

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Kvantifikace genové exprese u Hep-2 a HL-60 buněk
po indukci apoptózy**

Dita Královcová

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program Lékařská biologie

Hradec Králové

2008

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové

Student: RNDr. Dita Královcová
Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové,
Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel: Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice, Štrossova 239, 530 03 Pardubice

Oponenti: prof. MUDr. Roman Janisch, DrSc.
Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5,
62500 Brno

doc. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.
Ústav mikrobiologie a imunologie, oddělení virologie, Fakulta veterinárního
lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 61242
Brno

Obhajoba se koná před komisí disertačních prací v doktorském studijním programu Lékařská biologie, v pondělí 15.12. 2008 od 10,30 hod v zasedací místnosti děkanátu.

Tato práce vznikla za podpory VZ MŠMT ČR (MSM0021627502).

S disertační prací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131)

prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská biologie

Obsah

2. Souhrn.....	4
3. Summary.....	5
4. Úvod do problematiky.....	6
5. Cíle disertační práce.....	6
6. Metodika.....	7
6.1 Buněčné linie.....	7
6.2 Cytostatikum.....	8
6.3 Kvantifikace genové exprese.....	8
6.4. Analýza dat.....	8
6.5 Statistické vyhodnocení.....	9
7. Výsledky.....	9
7.1 Ovlivnění buněčné linie Hep-2 etoposidem.....	9
7.2 Ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem.....	12
8. Diskuze.....	14
8.1 Indukce apoptózy.....	14
8.2 Kvantifikace exprese genu TP53.....	16
8.3 Kvantifikace exprese genů BCL2 a BAX.....	17
8.4 Kvantifikace exprese genu DFFB.....	20
9. Závěr.....	21
10. Použitá literatura.....	22
11. Přehled publikační činnosti autora.....	27

2. Souhrn

Apoptóza, nebo také programovaná buněčná smrt, je jeden ze základních fyziologických procesů a jsou pro ni typické morfologické a biochemické změny odehrávající se uvnitř buněk. Ke změnám dochází i na úrovni genové exprese a to jak u genů podílejících se na indukci, tak i na průběhy apoptózy.

Cílem práce bylo indukovat apoptózu etoposidem u dvou modelových buněčných linií a kvantifikovat případné změny v expresi vybraných genů.

Etoposidem, inhibitorem topoizomerázy II, byly ovlivněné dvě stabilizované buněčné linie Hep-2 a HL-60 po dobu 0 hod, 6 hod a 12 hod. Případné změny v genové expresi genů TP53, BCL2, BAX a DFFB byly měřeny metodou kvantitativní real-time RT-PCR.

Po analýze genové exprese bylo zjištěno, že u Hep-2 buněk exprese genu TP53 signifikantně vzrostla po 6 hod ovlivnění ve srovnání s kontrolou, po 12 hod se exprese snížila, stále však byla statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny. U buněčné linie HL-60 nedochází k přepisu tohoto genu.

Kvantifikace exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 ukázala, že jak po 6 hod tak po 12 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese tohoto genu. Naopak exprese genu BAX zůstala beze změny. U HL-60 buněk došlo ke statisticky významnému poklesu exprese BCL2 po 6 hod ve srovnání s kontrolní skupinou, po 12 hod došlo ke zvýšení exprese ve srovnání jak se skupinou ovlivněnou 6 hod, tak s kontrolou. U genu BAX došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění, po 12 hod toto zvýšení bylo statisticky významné jen v porovnání s kontrolou.

Analýza exprese genu DFFB u Hep-2 buněk ukázala, že došlo k mírnému nárůstu exprese po 6 hod, ne však statisticky významnému. Po 12 hod exprese tohoto genu klesla v porovnání s kontrolou i se skupinou ovlivněnou 6 hod. U buněčné linie HL-60 nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

Kvantitativní analýza genové exprese po ovlivnění etoposidem ukázala, že zejména exprese genů BCL2 a BAX se buněčných linií Hep-2 a HL-60 značně liší. Jedná se zřejmě o různé reakce těchto nádorových buněk na působení etoposidu.

3. Summary

Apoptosis is a complex, strictly regulated physiological process which is characterized by several molecular and biochemical features such as upregulation of proapoptotic genes, activation of specific enzymes, cell contraction and rounding, formation of spikes and blebs, DNA fragmentation and cell fragmentation into apoptotic bodies.

The aim of this work was to investigate changes in expression of apoptosis related genes in cells of two cell lines after treatment with etoposide.

To find out about changes in genes expression of apoptosis-related genes, two stabilized cell lines Hep-2 and HL-60 were treated with etoposide, a topoisomerase II inhibitor, during 0 h, 6 h or 12 h. The changes in genes expression of TP53, BCL2, BAX and DFFB were measured by quantitative real-time RT-PCR.

In Hep-2 cells, the relative expression level of TP53 gene was significantly higher after 6 h of treatment than the untreated control. Expression of TP53 was significantly higher also after 12 h of treatment compares to control, but lower than the group of cells treated 6 h. HL-60 is the TP53-negative cell line.

In Hep-2 cells, the relative expression level of BCL2 gene was significantly higher after 6 h of treatment than the untreated control. The relative expression level of BCL2 was significantly higher also after 12 h of treatment and the expression level also significantly increased between 6 h and 12 h of treatment with etoposide. Whereas, the relative expression level of BAX did not significantly change neither after 6 h nor 12 h of treatment with etoposide.

In HL-60 cells, the relative expression level of BCL2 gene was significantly lower after 6 h of treatment than the untreated control, but the expression level was significantly higher after 12 h of treatment compared to untreated control. The significant distinction was also between 6 h and 12 h of treatment with etoposide. The relative expression level of BAX gene was significantly higher after 6 h and 12 h of treatment with etoposide compare to untreated control.

In Hep-2 cells the expression level of DFFB was significantly lower after 12 h of treatment compares to the group of cells treated 6 h. In HL-60 cells the expression level of DFFB did not change.

Quantitative analysis of these genes shows the different expression levels especially of BCL2 and BAX genes in Hep-2 and HL-60 cells. It can indicate the different response of Hep-2 and HL-60 cells to etoposide treatment.

