

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**STUDIUM APOPTÓZY U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ:
VZTAH K BUNĚČNÉMU CYKLU A PROLIFERACI**

Darina Zášková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program lékařská chemie a biochemie

Hradec Králové

2008

Disertační práce byla provedena v rámci doktorského studia na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Disertantka: Mgr. Darina Zášková
Ústav lékařské biochemie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Školitelka: doc. MUDr. Marina Řezáčová, PhD.
přednostka Ústavu lékařské biochemie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: doc. RNDr. Zuzana Bílková, PhD.
Katedra biologických a biochemických věd
Fakulta chemicko–technologická
Univerzita Pardubice

doc. MUDr. Michal Hofer, PhD.
Laboratoř experimentální hematologie
Biofyzikální ústav, v.v.i.
Akademie věd České republiky, Brno

Stanovisko k disertační práci vypracoval Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

Obhajoba disertační práce se koná dne 20.11.2008 ve 14 hodin před komisí pro obhajoby disertačních prací ve studijním programu lékařská chemie a biochemie na lékařské fakultě v Hradci Králové.

S disertační prací je možno se seznámit na vědeckém oddělení Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové 1.

doc. RNDr. MUDr. Milan Mělka
Předseda komise pro obhajobu disertačních prací
ve studijním programu lékařská chemie a biochemie

1.	ZKRATKY	4
2.	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	5
3.	MATERIÁL A METODIKY	6
3.1.	BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	6
3.2.	FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ	6
3.2.1.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ</u>	6
3.2.2.	<u>KYSELINA ALL-TRANS RETINOVÁ</u>	6
3.3.	OZAŘOVÁNÍ	6
3.4.	IN VITRO ZKOUŠKA KLONOGENITY	7
3.5.	FLOW-CYTOTMETRICKÉ ANALÝZY	7
3.6.	IMUNOCYTOCHEMIE	8
3.7.	ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING	8
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	10
4.1.	MOLT-4	10
4.1.1.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ</u>	10
4.1.2.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM</u>	12
4.2.	HL-60	13
4.2.1.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ</u>	13
4.2.2.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM</u>	15
4.3.	U-937	17
4.3.1.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ</u>	17
4.3.2.	<u>KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S ATRA</u>	19
5.	LITERATURA	20
6.	ZÁVĚR	21
7.	SUMMARY	22
8.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	23
8.1.	PŮVODNÍ ČLÁNKY	23
8.2.	PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY	23
8.3.	ABSTRAKTA	23
8.4.	PŘEDNÁŠKY	24
8.5.	PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ	24

1. ZKRATKY

ATRA	<i>all-trans</i> -retinová kyselina
D ₀	dávka záření, kterou přežije 37% buněk
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouvláknový zlom DNA
EC ₅₀	efektivní koncentrace, která vyvolává 50% maximálního účinku
FCS	fetální telecí sérum
FS	forward scatter
HAT	histonacetyltransferasy
HDAC	histondeacetylasy
HDACi	inhibitor histondeacetylasy
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která vyvolá 50% maximální inhibice
NaB	butyrát sodný
PB	fenylbutyrát
PBS	fosfátový pufr
RA	retinová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
SS	side scatter
TSA	trichostatin A
VA	valproová kyselina

Pozn: Zkratky a názvy genů a proteinů, pro něž neexistuje český ekvivalent nejsou uvedeny.

2. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Maligní nádor je genetické onemocnění, u kterého dochází ke změnám jak v genomu, tak v epigenomu. Nejčastěji se vyskytující epigenetické změny v nádorových buňkách jsou alterace v methylaci DNA a deacetylaci histonů, které mají za následek utlumení exprese genů. Na rozdíl od genetických aberací je možné epigenetické změny farmakologicky zvrátit a přispět k obnovení funkce postižených genů. Proto epigenetické alterace představují v současnosti jednu z nejvíce zkoumaných oblastí v klinickém a preklinickém výzkumu především leukemií, a jejich hlubší pochopení je nutné pro rozvoj nových strategií epigenetické terapie.

Jeden z potenciálních léků pro epigenetickou terapii představuje kyselina valproová. Ta je již téměř třicet let používána v praxi jako antiepileptikum s dobrou snášenlivostí, nás ale zajímaly její nedávno objevené antitumorózní vlastnosti, kterými se řadí mezi inhibitory histondeacetylasy.

Cílem naší práce bylo na molekulární úrovni přispět k objasnění účinků kyseliny valproové na leukemické buňky. Pracovali jsme s kyselinou valproovou samostatně nebo v kombinaci s ionizujícím zářením a diferenciacním agens (kyselinou *all-trans*-retinovou) u tří odlišných leukemických linií:

- MOLT-4 lidská T-lymfocytární leukemie s funkčním proteinem p53,
- HL-60 lidská promyelocytární leukemie bez funkčního proteinu p53,
- U-937 lidský histiocytární lymfom s různě exprimovaným fúzním genem PML/RAR.

Zajímalo nás, zda se antitumorózní působení kyseliny valproové projeví na nádorových buňkách v terapeutických koncentracích používaných při léčbě epilepsie, jakým způsobem je ovlivněna diferenciacce, proliferace, buněčný cyklus nádorových buněk a především jsme se zaměřili na aktivaci proteinů klíčových zejména pro zástavu buněčného cyklu, reparaci a spuštění apoptózy.

3. MATERIÁL A METODIKY

3.1. BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Všechny námi použité buněčné linie byly kultivovány v lscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR) s 10-20% obsahem FBS (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), glutaminem a antibiotiky (penicilin, streptomycin), v inkubátoru při 37 °C a kontrolované 5% CO₂ atmosféře. Kultura byla pasážována každý druhý až třetí den s konečným ředěním 2.10⁵ buněk/ml. Integritu buněčné membrány jsme určovali trypanovou modří. Použity byly buňky z maximálně dvacáté pasáže.

Buňky lidské T-lymfocytární leukemie MOLT-4 byly získány z American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA; buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 z Porton Down, Salisbury, GB a buňky lidského histiocytárního lymfomu U-937 byly získány a použity se souhlasem profesora P.G. Pelicchio z European Institute of Oncology, Milan. Kontrolní buňky U-937 bulk byly transfekovány pouze prázdným vektorem PSG-MtNEO, k buňkám U-937 PML/RAR jsme 24 hodin před experimentem přidali síran zinečnatý 50 mmol/l, protože gen je exprimován pouze v přítomnosti Zn²⁺.

