tox* 2007; přijato k tisku, IF = 1,625.
- Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, **Tichý A**. Effect of Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, on Cell Death and Molecular Changes Caused by Low-Dose Irradiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **40**:1-14. IF = 1,930.
- Rezacova M, Vavrova J, Vokurkova D, **Tichy A**, Knizek J, Psutka J. The importance of abrogation of G2-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation. *Acta Biochimica Polonica* 2005; **52**: 889-895. IF = 1,363.
- Vilasová Z, Řezáčová M, Vávrová J, **Tichý A**, Vokurková D, Zoelzer F, Řeháková Z, Österreicher J, Lukášová E. Molecular mechanisms of response of human peripheral blood mononuclear cells to ionizing radiation. *Acta Biochim Pol* 2008 (zasláno k tisku). IF = 1,363.

## 7.2 Přehledové články

**Tichý A.** Apoptotic machinery: the Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta Medica* (Hradec Králové) 2006; **49**: 13-18. Review.

## 7.3 Abstrakta

**Tichý A,** Zášková D, Řezáčová M, Cerman J, Vávrová J, Österreicher J, Vilasová Z, Vokurková D. Checkpoint kinase-2 and protein p53 in human leukemic cells, MOLT-4, after gamma irradiation. *New Frontiers in the Research of PhD Students*. Editor: Prof. MUDr. Ivo Steiner, CSc., 2006;73-76. ISBN: 80-229-8103-X. Hradec Králové, CZE.

**Tichý A,** Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Cerman J, Österreicher J. Molecular pathways induced after gamma irradiation in human leukemic cell lines. *The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society*. 2006;72. ISBN: nemá. Černobilinterinform, Kyjev, UKR.

**Tichý A,** Correia-da-Silva G, Oliveira R, Teixeira NA. Apoptotic pathways in rat uterine tissues during pregnancy: cytochrome c and caspase activity. *Placenta* 2003; **24** No. 8/9 A17.

## 7.4 Přednášky

**Tichý A.** Od molekulárních mechanismů k biosimetrii. *Seminář - Ionizující záření: účinek na molekulární a buněčné úrovni* 6.12.2007, Hradec Králové, CZE.

**Tichý A,** Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Cerman J, Österreicher J. Can we exploit phosphorylation of protein p53 in biosimetry? *NATO/RTG-099 Meeting* 4.-7.6.2007 Brno, CZE.

**Tichý A.** Causa Polonium. *Seminář radiační nehody a jejich následky* 15.5.2007 Hradec Králové, CZE.

**Tichý A,** Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Cerman J, Österreicher J. Gamma-radiation induced molecular signaling in human leukemic cells, MOLT-4. *Association for Radiation Research Annual Meeting* 3.-5.4.2007 Belfast, UK.

**Tichý A,** Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D Österreicher J, Cerman J, Vilasová Z. Proteiny podílející se na indukci apoptózy vyvolané ionizujícím zářením u leukemických buněk MOLT-4. *Nové pohledy na účinek ionizujícího záření a cytostatických látek na molekulární úrovni* 7.12.2006, Hradec Králové, CZE.

- Tichý A, Zášková D, Řezáčová M, Cerman J, Vávrová J, Österreicher J, Vilasová Z, Vokurková D.** Checkpoint kinase-2 and protein p53 in human leukemic cells, MOLT-4, after gamma irradiation. *New Frontiers in the Research of PhD Students* 30.11.-1.12.2006 Hradec Králové, CZE.
- Tichý A, Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Cerman J, Österreicher J.** Molecular pathways induced after gamma irradiation in human leukemic cell lines. *European Radiation Research* 21.-25.8.2006 Kiev, UKR
- Tichý A, Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Cerman J.** Molekulární mechanismy aktivované po ozáření u leukemických buněk 450. *plenární zasedání ČLS JEP* 7.6.2006 Hradec Králové, CZE.
- Tichý A.** Apoptóza ve tkáni a v buněčných kulturách: Dynamika cytochromu c, kaspas a proteinů Bcl-2. *1.Královéhradecké postgraduální dny* (3. místo v teoretické sekci) 14.-15.12.2004 Hradec Králové, CZE.