4. Úvod do problematiky

Apoptóza, nebo také programovaná buněčná smrt, je dynamický proces, během kterého buňky umírají jako odpověď na různé druhy podnětů. Je nezbytná pro udržení integrity mnohobuněčných organismů i pro zdárný průběh embryogeneze. Apoptóza je kontrolovaný děj, pro který jsou charakteristické morfologické a biochemické změny odehrávající se uvnitř buněk. Mezi morfologické projevy patří kondenzace a fragmentace jádra, ztráta objemu cytoplazmy a tvorba tzv. apoptotických tělísek, která jsou pohlcena fagocytujícími buňkami. V rané fázi apoptózy je aktivována rodina enzymů zvané kaspázy, které degradují další strukturní proteiny v buňce, nebo aktivují další enzymy jako např. DNázy.

K indukci apoptózy může dojít více způsoby, jedním z nich je indukce pomocí vnitřních signálů, tzv. mitochondriální cesta, která se uplatňuje například při poškození DNA. Zde hraje důležitou roli protein TP53, který schopen buď zastavit buněčný cyklus, nebo indukovat apoptózu. Při spouštění apoptózy hraje klíčovou roli také rodina BCL2 proteinů. Jejich vzájemný poměr a interakce rozhodují o tom jestli buňka do apoptózy vstoupí. Jedním z hlavních morfologických znaků apoptózy je pak fragmentace DNA, za kterou zodpovídají endonukleázy. Jedním z významných zástupců této skupiny, který způsobuje internukleozomální fragmentaci DNA je enzym DFFB.

Působením xenobiotik na buňky, případně nádorové buněčné linie, lze sledovat nejen jejich toxický účinek, ale i jejich schopnost indukovat apoptózu. Jednou z takových látek je etoposid, který je jeden z nejčastěji používaných protinádorových léků. Jeho primárním cílem v buňkách je enzym topoizomérasa II. Důsledkem působení etoposidu na buňky je vytváření trvalých zlomů na řetězci DNA a zastavení buněčného cyklu v S nebo G2 fázi, případně indukce apoptózy.

Indukce apoptózy v buňkách, se kromě morfologických změn, projeví i změnou exprese genů podílejících se na apoptóze. Pro přesné vyjádření těchto změn v genové expresi se využívá metoda real-time RT-PCR.

5. Cíle disertační práce

Tematicky tato disertační práce navazuje na předchozí práce zpracovávané na Ústavu lékařské biologie a genetiky, kde byla testována schopnost etoposidu indukovat apoptózu u buněk různých nádorových buněčných linií. V těchto pracích (Červinka et al. 1999, Rudolf et al. 2000a, Červinka et al. 2004, Rudolf et Červinka 2005) byly sledovány hlavně

morfologické projevy apoptózy. Pro zjišťování změn v genové expresi buněk po ovlivnění etoposidem, pak byly vybrány dvě modelové buněčné linie, Hep-2 a HL-60.

Cílem této práce tedy bylo indukovat apoptózu etoposidem u dvou stabilizovaných buněčných linií, Hep-2 a HL-60 a metodou real-time RT-PCR kvantifikovat expresi vybraných genů, které se podílejí na indukci, nebo průběhu apoptózy.

1. Optimalizovat podmínky real-time RT-PCR reakce pro geny TP53, BCL2, BAX, DFFB a referenční gen PBGD.

2. Kvantifikovat a porovnat případné změny exprese těchto genů u nádorových buněčných linií Hep-2 a HL-60 po indukci apoptózy etoposidem.

6. Metodika

6.1 Buněčné linie

Buňky dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60 byly poskytnuty Ústavem lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové. Buňky zde byly kultivovány, ovlivněny etoposidem, sklizeny a uloženy v -70°C až do dalšího zpracování. Zdrojem buněčné linie Hep-2 a HL-60 byla Evropská Sběrka buněčných kultur (ECACC), která garantuje autenticitu buněk.

Hep-2

Stabilizovaná buněčná linie odvozená z epitelových buněk lidského karcinomu hrtanu, (ECACC, No.- 86030501, Porton Down). Buňky buněčné linie Hep-2 byly kultivovány v plastových lahvích v DMEM médiu s 10 % FCS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 $\mu\text{l/ml}$).

HL-60

Stabilizovaná buněčná linie odvozená z lidské akutní myeloidní leukémie (ECACC, No.- 85011431, Porton Down). Buňky této buněčné linie byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s 10 % FCS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 $\mu\text{l/ml}$).

Buňky byly kultivovány ve standardních laboratorních podmínkách v 37°C a 5 % CO_2 . Po 24 hodinách kultivace bylo standardní médium nahrazeno médiem s etoposidem o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$.

6.2 Cytostatikum

Etoposid byl naředěn z originálních ampulí do DMEM, nebo RPMI 1640 média na testovanou koncentraci 10 µg/ml.

6.3 Kvantifikace genové exprese

V experimentální části práce byly nejdříve optimalizovány podmínky pro real-time RT-PCR reakci pro jednotlivé geny. V další části práce byla indukována apoptóza pomocí etoposidu u dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60. Buňky byly rozdělené do tří skupin. První skupina byla kontrolní (n=3), tzn. buňky bez ovlivnění etoposidem. Ve druhé skupině byly buňky ovlivněné etoposidem 6 hod (n=3) a ve třetí skupině 12 hod (n=3). Z buněk byla izolována RNA a reverzní transkripční převedena na cDNA. Metodou real-time RT-PCR pak byly kvantifikovány změny v expresi genů TP53, BCL2, BAX a DFFB. Jako referenční gen byl použit gen PBGD. Každý vzorek byl při real-time RT-PCR reakci použit v duplexu a pro výpočet relativní exprese byla vybrána průměrná hodnota z těchto dvou Ct hodnot. Jako Ct hodnota se označuje množství amplifikačních cyklů, které jednotlivé vzorky potřebují, aby dosáhly tzv. thresholdu (tj. prahového fluorescenčního signálu). Tato Ct hodnota se pak využívá ke kvantifikaci rozdílu mezi jednotlivými vzorky.

6.4. Analýza dat

Kvantifikace genové exprese se vyhodnocuje jako relativní, obvykle se vtaňuje k expresi jiného genu. Tento gen se označuje jako referenční gen, nebo jako housekeeping gen. Expresí referenčního genu by v daných buňkách, tkáni, nebo buněčné linii měla být stálá.

V této práci byla relativní genová exprese vypočítána metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen 2001) a vzorec pro výpočet touto metodou byl převzat z této publikace.