3.2. FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ

3.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ

Exponenciálně rostoucí linie buněk byly suspendovány v koncentraci 2.10⁵/ml v kompletním médiu obsahujícím požadovanou koncentraci kyseliny valproové (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR; zásobní roztok 100 mmol/l v PBS). Buňky byly kultivovány po různé časové intervaly při 37 °C a 5% CO₂.

3.2.2. KYSELINA ALL-TRANS RETINOVÁ

Exponenciálně rostoucí linie buněk byly suspendovány v koncentraci 2.10⁵/ml v kompletním médiu obsahujícím požadovanou koncentraci ATRA (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR; zásobní roztok 1 mmol/l v ethanolu). Buňky byly kultivovány po různé časové intervaly při 37 °C a 5% CO₂.

3.3. OZAŘOVÁNÍ

Suspenze buněk (V=10 ml, koncentrace 2.10⁵ buněk/ml) byla ozářena při pokojové teplotě použitím ⁶⁰Co jako zdroje gama záření s dávkovým příkonem 0,66

Gy/min. Ihned po ozáření byly lahvičky přeneseny do inkubátoru a inkubovány při 37 °C. V určených intervalech byla odpovídající část suspenze odebrána a použita k analýze.

3.4. IN VITRO ZKOUŠKA KLONOGENITY

Pro hodnocení krátkodobého působení kyseliny valproové byly buňky 3 dny kultivovány v kompletním médiu s různou koncentrací VA, poté jsme je vyseli na 0,9% methylcelulózu v Iscově médiu se 30% obsahem fetálního telecího séra a 14 dní kultivovali. Pro hodnocení kontinuální expozice kyselině valproové byly buňky kultivovány přímo na 0,9% methylcelulóze v Iscově médiu se 30% obsahem fetálního telecího séra a s rostoucími koncentracemi VA. Všechny pokusy na polotekutých kulturách byly dělány dvakrát. Buňky HL-60 byly navíc stimulovány 10% kondicionovaným médiem z lidské linie buněk 5637 karcinomu močového měchýře a čtyřmi jednotkami erythropoetinu na 1 ml média. Kolonie (obsahující 40 a více buněk) byly počítány za 14 dní po inkubaci v 5% CO₂ a 5% O₂ při 37 °C.

Pro výpočet hodnoty D₀ bylo použito křivek přežití, které byly získány ozářením buněk stoupající dávkou záření v rozmezí 0,5-10 Gy. Pro výpočet hodnoty EC₅₀ bylo použito křivek přežití, které byly získány kultivací buněk se stoupající koncentrací kyseliny valproové v médiu. Byly provedeny dva nezávislé experimenty (vždy po dvou měření).

3.5. FLOW-CYTOMETRICKÉ ANALÝZY

Forward scatter (FS)/side scatter (SS) – analyzovali jsme buňky pro změny v intenzitě rozptylu světla FS (koreluje s buněčným objemem) a SS (koreluje se vznikem apoptotických tělísek) a porovnávali vůči kontrole. Flow cytometrickou analýzu jsme prováděli na Coulter Epics XL flow cytometru s 15mW argon-ion laserem s excitační schopností při 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL). Pro každý vzorek bylo sebráno minimálně 10 000 buněk. Získaná data byla analyzována za použití Epics XL Systém II softwaru (Coulter Electronic).

Analýza obsahu DNA a buněčného cyklu – 5.10⁵ buněk v buněčné suspenzi bylo dvakrát promyto fosfátovým pufrům a fixováno v 70% ethanolu. Po centrifugaci a odstranění ethanolu byly buňky promyty ledově chladným PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml citrát-fosfátového pufru a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Nakonec byly buňky barveny v 0,5 ml

Víndelova roztoku a podrobeny analýze na flow cytometru Coulter Epics XL (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk. Získané 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.

Analýza diferenciacie pomocí exprese CD11b – pro detekci buněčných povrchových markerů jsme použili protilátku proti lidskému CD11b konjugovanou s fykoerythrinem (Immunotech, Marseille, Francie).

Detekce apoptózy – pro detekci apoptózy jsme použili Apoptest-FITC kit (DakoCytomation, Brno, ČR) dle instrukcí výrobce. Během apoptózy dochází k expozici fosfatidylserinu na buněčném povrchu. Annexin V je fosfolipid vazebný protein, který se v přítomnosti vápenatých iontů váže selektivně a s vysokou afinitou na fosfatidylserin.

3.6. IMUNOCYTOCHEMIE

Buňky byly fixovány v paraformaldehydu, permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100/PBS a blokovány 7% inaktivovaným FCS + 2% BSA/PBS. Po inkubaci s primární (proti histonu H2AX fosforylovanému na serinu 139; Upstate) a sekundární protilátkou (oslí protilátka proti myším antigenům konjugovaná s isothiokyanátem fluoresceinu; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) jsme získali výsledky pomocí Leica DM RXA fluorescenčního mikroskopu vybaveného konfokální jednotkou (Yokogawa, Japonsko).

3.7. ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING

V požadovaných časových intervalech jsme připravili buněčné lyzáty pomocí pufru s obsahem oktyl- β -D-glukopyranosidu a o-vanadičnanu sodného. Obsah bílkoviny ve vzorku byl stanoven pomocí bicinchoninové kyseliny (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR).

Lyzáty obsahující stejné množství proteinu (30 μ g) byly denaturovány pomocí vzorkového pufru s obsahem SDS a β -merkptoethanolu a jednotlivé vzorky nasazeny do jamek polyakrylamidového gelu (5-15%). Po elektroforetickém rozdělení proteinů na základě odlišných molekulových hmotností byly proteiny přeneseny na polyvinylidenefluoridovou (PVDF) membránu (BioRad, USA). Vše jsme prováděli v zařízení MiniProtean III firmy BioRad.