### **7.5 Plakátová sdělení**

- Tichý A, Zášková D, Vilasová Z, Řezáčová M, Vávrová J, Österreicher J.** Radiation-induced phosphorylation of p53 on Ser15 in MOLT-4 cells is dose-dependent. *13<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (7/2007)*, San Francisco, CA, USA.
- Tichý A, Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Cerman J, Österreicher J.** Ionizing radiation induces molecular signaling in human leukemic cell lines. *A-Schutztagung (2/2007)*, Mnichov, GER.
- Tichý A, Zášková D, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D.** Mcl-1, antiapoptický protein Bcl-2 rodiny, a jeho změny v leukemických buněčných liniích po gama ozáření. *Konferencia učitelů chemie a biochemie na lékařských fakultách (5/2006)*, Vrútky, SK.
- Tichý A, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D.** Mcl-1, an anti-apoptotic member of Bcl-2 family and its changes in leukemic cell lines after gamma irradiation. *European Radiation Research (9/2005)*, Leicester, UK.



## 8. SOUHRN

Tato práce se zabývá molekulárními mechanismy aktivovanými ionizujícím zářením, které vedou k reparaci vzniklého poškození DNA nebo k indukci apoptózy. Využity byly lidské leukemické buněčné linie lišící se expresí nádorového supresoru, proteinu p53 (pozitivní u T-lymfocytární linie MOLT-4 a negativní u promyelocytární linie HL-60).

U buněk MOLT-4 byla prokázána funkční signální dráha závislá na ATM kinase, klíčovém enzymu, který aktivuje celou řadu substrátů účastnících se zástavy buněčného cyklu a opravy DNA. Významným zjištěním je, že u těchto buněk nedochází k efektivní reparaci, jelikož zde není fosforylován důležitý komponent reparačního komplexu MRN, protein Nbs1, což pokládáme za jeden z důvodů jejich zvýšené radiosensitivity.

Zářením indukovaná aktivace ATM kinasy vede k rychlé fosforylaci checkpoint kinasy-2 a k upregulaci a fosforylaci p53 a jeho negativního regulátoru, onkoproteinu Mdm2.

Kromě reparace DNA, která je nutná pro další proliferaci buněk, jsme se věnovali studiu buněčné smrti. U obou studovaných linií jsme potvrdili aktivaci jak receptorové, tak mitochondriální cesty indukce apoptózy. V obou liniích po subletální (nikoli letální) dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 vzrůstalo a s nástupem apoptózy pokleslo. Záření také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid a uvolnění cyt-c z mitochondrií. Zajímavým zjištěním však bylo, že v p53 pozitivních podmínkách (MOLT-4) dochází k simultánní aktivaci iniciačních kaspas-8 a -9, kdežto v podmínkách p53 negativních (HL-60) je kaspasa-9 aktivována s výrazným časovým zpožděním. To naznačuje, že pokud chybí protein p53, hraje důležitější úlohu v indukci zářením navozené apoptózy kaspasa-8. Obě linie se též liší typem apoptózy. Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po ozáření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Na druhou stranu buňky HL-60 podléhají po nízkých dávkách tzv. oddálené apoptóze, které předchází akumulace buněk v G2 bloku nutná pro opravu poškozené DNA, nebo umírají rychlou apoptózou, která je navozena supra/letálními dávkami několik hodin po ozáření

Prokázali jsme fosforylaci p53 na Ser<sup>15</sup>, která jeví výraznou dávkovou závislost v oblasti do 3 Gy (kromě Western blottingu ověřeno metodou ELISA) a proto jsme tento protein navrhli jako molekulární indikátor využitelný v biodozimetrii pro zpětné určení obdržené dávky IZ. Na signální dráze ATM/Chk-2/p53 jsme též prokázali inhibiční efekt kofeinu (kombinace nízkých dávek a koncentrace 2 mmol/l), který zvyšuje cytotoxické účinky IZ a je látkou potenciálně využitelnou v kombinované terapii nádorových onemocnění.

## 9. SUMMARY

Presented work is engaged with focused on molecular mechanisms activated by ionising radiation leading to reparation of DNA lesion or to induction of apoptosis. We used human leukaemic cell lines differing in expression of the tumor suppressor protein p53 (positive in T-lymphocyte MOLT-4 and negative in promyelocyte HL-60 cell lines, resp.).