Výpočet $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\text{poměr} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeep.}})_{\text{time}x} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeep.}})_{\text{time}0}$$

Ct_{target} – Ct hodnota u genu, jehož genová exprese byla studována

$Ct_{\text{housekeeping}}$ – Ct hodnota referenčního genu (housekeeping genu)

time 0 – čas 0, v tomto případě buňky, které nebyly ovlivněny

time x – čas x, ovlivněné buňky po nějaký časový úsek, tzn. v této práci po dobu 0 hod, 6 hod a 12 hod

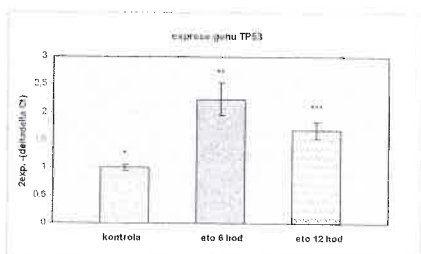
6.5 Statistické vyhodnocení

Data získaná po výpočtu metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ byla vyhodnocena testem ANOVA, v programu QC.Expert 3.0 (TriloByte, ČR). Jako statisticky významné bylo považováno $p < 0,05$. Pro následné zjištění statisticky významného rozdílu mezi jednotlivými skupinami byla použita Scheffého metoda.

7. Výsledky

7.1 Ovlivnění buněčné linie Hep-2 etoposidem

7.1.1 Expresce genu TP53



Graf 1 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnot u jednotlivých skupin. Mezi *, ** a *** byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

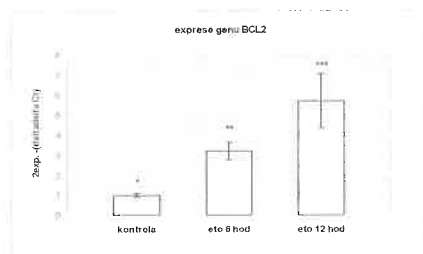
	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,94	2,1	1,85
	1,01	2,04	1,61
	1,05	2,57	1,57
průměrná hodnota	1	2,24	1,68

Tabulka 1 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu TP53. U buněk ovlivněných 12 hod byla exprese statisticky významně vyšší než u kontrolních buněk, v porovnání s buňkami ovlivněných 6 hod však došlo ke statisticky významnému snížení exprese tohoto genu.

7.1.2 Expresse genu BCL2



Graf 2 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hodnot u jednotlivých skupin. Mezi *, ** a *** byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

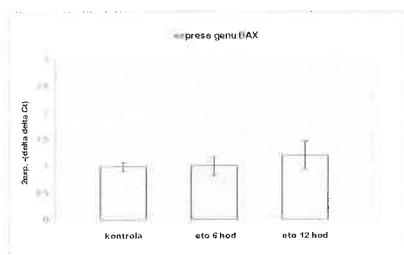
	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	0,9	3,71	6,59
	1,09	3,18	4,14
	1,03	2,83	6,5
průměrná hodnota	1,01	3,24	5,74

Tabulka 2 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BCL2. U buněk ovlivněných 12 hod byla také statisticky významně vyšší exprese ve srovnání s kontrolními buňkami, stejně tak byla vyšší exprese i ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

7.1.3 Expresse genu BAX



Graf 3 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hodnot u jednotlivých skupin.

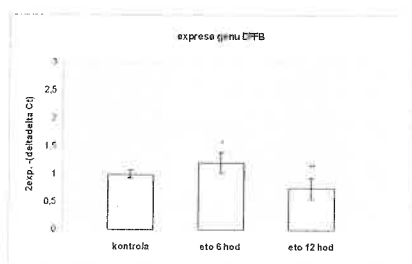
	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,94	1,13	1,49
	1,1	0,81	1,17
	0,97	1,1	0,96
průměrná hodnota	1	1,01	1,21

Tabulka 3 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod nedošlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BAX. K malému zvýšení exprese došlo u buněk ovlivněných 12 hod, nebylo to však zvýšení statisticky významné.

7.1.4 Exprese genu DFFB



Graf 4 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnot u jednotlivých skupin. Mezi * a ** byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,93	1	0,72
	1,06	1,27	0,97
	1,01	1,36	0,59
průměrná hodnota	1	1,21	0,76

Tabulka 4 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem 6 hod došlo ke zvýšení exprese genu DFFB v porovnání s kontrolní skupinou. Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. Po 12 hod ovlivnění došlo u této skupiny buněk ke snížení exprese genu ve srovnání jak s kontrolou, tak i s buňkami ovlivněnými 6 hod. Zde snížení exprese bylo statisticky významné jen při srovnání se skupinou ovlivněnou 6 hod.

7.2 Ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem

7.2.1 Expese genu TP53

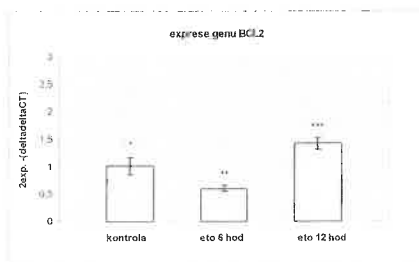
Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53, proto nemohla být provedena kvantifikace genové exprese.



Obr. 1 Expese genu TP53 u buněčné linie HL-60 a Hep-2

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)
HL60 – buněčná linie HL-60
Hep2 – buněčná linie Hep-2
NK – negativní kontrola

7.2.2 Expese genu BCL2



Graf 5 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnot u jednotlivých skupin. Mezi *, ** a *** byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

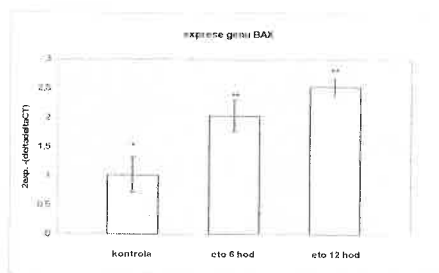
	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,87	0,66	1,49
	1,18	0,59	1,3
	0,97	0,55	1,47
průměrná hodnota	1,01	0,6	1,42

Tabulka 5 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem 6 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese genu BCL2 v porovnání s kontrolou. U buněk ovlivněných 12 hod byla statisticky významně vyšší exprese než u kontrolních buněk, stejně tak byla statisticky významně vyšší exprese i ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

7.2.3 Expresa genu BAX



Graf 6 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnot u jednotlivých skupin. Mezi * a ** byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,79	2,15	2,69
	0,91	2,23	2,45
	1,37	1,73	2,45
průměrná hodnota	1,02	2,04	2,53

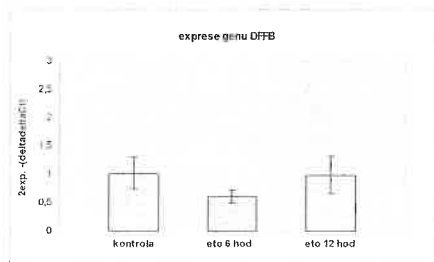
Tabulka 6 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BAX. Statisticky významně vyšší

byla exprese genu BAX i po 12 hod ovlivnění v porovnání s kontrolní skupinou, ne však ve srovnání s buňkami ovlivněnými 6 hod.