Membránu jsme zablokovali v TRIS pufru s 5% obsahem mléka a inkubovali s primární protilátkou při 4 °C přes noc za mírného třepání (anti-acetylovaný histon H3,

anti-acetylovaný histon H4, anti- γ H2AX – Cell Signal; anti-p53, anti-fosforylovaný p53 na serinu 392 – Exbio; anti-lamin B – Calbiochem; anti-p21, anti- β -aktin – Sigma). Druhý den jsme blot promyli a poté hodinu inkubovali s patřičnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Dako, Dánsko). Signál jsme detekovali chemiluminiscenčním kitem (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Diagnostic, ČR) na modrocitlivých rentgenových filmech (Foma, ČR).

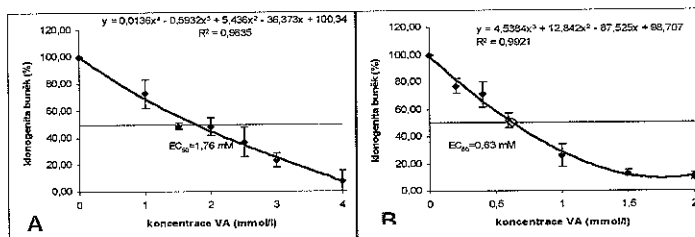
Optická hustota byla hodnocena pomocí KODAK Image Station 4000MM Digital Imaging System.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. MOLT-4

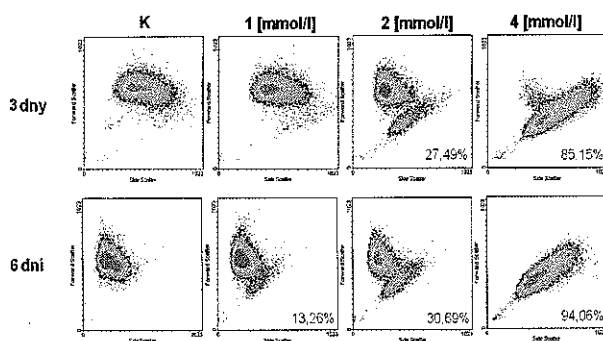
4.1.1. KYSELINA VALPROOVÁ

U linie MOLT-4 jsme nejprve pomocí zkoušky klonogenity stanovili hodnotu EC_{50} . Při dlouhodobé kultivaci (14 dní) dochází k poklesu hodnoty EC_{50} z 1,76 mmol/l (3-denní inkubace) na 0,63 mmol/l. (Obr. 1)



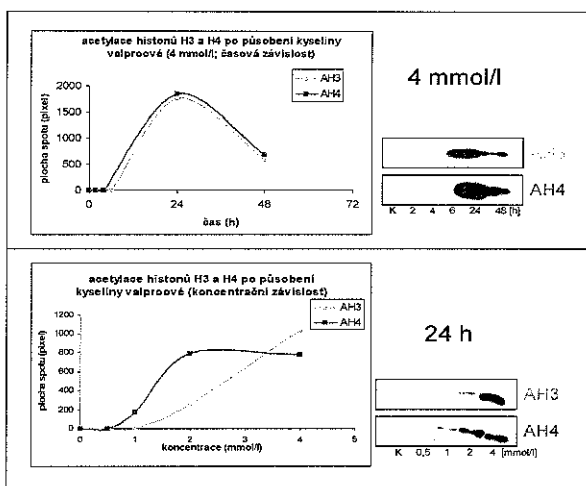
Obr. 1: A) Stanovení hodnoty EC_{50} pomocí zkoušky klonogenity u buněk MOLT-4 po 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou o různých koncentracích a následné hodnocení zachovaných klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty EC_{50} na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulóзовém gelu s různými koncentracemi kyseliny valproové. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

Pomocí flow-cytometrické (side/forward scatter) analýzy jsme stanovili procenta apoptotických buněk po působení různých koncentrací VA. Velikost buněk koreluje s intenzitou světla procházejícím v předozadním směru (forward scatter), zatímco intenzita v pravém úhlu (side scatter) koreluje s tvorbou apoptotických tělísek. Po třídní inkubaci buněk MOLT-4 se 4 mmol/l VA vstupuje 85 % buněk do apoptózy (oproti 27 % po 2 mmol/l VA) a po šestidenní inkubaci se 4 mmol/l VA je 95 % buněk apoptotických. V případě inkubace s 2 mmol/l VA je to pouze 31 %. (Obr. 2)



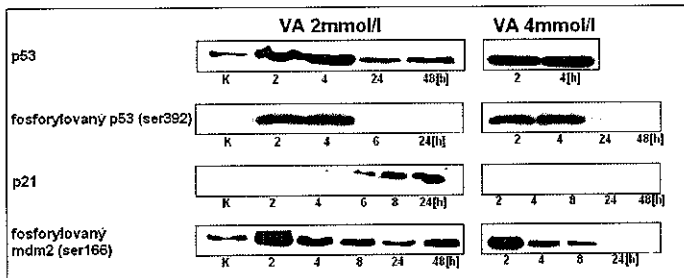
Obr. 2: Flow-cytometrická analýza buněk MOLT-4 po působení kyseliny valproové v koncentraci 1-4 mmol/l za 3 a 6 dní. Intenzita světelného rozptylu ve forward směru koreluje s velikostí buněk, intenzita v pravém úhlu-side scatter koreluje s jejich granula-ritou. Procenta apoptotických buněk jsou znázorněna červeně.

Primárním účinkem kyseliny valproové na molekulární úrovni je acetylace jaderných histonů H3 a H4 (Göttlicher et al, 2001). U buněk MOLT-4 vyvolává po 24 hodinové inkubaci v koncentraci 4 mmol/l acetylaci u obou těchto jaderných histonů H3 (na lysinu 9) a H4 (na lysinu 12). Histon H4 je k působení kyseliny valproové citlivější, k jeho acetylaci je dostačující již koncentrace 1 mmol/l. Histon H3 vyžaduje koncentraci vyšší, a to alespoň 2 mmol/l. (Obr. 3)



Obr. 3: Acetylace jaderných histonů H3 (na lysinu 9) a H4 (na lysinu 12). Časová závislost po působení kyseliny valproové o koncentraci 4 mmol/l a koncentrační závislost 24 hodin po začátku působení VA.