In MOLT-4 cells we proved ATM kinase-dependent signaling pathway, which activates number of substrates involved not only in cell-cycle arrest but also in DNA reparation, to be functional. An out breaking finding is that DNA reparation is not effective in these cells, presumably due to an impaired phosphorylation of Nbs1 protein, an important part of reparation complex MRN. We assume this as one of the reasons for higher radio-sensitivity of these cells.

Radiation-induced activation of ATM kinase leads to rapid phosphorylation of checkpoint kinase-2 and to up-regulation and phosphorylation of p53 and its negative regulator - oncoprotein Mdm2.

Besides DNA reparation indispensable for further proliferation of the cells we focused on cell death. In each cell line studied we confirmed activation of both receptor and mitochondrial pathways of induction of apoptosis. In both of them the amount of antiapoptotic protein Mcl-1 increased after sublethal but not lethal doses. Later (with onset of apoptosis) it declined. Irradiation also induced cleavage of proapoptotic protein Bid and release of cytochrome c from mitochondria. An interesting finding is that in p53-positive conditions (MOLT-4) are both initiation caspases-8 and -9 activated simultaneously, while in p53-negative conditions is caspase-9 activation obviously delayed. This suggests that caspase-8 plays more important role in the cells lacking p53. Both of the cell lines also differ in the mode of apoptosis. The MOLT-4 cells exhibit wide disparity in the time of induction of apoptosis and they die mostly by so-called mitotic apoptosis. On the other hand, HL-60 cells undergo so-called delayed apoptosis (induced after G2 arrest necessary for DNA repair) after the low dose, or they die by rapid apoptosis induced by supra/lethal doses within hours after irradiation.

We proved phosphorylation of p53 on Ser<sup>15</sup> to be dose-dependent up to 3 Gy (confirmed by Western blotting and ELISA) and therefore we proposed this protein as a biodosimetric marker of absorbed dose of ionising radiation. Using ATM/Chk-2/p53 signaling pathway, we also proved that caffeine (2 mM) increases cytotoxicity of low doses of radiation and can be exploited in combined therapy of cancer.

## 10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

*Uveden je výběr klíčových citací z celkem 187 citovaných v disertačním spisu.*

1. Bakkenist C, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499–506.
2. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998;281:1674–7.
3. Belka C, Budach W. Antiapoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 2002;78:643–58.
4. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 2006;173:195–206.
5. Blakely W.F. Nucleic acid molecular biomarkers for diagnostic biodosimetry applications: Use of the fluorogenic 5-nuclease polymerase chain reaction assay. *Military medicine* 2002;167 (Suppl 1):16–18.
6. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immun* 2003;39:615–47.
7. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002;296:922–7.
8. Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G et al. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2003;22:5813–27.
9. Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1207–17.
10. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13777–82.
11. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005;434:605–11.
12. Greenberg JM, Gonzalez-Sarmiento R, Artur DC. Immunophenotypic and cytogenetic analysis of MOLT-3 and MOLT-4: human cell lines with rearrangement of chromosome 7. *Blood* 1988;72:1755–60.
13. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. Related Articles, Links ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001;8:1052–65. Review.
14. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993;6:327–32.
15. Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006;11:1661–75.
16. Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 1997;15:177–202.
17. Lavin MF. The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1515–20.
18. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 2005;308:551–4.
19. Matsuo S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10389–94.
20. Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 2003;13:49–58. Review.
21. Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:945–52.
22. Österreicher J, Vávrová J. Přednášky z radiobiologie. 1. vyd. Praha: Manus, 2003;6,29–30.
23. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004;8:432–44.

24. Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell biology*. 1. vyd. Philadelphia: Sander, Elsevier Science, 2002:688-9.
25. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol*. 1998;25:11- 8. Review.
26. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-84.
27. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905-16.
28. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 1999;59:4375-82.
29. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997;91:325-34.
30. Schwartz GK. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle* 2002;1:122-3. Review.
31. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 2004;64:2390-6.
32. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6. Review.
33. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y et al. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 2003;22:5612-21.
34. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.
35. Vávrová J, Mareková-Rezáčová M, Vokurková D, Szkanderová S et al. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiat Environ Biophys* 2003;42:193-9.
36. Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Psutka J. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res* 2004;53:335-42.
37. Wang XQ, Stanbridge EJ, Lao X, Cai Q et al. p53-dependent Chk1 phosphorylation is required for maintenance of prolonged G2 Arrest. *Radiat Res* 2007;168:706-15.
38. Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J. p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 2003 ;23:2556-63.