7.2.4 Expese genu DFFB



Graf 7 Grafické znázornění $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hodnot u jednotlivých skupin.

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,91	0,73	0,71
	1,34	0,58	0,89
	0,81	0,51	1,36
průměrná hodnota	1,02	0,61	0,99

Tabulka 7 Hodnoty vypočítané metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 h došlo k mírnému snížení exprese genu DFFB, tato změna však nebyla statisticky významná. U buněk ovlivněných 12 hod nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

8. Diskuze

8.1 Indukce apoptózy

U buněk buněčné linie Hep-2 a HL-60 byla indukována apoptóza pomocí etoposidu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly ovlivněny etoposidem v jedné skupině 6 hod a v druhé 12 hod. Třetí skupina sloužila jako kontrolní tzn. tyto buňky nebyly ovlivněny. Práce tak navazuje na předchozí výzkum na Ústavu lékařské biologie a genetiky, kde byla testována schopnost etoposidu indukovat apoptózu u buněk různých nádorových buněčných linií, včetně buněčných linií Hep-2 a HL-60 (Červinka et al. 1999, Rudolf et al. 2000a, Červinka et al.

2004, Rudolf et Červinka 2005). V těchto pracích však byly sledovány hlavně morfologické projevy apoptózy.

Etoposid

Etoposid je jeden z nejčastěji používaných protinádorových léků ve světě. Je používán k léčbě mnoha typů rakovin např. malobuněčného plicního karcinomu, sarkomů, leukémií a lymfomů. Etoposid je derivátem podophyllotoxinu, přírodní látky z rostliny *Podophyllum peltatum*. Primárním cílem v buňkách je pro etoposid topoizomeraza II. Tento nepostradatelný enzym odstraňuje zauzlení a překřížení v genomu vytvářením přechodných zlomů v dvouřetězcové DNA. Etoposid se váže a stabilizuje komplex tohoto enzymu a DNA (tzv. štěpící komplex). To vede k akumulaci těchto komplexů a vytváření trvalých zlomů v genetickém materiálu (Baldwin et Osheroff 2005).

Etoposid může indukovat apoptózu u různých buněčných linií (Jakubowicz-Gil et al. 2002, Higginbottom et al. 2007, Parihar et al. 2008) a to včetně buněčných linií Hep-2 a HL-60.

Hep-2

Indukci apoptózy u buněk buněčné linie Hep-2 etoposidem, o koncentraci 10 µg/ml, se ve své práci zabýval Červinka et al. (1999). U buněk bylo možné po 4 - 8 hod od ovlivnění pozorovat typické morfologické znaky apoptózy, jako je zakulacení buněk a tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány. Byla také zaznamenána změna v membránovém potenciálu mitochondrií a tvorba DNA ladderů, které vznikají při internukleozomálním štěpení DNA. Výše uvedená koncentrace etoposidu se ukázala jako dostačující k indukci apoptózy. Rudolf et al. (2000a) pozorovali zakulacení buněk a tvorbu puchýřků v rozmezí 2 - 6 hod od ovlivnění a po 8 hod od ovlivnění bylo možné pozorovat rytmické kontrakce označované jako membránový blebbing. Červinka et al. (2004) detekovali i aktivní enzym kaspázu 3. Rudolf et Červinka (2005) pozorovali tvorbu puchýřků (blebbing), které se objevovali od 4 - 14 hod od ovlivnění etoposidem, průměrná doba trvání byla 6 hod. Indukci apoptózy u Hep-2 buněk pomocí etoposidu o koncentraci 5 µl/ml a 50 µl/ml se také zabývali Duran et al. (2000). U buněk se objevily typické morfologické znaky apoptózy jako je zakulacení buněk a fragmentace jádra.

HL-60

Indukci apoptózy etoposidem, o koncentraci 10 µl/ml, u buněk buněčné linie HL-60 popisují Rudolf et Červinka (2005). Tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány se objevila již po 1 hod od ovlivnění, maximálně však po 4 hod, průměrně trvala 2 hod. Indukci apoptózy u HL-60 buněk etoposidem se zabývali i další autoři. Higginbottom et al. (2007)

indukovali apoptózu u HL-60 buněk etoposidem o koncentracích 1 $\mu\text{l/ml}$ a 10 $\mu\text{l/ml}$ a jako znak apoptózy uváděli naštěpení kaspázy 9. Kravtsov et al. (1999) použili k ovlivnění HL-60 buněk etoposid o koncentracích 1, 2.5, 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/L}$. Jako neúčinnější se při indukci apoptózy ukázala koncentrace etoposidu 10 $\mu\text{mol/L}$, při které bylo možné pozorovat i typické morfologické znaky jako je zmenšování buněk a tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány. Tento jev byl nejvíce pozorován mezi 4 – 8 hod po ovlivnění. Po 8 hod bylo také zjištěno nejvíce apoptotických buněk (61 %). Další z apoptotických znaků, které bylo možné pozorovat byla tvorba DNA ladderů, které bylo možné pozorovat po 4 hod až 16 hod od ovlivnění etoposidem. Eliseev et al (2003) popisují morfologické změny jako je tvorba puchýřků, kondenzace chromatinu a fragmentace DNA po ovlivnění HL-60 buněk 50 μM etoposidem. Zurn et al. (2007) indukovali apoptózu u HL-60 buněk etoposidem o 20 a 200 μM koncentracích a Bjørling-Poulsen et Issinger (2003) indukovali apoptózu inkubací HL-60 buněk 30 μM etoposidem po dobu 5 hod.