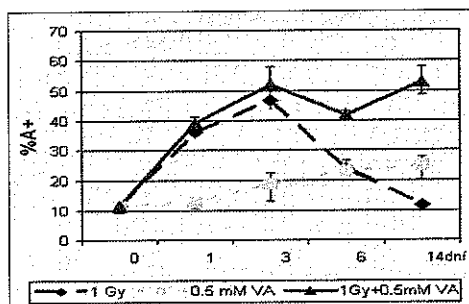
Buňky MOLT-4 mají funkční protein p53, k jehož indukci dochází v časných intervalech (maximální exprese za 2-4 hodiny) po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l. Souběžně dochází k fosforylaci tohoto proteinu na serinu 392. V časové návaznosti na protein p53 je aktivován protein p21, který vyvolává zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, a tím umožňuje reparaci poškození. Tuto aktivaci se nám podařilo zachytit pouze po působení 2 mmol/l kyseliny valproové v intervalu 6-24 hodin, koncentrace vyšší (4 mmol/l) už aktivaci nevyvolává. Souběžně s aktivací proteinu p53 dochází k fosforylaci jeho negativního regulátoru, proteinu mdm2 na serinu 166. (Obr. 4)



Obr.4: Aktivace a fosforylace proteinu p53, mdm2 a p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l.

4.1.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

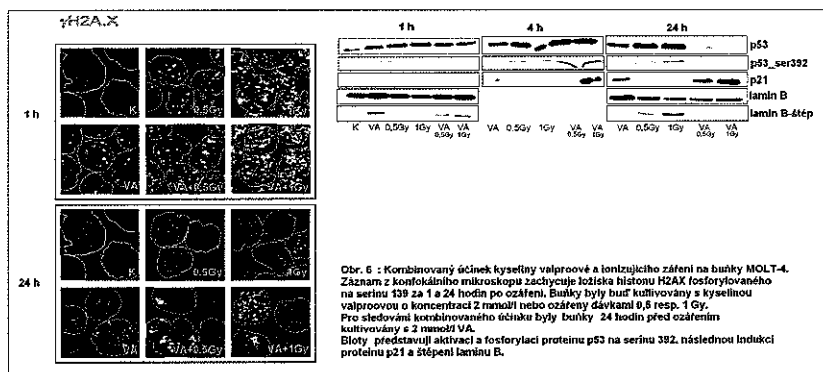
Samotná kyselina valproová o koncentraci 0,5 mmol/l vyvolává pozvolný nástup apoptózy, který ale přetrvává poměrně dlouhou dobu, až 14 dní po začátku kultivace, zatímco samostatné záření o dávce 1 Gy má naopak rychlý nástup i odeznění apoptózy. Při kombinaci obou nox dochází k synergizaci účinku, takže buňky rychle vstupují do apoptózy za současného delšího přetrvání účinku. (Obr. 5)



Obr. 5: Procenta apoptotických buněk (měřeno jako Annexin V pozitivní) po působení kyseliny valproové o koncentraci 0,5 mmol/l samostatně nebo v kombinaci s ionizujícím zářením o dávce 1 Gy.

Sledovali jsme, zda kyselina valproová zcitlivuje buňky vůči ionizujícímu záření. Buňky MOLT-4 jsme 24 hodin preinkubovali s VA o koncentraci 2 mmol/l a pak je ozářili dávkou 0,5 a 1 Gy. Ionizující záření vyvolává tvorbu ložisek γ H2AX hodinu po ozáření. S postupující reparací DSB dochází k poklesu počtu ložisek a 24 hodin po samotném ozáření dávkou 0,5 i 1 Gy je poškození téměř reparováno. V přítomnosti kyseliny valproové je reparace DSB zřejmě snížena, neboť 24 hodin po ozáření v přítomnosti VA přetrvávají v buňkách velká ložiska γ H2AX. Tyto výsledky jsou v souladu se studii jiných HDACi; inkubace buněk s MS-275, butyrátem sodným (NaB) a trichostatinem A (TSA) před ozářením vede ke zvýšené a prodloužené expresi radiací indukovaných γ H2AX ložisek (Karagiannis et El-Osta, 2006)

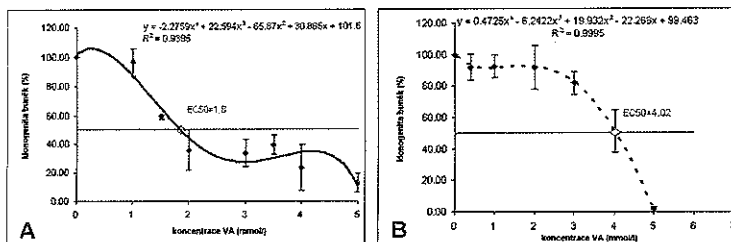
U proteinu p53 dochází k nárůstu exprese 4 hodiny po ozáření jak po kombinaci s dávkou 0,5, tak 1 Gy. Naopak u kombinace po 24 hodinové kultivaci protein p53 téměř není exprimovaný. Maximálnímu nárůstu exprese proteinu p53 odpovídá i jeho fosforylace na serinu 392, která je nejintenzivnější za 4 hodiny po kombinovaném působení kyseliny valproové a ionizujícího záření. V návaznosti na protein p53 dochází k indukci proteinu p21 (Obr. 6)



4.2. HL-60

4.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ

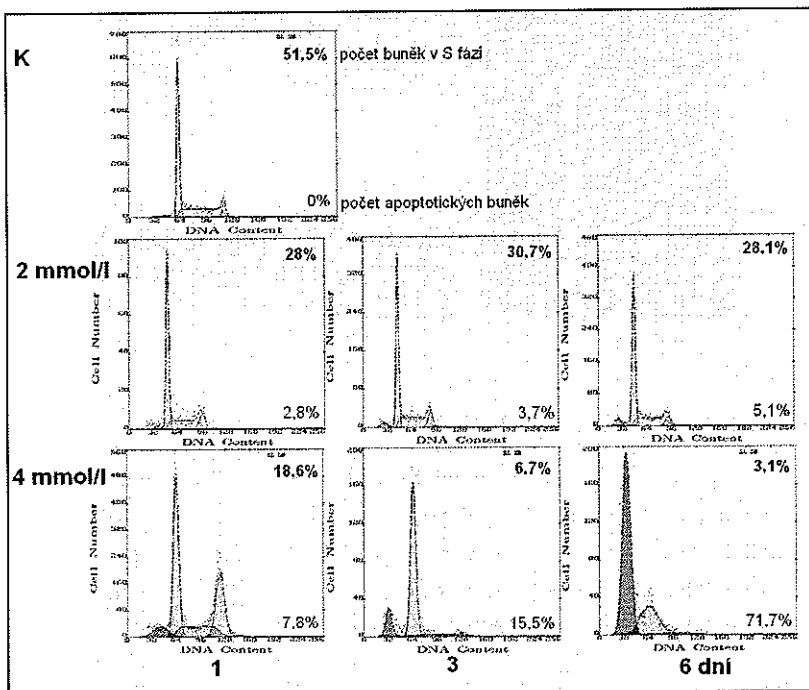
U linie HL-60 jsme nejprve stanovili zkouškou klonogenity hodnotu EC_{50} . Pro zachování klonogenních schopností musí být buňky HL-60 kultivovány v kondiciovaném médiu. Působení cytokinů pravděpodobně chrání buňky před apoptózou a hodnota EC_{50} po 14-denní inkubaci s kyselinou valproovou paradoxně stoupá oproti EC_{50} měřené po 3 dnech z 1,8 na 4,02 mmol/l. (Obr.6)



Obr.6: A) Stanovení hodnoty EC_{50} pomocí zkoušky klonogenity u buněk HL-60 po 3-denní preinkubaci s VA o různých koncentracích a následné hodnocení klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty EC_{50} na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulózovém gelu

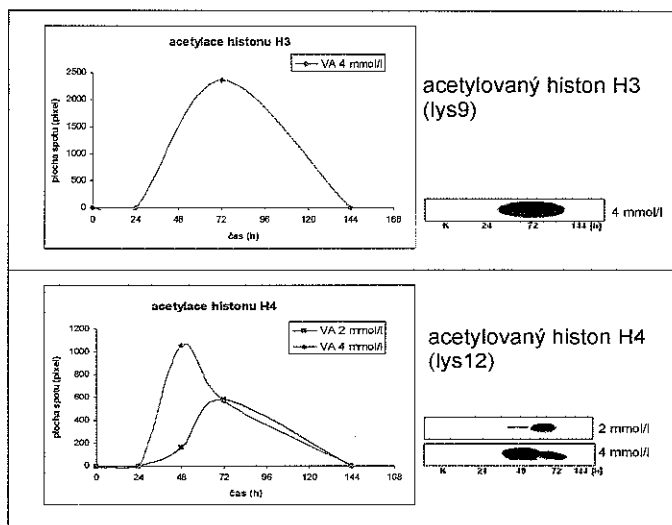
s různými koncentracemi kyseliny valproové v 10% kondiciovaném médiu. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

Při flow-cytometrické analýze jsme sledovali procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Procenta apoptotických buněk (stanovena na základě hodnocení sub-G1 peaku) po působení různých koncentrací kyseliny valproové v závislosti na čase jsou vyznačena červeně. Patrný je pokles počtu buněk v S fázi, který je vyvolaný zástavou buněčného cyklu v G1 fázi. (Obr. 7)



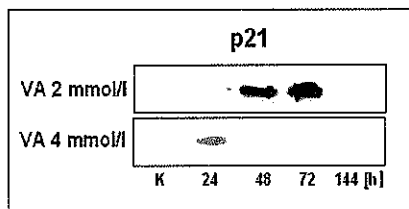
Obr. 7: Flow-cytometrická analýza buněčného cyklu u linie HL-60 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 1-6 dní. Procenta apoptotických buněk určena na základě sub-G1 peaku a označena červeně, procenta buněk v S fázi označena zeleně.

Za 72 hodin po začátku inkubace s kyselinou valproovou (4 mmol/l) dochází k acetylaci jaderného histonu H3 na lysinu 9. Histon H4 je stejně jako v případě buněk MOLT-4 k acetylaci citlivější, na lysinu 12 k ní dochází již za 48 hodin po začátku inkubace s kyselinou valproovou o koncentraci 2 mmol/l. (Obr.8)



Obr. 8: Acetylace jaderných histonů H3 (lys 9) a H4 (lys 12) u buněk HL-60 po působení kyseliny valproové o koncentraci 2 a 4 mmol/l v časovém intervalu 1-6 dní.

V různých nádorových buňkách, i bez funkčního proteinu p53, dochází při působení HDACi k nárůstu proteinu p21 (Richon et al, 2000; Gui et al, 2004; Fortunati et al, 2004). I u buněk HL-60, které jsou p53 negativní, dochází u nich k indukci proteinu p21. Tato indukce je p53 nezávislá a u buněk HL-60 probíhá jak po působení 2 tak 4 mmol/l koncentrace kyseliny valproové a obecně v pozdějších časových intervalech v porovnání s buňkami MOLT-4. (Obr. 9)



Obr. 9: Indukce proteinu p21 u buněk HL-60 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l (časová závislost).

4.2.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

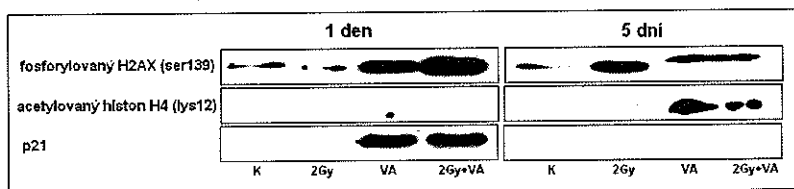
Stejně jako u buněk MOLT-4 jsme u buněk HL-60 kombinovali účinek kyseliny valproové v koncentraci 3 mmol/l s ionizujícím zářením o dávce 2 Gy. Kyselinu valproovou jsme přidávali do média po ozáření a následně buňky kultivovali 1 a 5 dní.

Den po ozáření dochází k výraznému zesílení fosforylace histonu H2AX na serinu 139 v přítomnosti VA v porovnání se samotnými noxami působícími odděleně.