Z těchto poznatků vyplývá, že etoposid, o koncentraci 10 $\mu\text{l/ml}$, je vhodné cytostatikum pro indukci apoptózy u buněčných linií Hep-2 a HL-60. Buňky mají morfologické projevy typické pro apoptózu a cílem práce bylo proto zjistit, zda tyto morfologické projevy jsou doprovázené změnami v expresi genů, které se podílejí na vstupu buněk do apoptózy, nebo na jejím průběhu. Kvantitativní změna v expresi vybraných genů byla měřena metodou real-time RT-PCR.

8.2 Kvantifikace exprese genu TP53

Hep-2

Po analýze exprese genu TP53 u buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese ve srovnání se skupinou ovlivněnou 6 hod. Exprese genu TP53 však byla stále statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny.

Ke zvýšení exprese genu TP53 může vést několik důvodů. Působením etoposidu na buňky dochází k vytváření trvalých zlomů v řetězci DNA. Tento jev se projeví zejména při replikaci a buňky proto zastavují buněčný cyklus v G2 fázi. Protein TP53 je významný regulátor transkripce mnoha genů, z nichž jednu skupinu tvoří geny, které regulují buněčný cyklus v obou kontrolních bodech G1/S i v G2/M (Bunz et al. 1998). Při zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi je cílem regulace transkripce gen p21 (Harper et al. 1995). Pro vstup buňky do mitózy, tj. kontrolní bod G2/M, je nejdůležitější komplex cyklin B-Cdk1, kde TP53 slouží

jako regulátor transkripce cyklinu B (Innocente et al. 1999). Regulace transkripce genů řídících buněčný cyklus, pak může být jedním z vysvětlení zvýšení exprese genu TP53.

TP53 se však podílí i na regulaci transkripce genů, které řídí vstup buňky do apoptózy. Mezi transkripční cíle TP53 patří také rodina BCL2 genů. Mezi pozitivně regulované patří gen BAX, který je proapoptotický (Miyashita et Reed 1995), regulace transkripce může však být i negativní např. u genu BCL2 (Miyashita et al. 1994b). Zvýšení exprese genu TP53 tedy odpovídá indukci apoptózy u ovlivněných buněk.

Zvýšení exprese genu TP53 po indukci apoptózy potvrzují i další práce. Kvantifikaci exprese genu TP53 se zabývali např. Xing et al. (2008), kteří indukovali apoptózu u buněk karcinomu žaludku látkou LY2940002 (phosphoinositide-3-kinase inhibitor). Metodou real-time RT-PCR naměřili zvýšení exprese genu TP53. Výrazné zvýšení exprese genů TP53 a BAX a snížení exprese BCL2 u jaterních buněk krys po působení SO₂ naměřili Bai et Meng (2005). Malerba et al. (2005) indukovali apoptózu etoposidem a taxolem u HL-60 buněk a u buněk kostní dřeně. Metodou Western blot byla zjištěna zvýšená exprese proteinu TP53 a BCL-X u buněk kostní dřeně po působení etoposidu.

HL-60

Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53. Defektní funkce TP53 není mezi nádorovými buňkami nic neobvyklého, uvádí se že až 50 % primárních lidských nádorů nese mutaci v tomto genu (Hollstein et al. 1991). Indukci apoptózy u těchto buněk tedy gen TP53 nemůže zprostředkovat. Jednu z možností jiné indukce apoptózy popisují např. Higginbottom et al. (2007), kteří objevili několik nových alternativních míst pro fosforylaci u cyklin dependentní kinázy 1 (Cdk 1) asociované s cyklinem A. Zdá se, že tento proces je spojen s indukci apoptózy u HL-60 buněk po ovlivnění etoposidem.

8.3 Kvantifikace exprese genů BCL2 a BAX

Geny BCL2 a BAX patří do rodiny BCL2 genů, které hrají v apoptóze důležitou regulační roli. BCL2 patří do skupiny která inhibuje apoptózu. BAX je pro-apoptotický (Chao et Korsmeyer 1998). Protein BCL2 je asociován s membránami mitochondrií, zatímco BAX je ve své neaktivní fázi lokalizován v cytoplazmě, po aktivaci se přemísťuje do mitochondrií a umožní tak uvolnění cytochromu c (Wolter et al. 1997). Další charakteristikou BCL2 proteinů je jejich schopnost tvorby homo- i heterodimerů, kterou zajišťuje α -helix BH3 domény (Mínn et al. 1998). Na regulaci aktivity pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů existuje několik buněčných mechanismů. Anti-apoptotický protein BCL2 je schopen tvořit dimery s pro-apoptotickým proteinem BAX a neutralizovat tím jeho aktivitu. Jako

heterodimer je BAX neaktivní, ale jakmile může tvořit homodimery je schopen indukovat apoptózu (Gross et al. 1998). Dalším mechanismem je změna poměru pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů. Pokud je množství BCL2 proteinu vyšší, nebo stejné jako množství BAX, daná buňka je chráněna před apoptózou. Naopak pokud je množství BAX proteinu vyšší než BCL2 má buňka větší pravděpodobnost začít s apoptózou. Změna exprese tak může inhibovat, nebo naopak podpořit apoptózu (Adams et Cory 1998).

Při indukci apoptózy se proto na úrovni genové exprese předpokládá snížení exprese genu BCL2, nebo zvýšení exprese genu BAX. Tento předpoklad potvrzují i výsledky více autorů např. Brown et Dummore (2007) indukovali apoptózu u BRIN-BD 11 buněk a k jedné skupině buněk přidali leptin. Přidání leptinu zabránilo vzniku apoptózy, což korelovalo i se zvýšením exprese genu BCL2. Buňky buněčné linie odvozené od karcinomu jícnu (OE-19) byly ovlivněny simvastatinem. Metodou real-time RT-PCR bylo naměřeno snížení exprese genu BCL2 a zvýšení exprese genu BAX (Konturek et al. 2007). Buňky buněčných linií IMR90 a SV40 byly ovlivněny pomocí 5-FU po dobu 5 dní, což snížilo poměr exprese genů BCL2/BAX u IMR90 buněk (Suzuki et al. 1999). Působení SO₂ způsobilo výrazné zvýšení exprese genu BAX u jaterních buněk krys, naopak došlo ke snížení exprese genu BCL2 (Bai et Meng 2005). Pan et al. (2003) indukovali apoptózu u buněčné linie COLO 205 pomocí HDB. Exprese byla měřena metodou Western blot a po 8 hod bylo naměřeno zvýšení exprese proteinu BAX, protein BCL2 zůstal nezměněn. Singh et al. (2003) stanovili expresi proteinů BCL2 a BAX metodou Western blot u buněk vyvíjejícího se mozečku krys při hypothyroidních podmínkách. Exprese proteinu BCL2 byla snížena, exprese BAX zvýšena.