Během apoptózy, ve fázi fragmentace DNA a chromatinové kondenzace, dochází také k fosforylaci H2AX, tentokrát působením DNA-dependentní protein kinasy (Mukherjee et al, 2006). U apoptotických buněk je tento enzym klíčový, zatímco ATM je pro tento děj postradatelná.

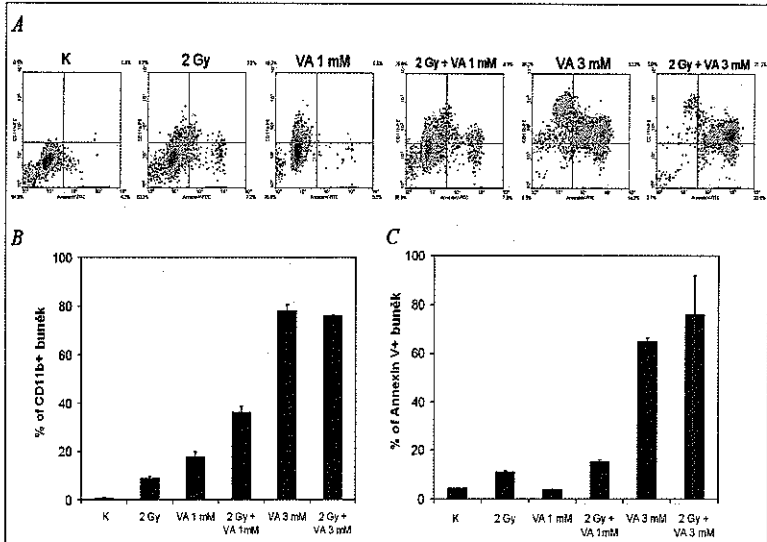
Ionizující záření nemá vliv na acetylaci jaderného histonu H4, nedochází ani k ovlivnění nebo zesílení účinku při kombinaci obou nox v porovnání se samotnou kyselinou valproovou. Acetylace vyvolaná VA o koncentraci 3 mmol/l přetrvává i pátý den inkubace.

Indukce proteinu p21 u buněk HL-60 je p53 nezávislá a je patrná za 24 hodin ve stejné míře po samotné kyselině valproové jako po kombinaci s ionizujícím zářením. Po 5-denní inkubaci s VA jsme již expresi proteinu p21 nezaznamenali. (Obr. 10)



Obr. 10: Změny v expresi proteinů H2AX, histonu H4 a p21 za 1 a 5 dní po působení samotné kyseliny valproové v koncentraci 3 mmol/l, po působení ionizujícího záření o dávce 2 Gy a pod vlivem kombinace obou nox.

Kyselina valproová v koncentraci 1 mmol/l vede k diferenciaci a zvýšené expresi CD11b (u 17,8 % buněk) bez indukce apoptózy, zatímco koncentrace 3 mmol/l zvyšuje procento CD11b pozitivních buněk na 78,3 a apoptóza je indukována u 65 % buněk. Tři dny po ozáření dávkou 2 Gy jsme pozorovali mírný nárůst CD11b pozitivních buněk (na 9 %) a stejně tak indukci apoptózy (11,3 % buněk). Nižší koncentrace kyseliny valproové v kombinaci s ionizujícím zářením vyvolávají především nárůst diferenciaci, tedy CD11b pozitivitu (36,3 %), účinek na indukci apoptózy byl pouze aditivní (15,4 %). Účinek vyšší koncentrace VA spolu se zářením byl odlišný. Diferenciaci byla porovnatelná s účinkem samotné kyseliny valproové, zatímco procento apoptotických buněk stoupl na 76,2. Flow-cytometrický záznam ukazuje, že dobře diferencované, CD11b pozitivní buňky, jsou živé, bez pozitivitu na annexin V. Jakmile jsou buňky annexin V pozitivní, exprese CD11b klesá dokud nedojde ke kompletní ztrátě tohoto diferenciačního markeru. (Obr. 11)

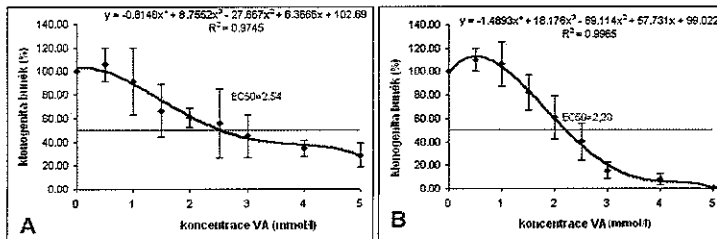


Obr. 11: Flow-cytometrická analýza změn v expresi antigenu CD11b a annexinu V u buněk HL-60, 3 dny po ozáření dávkou 2 Gy a inkubaci s kyselinou valproovou o koncentraci 1 a 3 mmol/l.

4.3. U-937

4.3.1. KYSELINA VALPROOVÁ

U linie U-937 jsme nejprve pomocí zkoušky klonogenity stanovili hodnotu EC_{50} . Při dlouhodobé kultivaci (14 dní) dochází k mírnému poklesu hodnoty EC_{50} z 2,54 mmol/l (3-denní inkubace) na 2,2 mmol/l. (Obr. 12)

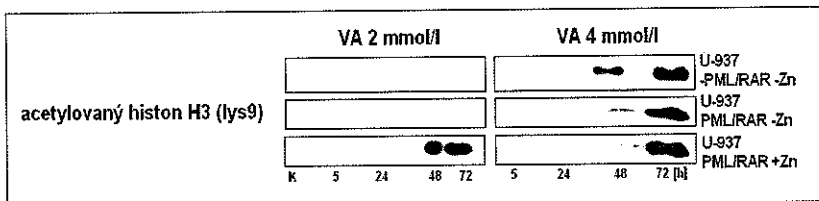


Obr.12: A) Stanovení hodnoty EC_{50} pomocí zkoušky klonogenity u buněk U-937 po 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou o různých koncentracích a následné hodnocení zachovaných klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty EC_{50} na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulóзовém gelu s různými koncentracemi kyseliny valproové. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

U buněk U-937 jsme pracovali se třemi varietami dané linie, přičemž pouze jedna exprimuje fúzní gen PML/RAR.

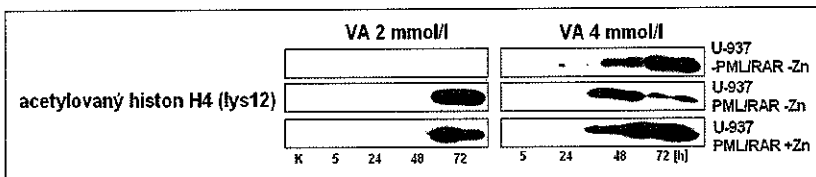
1. kontrolní buňky U-937 bulk transfekované prázdným vektorem bez vloženého genu PML/RAR,
2. buňky U-937 s vloženým genem PML/RAR, ale kultivované bez přítomnosti Zn^{2+} , který je nezbytný pro expresi genu,
3. buňky U-937 s vloženým genem PML/RAR kultivované v přítomnosti Zn^{2+} .

U všech tří variant dochází k acetylaci jaderného histonu H3 a to nejdříve po 8 hodinách působení VA o koncentraci 4 mmol/l. Pouze u buněk s vloženým PML/RAR genem a kultivovaných v prostředí Zn^{2+} dochází k acetylaci již při koncentraci 2 mmmol/l (Obr. 13)



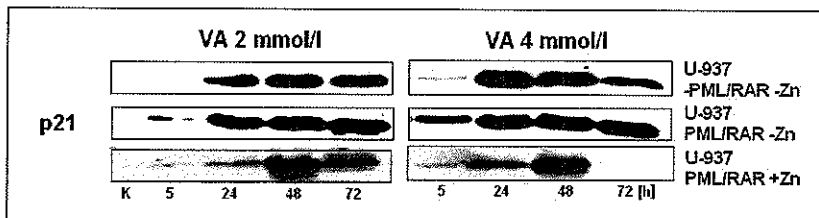
Obr. 13: Acetylace jaderného histonu H3 na lysinu 9 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti Zn^{2+}) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí Zn^{2+}).

Histon H4 je opět citlivější k působení kyseliny valproové, k jeho acetylaci dochází již po působení 2 mmol/l kyseliny valproové a to po 72 hodinách (s výjimkou buněk U-937 bez vloženého genu PML/RAR). (Obr. 14)



Obr. 14: Acetylace jaderného histonu H4 na lysinu po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti Zn^{2+}) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí Zn^{2+}).

Buňky U-937 jsou stejně jako buňky HL-60 p53 negativní, proto u nich dochází k expresi proteinu p21 způsobem p53 nezávislým, a to velmi výrazně již 5 hodin po začátku inkubace s 2 i 4 mmol/l kyselinou valproovou, opět vyjma buněk U-937 bez vloženého genu PML/RAR. (Obr.15)

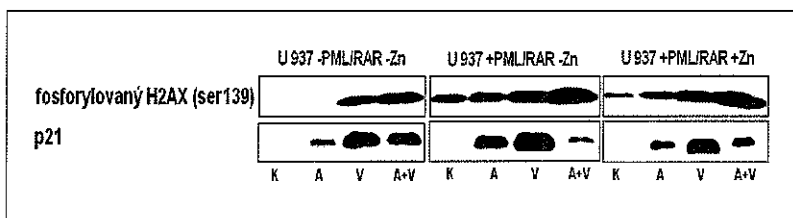


Obr. 15: Aktivace proteinu p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti Zn^{2+}) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí Zn^{2+}).

4.3.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S ATRA

U buněk U-937 kombinovali jsme účinek kyseliny valproové v koncentraci 2 mmol/l s diferenciačním agens kyselinou *all-trans*-retinovou v koncentraci 1 μ mol/l. Bylo prokázáno, že souběžné podávání terapeutických dávek ATRA a HDACi má synergický protinádorový účinek (Epping et al, 2007).

V případě histonu H2AX dochází 72 hodin po začátku kultivace k výraznému zesílení fosforylace na serinu 139 při použití kombinace obou kyselin oproti působení jednotlivých nox samostatně. Překvapivě, k aktivaci proteinu p21 dochází po působení této kombinace méně nežli po působení samotné kyseliny valproové. (Obr. 16) Stejný trend pozorovali u stromálních buněk endometria Wu et al., kdy souběžné podání VA a ATRA nemělo synergický vliv a nezvyšovalo expresi p21 v porovnání se samostatným působením jednotlivých nox (Wu et Guo, 2008).



Obr. 16: Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 a aktivace proteinu p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 mmol/l samostatně nebo v kombinaci s kyselinou *all-trans*-retinovou v koncentraci 1 μ mol/l v intervalu 72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti Zn^{2+}) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí Zn^{2+}).

5. LITERATURA

- Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R: A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**;104(45):17777-82
- Fortunati N, Bertino S, Costantino L, Bosco O, Vercellinato I, Catalano MG, Boccuzzi G: Valproic acid is a selective antiproliferative agent in estrogen-sensitive breast cancer cells. *Cancer Lett* **2008**;259(2):156-64
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **2001**;20(24):6969-78
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA: Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101(5):1241-6
- Karagiannis TC, El-Osta A: Modulation of cellular radiation responses by histone deacetylase inhibitors. *Oncogene* **2006**;25(28):3885-93
- Kuendgen A, Lübbert M: Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* **2008** Epub ahead of print
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* **2006**;5(5):575-90
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA: Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**;97(18):10014-9
- Wu Y, Guo SW: Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2008**;137(2):198-203

6. ZÁVĚR

Cílem naší práce bylo na molekulární úrovni přispět k objasnění účinků kyseliny valproové na tři odlišné leukemické linie. Pomocí různých molekulárně biologických metod jsme prokázali, že kyselina valproová způsobuje u všech uvedených linií

- inhibici proliferace,
- zástavu buněčného cyklu spojenou s indukcí proteinu p21 a následně poklesem počtu buněk ve fázi S buněčného cyklu,
- indukci diferenciaci u buněk HL-60,
- indukci apoptózy.