Hep-2

Po analýze genové exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo také ke statisticky významnému zvýšení exprese, a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou, tak se skupinou ovlivněnou 6 hod.

Kvantifikace genové exprese genu BAX ukázala, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod nedošlo ke statisticky významnému zvýšení exprese. K malému zvýšení exprese došlo u buněk ovlivněných po dobu 12 hod, nebylo to však zvýšení statisticky významné.

Zvýšení exprese genu BCL2 a exprese genu BAX beze změn neodpovídá původním předpokladům. Apoptóza je však komplexní děj a i když morfologické znaky mohou

ukazovat na probíhající apoptózu, exprese těchto dvou genů tomu nemusí odpovídat. Na indukci apoptózy se také mohou podílet jiné geny BCL2 rodiny, které v této práci nebyly analyzovány.

Literární údaje zabývající se indukcí apoptózy u Hep-2 buněk etoposidem, nebo expresí genů BCL2 a BAX nejsou časté. Balasubashini et al. (2006) se zmiňují o poklesu BCL2 proteinu po indukcí apoptózy u Hep-2 buněk pomocí jedu z ryby Perutýna ohnivého (*Pterios volitans*). Singh et al. (2006) indukovali apoptózu u Hep-2 buněk karboplatinou a 5-fluorouracilem (5-FU). Na úrovni proteinů pak zaznamenali pokles hladiny BCL2, protein BAX zůstal beze změny.

Podobné výsledky jako v této práci, ale u buněk buněčné linie PANC-1, zaznamenali např. Ikeguchi et al. (2002a), kteří se zabývali vlivem cisplatinu na expresi apoptotických genů u různých buněčných linií. U buněčné linie PANC-1 naměřili zvýšení exprese genu BCL2 po 12 hod a 24 hod, gen BAX zůstal beze změny. U buněčné linie MKN-45 se zvýšila exprese genu BAX po 24 hod, exprese genu BCL2 se nezměnila. U buněčné linie LoVo, došlo ke zvýšení exprese genu BAX po 12 hod a 24 hod, u genu BCL2 snížení exprese po 24 hod. Tyto výsledky ukazují, že každá buněčná linie může na indukci apoptózy jedním druhem cytostatika reagovat různou expresí genů.

HL-60

Po analýze genové exprese genu BCL2 u buněčné linie HL-60 po indukcí apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo naopak ke statisticky významnému zvýšení exprese a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou tak se skupinou ovlivněnou 6 hod.

Kvantifikace genové exprese genu BAX ukázala, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese. U buněk ovlivněných 12 hod byla statisticky významně vyšší exprese než u kontrolních buněk, nebyla však statisticky významně vyšší ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

Tyto výsledky odpovídají původním předpokladům o vývoji exprese těchto dvou genů po indukcí apoptózy. I výsledky ostatních autorů jsou podobné, ale i zde platí, že exprese těchto dvou genů se liší podle typu použitého cytostatika na indukci apoptózy.

Floros et al. (2006a) naměřili zvýšení exprese genu BAX po 4 hod od ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem. Exprese genu BCL2 se nezměnila. U stejné buněčné linie pak naměřili snížení exprese BCL2 po indukcí apoptózy topotecanem a methotrexatem (Floros et al. 2006b). Rózalski et al. (2005) naměřili snížení exprese genu BCL2 a zvýšení

exprese BAX po ovlivnění HL-60 buněk doxorubicinem a amifostinem. Floros et al. (2004) u buněk buněčné linie HL-60 indukovali apoptózu a zaznamenali pokles exprese genů BAX a BCL2 po ovlivnění karboplatinou, zatímco po ovlivnění doxorubicinem se exprese nezměnila. Po ovlivnění cisplatinou bylo zaznamenáno snižování exprese BCL2 (Floros et al. 2003).

8.4 Kvantifikace exprese genu DFFB

Jeden z nejdůležitějších enzymů způsobující internukleozomální fragmentaci je endonukleáza nazývaná DFF. V neaktivní formě je DFF heterodimer složený ze dvou 40 a 45 kDa proteinových podjednotek nazývaných DFFB a DFFA. DFFB je katalytická podjednotka, zatímco DFFA regulační podjednotka DFF. Protein DFFA navázaný na DFFB inhibuje nukleázovou aktivitu a po naštěpení DFFA kaspázou 3 je uvolněn aktivní enzym DFFB (Liu et al. 1997). DFFB uvolněný z komplexu s DFFA pak tvoří homooligomery, které tvoří enzymaticky aktivní formu nukleázy. Aktivní enzym pak štěpí chromatin mezi nukleozomy za vzniku mono- a oligonukleozomálních fragmentů (Liu et al. 1999).

Kvantifikací genové exprese DFFB se zabývali např. McDonald et al. (2005), kteří sledovali expresi genů DFFA a DFFB u buněk oligodendroglionu. Pouze u genu DFFB byla zjištěna snížená exprese ve srovnání s normálními mozkovými buňkami. Mahmoud-Ahmed et al. (2006) sledovali změny v expresi genů mozkových buněk myši po indukci apoptózy ozařováním. Pomocí real-time RT-PCR byla naměřena zvýšená exprese DFFB již 1 hod po ozaření.

Více prací je však zaměřeno na detekci proteinů DFFA a DFFB a ověřování jejich funkčnosti, či na expresi na úrovni proteinů. Iguchi et al. (2002) nepozorovali tvorbu typických ladderů z DNA po indukci apoptózy etoposidem a neocarzinostatinem u Molt-4 buněk. Při stanovení exprese proteinů DFFB a DFFA však nebyly zjištěny rozdíly v porovnání s ostatními liniemi. Luciano et al. (2002) indukovali apoptózu u T a B leukemických buněčných linií. U B leukemických buněčných linií nebyla pozorována DNA fragmentace. Při sledování exprese proteinů DFFA a DFFB bylo zjištěno, že u T buněk dochází k vysoké expresi DFFB v poměru k DFFA. U B buněk tomu bylo naopak tzn. vyšší exprese DFFA a velmi nízká DFFB. Park et al. (2005) indukovali apoptózu sulindakem u buněk buněčné linie HT-29. Prokázali translokaci AIF a endonukleázy G z mitochondrií do jádra a DFFB z cytosolu do jádra. Neobjevila se však oligonukleozomální fragmentace DNA, pouze štěpení DNA na velké fragmenty. Tyto výsledky ukazují, že translokace DFFB a endonukleázy G nestačí k oligonukleozomální fragmentaci DNA v této buněčné linii.

Hep-2

Kvantitativní analýzou genové exprese genu DFFB bylo zjištěno, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo k mírnému zvýšení exprese genu DFFB v porovnání s kontrolní skupinou. Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. U skupiny buněk ovlivněných 12 hod došlo ke snížení exprese genu ve srovnání s kontrolní skupinou i s buňkami ovlivněnými 6 hod. Statisticky významné bylo toto snížení pouze při srovnání se skupinou buněk ovlivněných 6 hod.

HL-60

Kvantitativní analýzou exprese genu DFFB bylo zjištěno, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo k mírnému snížení exprese genu DFFB, tato změna však nebyla statisticky významná. U skupiny buněk ovlivněných 12 hod nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že exprese genu DFFB, je v obou buněčných liniích poměrně stálá a nemění se ani po indukci apoptózy u těchto buněk. Expresí genů nic nevypovídá o funkčnosti proteinu, v publikacích je však popsána tvorba DNA ladderů jak u Hep-2 buněk (Červinka et al. 1999), tak i HL-60 buněk (Kravtsov et al. 1999, Bjorling-Poulsen et Issinger 2003, Rudolf et al. 2000b).

9. Závěr

U dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60 byla indukována apoptóza pomocí etoposidu. U každé buněčné linie byly tři skupiny buněk. První skupina kontrolní, tzn. buňky, které zůstaly bez ovlivnění. Druhou a třetí skupinu tvořily buňky ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod a 12 hod. Po ovlivnění byly buňky sklizeny, byla izolována RNA, reverzní transkripce převedena na cDNA a provedena kvantifikace genové exprese metodou real-time RT-PCR. Pro kvantifikaci genové exprese byly vybrány geny TP53, BCL2, BAX a DFFB. Jako referenční gen, ke kterému byla vztahována genová exprese těchto genů, byl použit gen PBGD.

Po kvantitativní analýze genové exprese genu TP53 bylo zjištěno, že u buněčné linie Hep-2 došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění ve srovnání s kontrolou, po 12 hod se exprese snížila, stále však byla statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny. Gen TP53 řídí jak zastavení buněčného cyklu, tak vstup buněk do apoptózy, zvýšení jeho exprese proto odpovídá indukci apoptózy u Hep-2 buněk. Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53, proto nemohla být provedena analýza.

Kvantifikace exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 ukázala, že jak po 6 hod tak po 12 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese tohoto genu. Naopak exprese genu BAX zůstala beze změny. U HL-60 buněk došlo ke statisticky významnému poklesu exprese BCL2 po 6 hod ve srovnání s kontrolní skupinou, po 12 hod došlo ke zvýšení exprese ve srovnání jak se skupinou ovlivněnou 6 hod, tak s kontrolou. U genu BAX došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění, po 12 hod toto zvýšení bylo statisticky významné jen v porovnání s kontrolou. Expresе genů BCL2 a BAX se u těchto dvou buněčných linií značně liší, indukcii apoptózy spíše odpovídá exprese genů u HL-60 buněk. U Hep-2 buněk však mohlo dojít k expresi i jiných proapoptotických genů, které v této práci nebyly analyzovány. Jedná se zřejmě také o různé reakce těchto nádorových buněk na působení etoposidu.

Analýza exprese genu DFFB u Hep-2 buněk ukázala, že došlo k mírnému nárůstu exprese po 6 hod, ne však statisticky významnému. Po 12 hod exprese tohoto genu klesla v porovnání s kontrolou i se skupinou ovlivněnou 6 hod. U buněčné linie HL-60 nedošlo ke změně exprese tohoto genu. Z těchto výsledků vyplývá, že exprese tohoto genu je v těchto buněčných liniích stálá a významně se nemění ani po indukcii apoptózy.

10. Použitá literatura

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

2. Bai J, Meng Z. Expression of apoptosis-related genes in livers from rats exposed to sulfur dioxide. *Toxicology*. 2005;216(2-3):253-60.

3. Balasubashini MS, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Rukkumani R, Menon VP. FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *J. Carcinog*. 2006;5:27.

4. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. 2005;5(4):363-72.

5. Bjorling-Poulsen M, Issinger OG. cDNA array analysis of alterations in gene expression in the promyelocytic leukemia cell line, HL-60, after apoptosis induction with etoposide. *Apoptosis*. 2003;8(4):377-88.

6. Brown JE, Dunmore SJ. Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2 : Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2007;23(6):497-502.

7. **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C et al.** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998;282(5393):1497-501.
8. **Cervinka M, Bereiter-Hahn J, Peychl J, Rudolf E, Cervinková Z.** The role of mitochondria in apoptosis induced in vitro. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999;18 Spec No:33-40.
9. **Cervinka M, Cerman J, Rudolf E.** Apoptosis in Hep2 cells treated with etoposide and colchicine. *Cancer Detect. Prev.* 2004;28(3):214-26.
10. **Duran N., Allahverdiyev AM, Cefiner S.** Flow Cytometric Analysis of the Effects of Methotrexate and Vepesid on the HEP-2 Cell Cycle. *Turk. J. Med. Sci.* 2001;31:187-192.
11. **Eliseev RA, Gunter KK, Gunter TE.** Bcl-2 prevents abnormal mitochondrial proliferation during etoposide-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 2003;289(2):275-81.
12. **Floros KV, Talieri M, Scorilas A.** Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes BCL2, FAS and BCL2L12 in leukemic HL-60 cells. *Biol. Chem.* 2006b;387(12):1629-33.
13. **Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A.** Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006a;1090:89-97.
14. **Floros KV, Thomadaki H, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A.** mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the BCL2-family, BCL2L12, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. *Biol. Chem.* 2004;385(11):1099-103.
15. **Floros KV, Thomadaki H, Lallas G, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A.** Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;1010:153-8.
16. **Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ.** Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 1998;17: 3878-85.
17. **Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K et al.** Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell.* 1995;6(4):387-400.
18. **Higginbottom K, Jahnke U, Newland AC, Cotter FE, Allen PD.** New alternative phosphorylation sites on the cyclin dependent kinase 1/cyclin a complex in p53-deficient human cells treated with etoposide: possible association with etoposide-induced apoptosis. *Apoptosis.* 2007;12(10):1847-55.
19. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253(5015):49-53.