Primárním účinkem VA je acetylace jaderných histonů H3 a H4, překvapivě této acetylaci předchází aktivace nehistonových proteinů, které mají zásadní roli v regulaci buněčných pochodů a rozhodující význam pro indukci reparace poškození DNA, ovlivnění buněčného cyklu a indukci apoptózy. Kyselina valproová se jeví jako vhodné agens pro kombinační terapie, my jsme prokázali její synergický účinek s ionizujícím zářením u linií MOLT-4 a HL-60, kdy dochází ke zvýšené a prodloužené indukci apoptózy oproti samostatně působícím noxám. Na linii U-937 jsme sledovali kombinovaný účinek VA a diferenciačního agens kyseliny *all-trans*-retinové, který je spojený se zvýšenou fosforylací histonu H2AX, zatímco k indukci proteinu p21 nedochází.

Epigenetické změny v dnešní době představují intenzivně studovanou oblast ve výzkumu nových terapeutických přístupů v léčbě leukemií. Na rozdíl od genetických alterací je možné jejich farmakologické ovlivnění. Obrovskou výhodou kyseliny valproové oproti ostatním sloučeninám je, že je již dlouhou dobu používaná v praxi, může být podávána perorálně, má dobrou snášenlivost a mírné nežádoucí účinky. Proto představuje se svými vlastnostmi inhibitora histondeacetylasy slibnou sloučeninu pro terapii především leukemických, ale i solidních nádorových onemocnění.

7. SUMMARY

The aim of our work was to contribute to evaluation of effects of valproic acid in three different leukaemia cells lines (MOLT-4, HL-60 and U-937) at molecular level. Using various methods of molecular biology we proved that valproic acid causes in all the three mentioned cell lines:

- inhibition of proliferation
- arrest of cell cycle in G1 phase linked to p21 induction and followed by decrease of number of cells in the S phase of cell cycle
- induction of differentiation in HL-60 cells
- induction of apoptosis

Although valproic acid as a histone deacetylases inhibitor primarily causes acetylation of nuclear histones, this modification is preceded by activation of non-histone proteins, which play a key role in cell cycle regulation and are crucial for reparation of DNA damage, cell cycle interference and apoptosis induction. Valproic acid seems to be a convenient agent for combination therapy. We proved its synergistic effect with ionizing radiation in MOLT-4 and HL-60 cells in term of increased and prolonged apoptosis induction comparing to noxes acting alone. In U-937 cells, we observed combined effect of valproic acid and a differentiation agent *all-trans-retinoic acid*, which is linked to increased histone H2AX phosphorylation.

Epigenetic changes currently present one of the most exciting fields in the clinical and preclinical investigation of myeloid malignancies. In contrast to genetic alteration, the epigenetic one are amenable to pharmacological reversal. Valproic acid has an immense advantage as it is an established drug in epilepsy treatment, can be applied orally, has good tolerance and mild side effects. Those are reasons why valproic acid with its properties of inhibitor of histone deacetylases presents a promising compound in therapy of leukaemias as well as solid tumours.

8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

8.1. PŮVODNÍ ČLÁNKY

- Řezáčová M, Zášková D, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Antileukemic activity of the combination of ionizing radiation with valproic acid in promyelocytic leukemia cells HL-60. *Neoplasma* **2008**;6. IF 1,208
- 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. *Int J Radiat Biol* **2008**;84(6):523-30. IF 1,468
- 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 Biochim Pol.* **2007**;54(2):281-7. IF 1,261
- Vávrová J, Janovská S, Řezáčová M, Hernychová L, Tichá Z, Vokurková D, Zášková D, Lukášová E: Proteomic analysis of MOLT-4 cells treated by valproic acid. *Mol Cell Biochem* **2007**;303(1-2):53-61. IF 1,707
- 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**;1091:385-98. IF 1,731
- Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Zášková D: Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys* **2006**;25(1):65-79. IF 1,286

8.2. PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

- Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J: Význam kyseliny valproové v diferenciaci a indukci apoptózy nádorových buněk. *Lékařské zprávy LF UK Hradec Králové* **2005**;50(5-6):167-173

8.3. ABSTRAKTA

- Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Phosphorylation of p53 in MOLT-4 leukemia cells after treatment with valproic acid. *Journal of Applied Biomedicine*, roč. 3, č. Suppl. 1, 2005, s. 50-51

8.4. PŘEDNÁŠKY

- Molekulární mechanizmy aktivované inhibitory histondeacetylasy. Seminář KRAD FVZ UO, 12/2007
- Molekulární mechanizmy aktivované inhibitory histondeacetylasy a jejich radiosensibilizující efekt. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví; kurz Ionizující záření a chemoterapie na molekulární úrovni, 12/2006
- Inhibitory histondeacetylasy a jejich vliv na buněčný cyklus a indukci apoptózy u leukemických buněk. Plenární zasedání ČSL JEP, 6/2006
- Studium apoptózy u onkologických onemocnění: Vztah k buněčnému cyklu a proliferaci. Konference učitelů chemie a biochemie na lékařských fakultách, Vrútky 5/2006
- L'influence de l'acide valproïque sur le cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose au sein des lignées leucémiques. Cena za lékařství, Praha 5/2006

8.5. PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

- Záškodová D, Vávrová J, Tichý A, Řezáčová M: Phosphorylation of p53 and its related proteins after combined treatment of MOLT-4 cells with valproic acid and ionizing radiation. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference Biochemistry of Cell Regulation. Athens, Greece 7/2008
- Záškodová D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Effect of valproic acid, a histone deacetylases inhibitor, on protein expression and apoptosis induction in human leukemia cells. The 15th Annual International Medical Students' Congress, Cairo, Egypt 02/2007
- Záškodová D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Vliv kyseliny valproové na buněčný cyklus a indukci apoptózy u leukemických buněk. Konference učitelů chemie a biochemie na lékařských fakultách, Vrútky, SR 5/2006
- Záškodová D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Upregulation and phosphorylation of p53 and its related proteins after treatment with valproic acid in MOLT-4 leukemia cells. Cell Signaling World, Luxemburg 01/2006
- Záškodová D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A: Phosphorylation of p53 in MOLT-4 leukemia cells after treatment with valproic acid. Conference Cells VI, České Budějovice 10/2005