20. **Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family: regulators of cell death. *J. Annu. Rev. Immunol* 1998;16: 395-419.
21. **Iguchi K, Hirano K, Ishida R.** Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells. *J. Biochem.* 2002r;131(3):469-75.
22. **Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N.** Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. *Oncol. Rep.* 2002a;9(5):1121-6.
23. **Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM.** p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(5):2147-52.
24. **Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A, Kandefcer-Szerszeń M.** The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002;40(1):31-5.
25. **Konturek PC, Burnat G, Hahn EG.** Inhibition of Barret's adenocarcinoma cell growth by simvastatin: involvement of COX-2 and apoptosis-related proteins. *J. Physiol. Pharmacol.* 2007;58 Suppl 3:141-8.
26. **Kravtsov VD, Daniel TO, Koury MJ.** Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1999;155(4):1327-39.
27. **Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997;89(2):175-84.
28. **Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X.** Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J. Biol. Chem.* 1999;274(20):13836-40.
29. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
30. **Luciano F, Ricci JE, Herrant M, Bertolotto C, Mari B, Cousin JL, Auberger P.** T and B leukemic cell lines exhibit different requirements for cell death: correlation between caspase activation, DFF40/DFF45 expression, DNA fragmentation and apoptosis in T cell lines but not in Burkitt's lymphoma. *Leukemia.* 2002;16(4):700-7.
31. **Mahmoud-Ahmed AS, Atkinson S, Wong CS.** Early gene expression profile in mouse brain after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 2006;165(2):142-54.

- 32. Malerba I, Gribaldo L, Diodovich C et al.** Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human bone marrow and HL-60 p53 null cells treated with anti-cancer drugs. *Toxicol. In Vitro.* 2005;19(4):523-32.
- 33. McDonald JM, Dunmire V, Taylor E, Sawaya R, Bruner J, Fuller GN, Aldape K, Zhang W.** Attenuated expression of DFFB is a hallmark of oligodendrogliomas with 1p-allelic loss. *Mol. Cancer.* 2005;4:35.
- 34. Minn AJ, Swain RE, Ma A, Thompson CB.** Recent progress on the regulation of apoptosis by Bcl-2 family members. *Adv. Immunol.* 1998;70: 245-79.
- 35. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al.** Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9(6):1799-805.
- 36. Miyashita T, Reed JC.** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
- 37. Pan MH, Huang MC, Wang YJ, Lin JK, Lin CH.** Induction of apoptosis by hydroxydibenzoylmethane through coordinative modulation of cyclin D3, Bcl-X(L), and Bax, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(14):3977-84.
- 38. Parihar A, Parihar MS, Ghafourifar P.** Significance of mitochondrial calcium and nitric oxide for apoptosis of human breast cancer cells induced by tamoxifen and etoposide. *Int. J. Mol. Med.* 2008;21(3):317-24.
- 39. Park YC, Jeong JH, Park KJ, Choi HJ, Park YM, Jeong BK, Higuchi Y, Yoo YH.** Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sci.* 2005;77(16):2059-70.
- 40. Rózsalski M, Mirowski M, Balcerczak E, Krajewska U, Mlynarski W, Wierzbicki R.** Induction of caspase 3 activity, bcl-2 bax and p65 gene expression modulation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by doxorubicin with amifostine. *Pharmacol. Rep.* 2005;57(3):360-6.
- 41. Rudolf E, Cervinka M.** Membrane blebbing in cancer cells treated with various apoptotic inducers. *Acta Medica.* 2005;48(1):29-34.
- 42. Rudolf E, Pechl J, Cervinka M.** The dynamics of the hexavalent chromium induced apoptotic patterns in vitro. *Acta Medica.* 2000b;43(3):83-9.
- 43. Rudolf E, Pechl J, Novak J, Cervinka M.** Apoptosis - when the cells begin to dance. *Front Biosci.* 2000a;5:F1-2.

44. Singh R, Upadhyay G, Kumar S, Kapoor A, Kumar A, Tiwari M, Godbole MM. Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *J. Endocrinol.* 2003;176(1):39-46.

45. Singh S, Chhipa RR, Vijayakumar MV, Bhat MK. DNA damaging drugs-induced down-regulation of Bcl-2 is essential for induction of apoptosis in high-risk HPV-positive HEp-2 and KB cells. *Cancer Lett.* 2006;236(2):213-21.

46. Suzuki K, Kazui T, Yoshida M, Uno T, Kobayashi T, Kimura T, Yoshida T, Sugimura H. Drug-induced apoptosis and p53, BCL-2 and BAX expression in breast cancer tissues in vivo and in fibroblast cells in vitro. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1999;29(7):323-31.

47. Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;139: 1281-92.

48. Xing CG, Zhu BS, Liu HH, Lin F, Yao HH, Liang ZQ, Qin ZH. LY294002 induces p53-dependent apoptosis of SGC7901 gastric cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008;29(4):489-98.

49. Zuryn A, Grzanka A, Stepień A, Grzanka D, Debski R, Smolinski D. Expression of cyclin A in human leukemia cell line HL-60 following treatment with doxorubicin and etoposide: the potential involvement of cyclin A in apoptosis. *Oncol. Rep.* 2007;17(5):1013-9.

11. Přehled publikační činnosti autora

Původní články:

Kralovcova D., Pejchalova M., Rudolf E., Cervinka M. Quantitative analysis of expression level of BCL2 and BAX genes in Hep-2 and HL-60 cells after treatment with Etoposide. Acta Medica. 2008. (v tisku)

Lyskova P., Vydralova M., **Kralovcova D.**, Mazurova J. Prevalence and characteristic of *Streptococcus canis* strains isolated from dog and cats. Acta Veterinaria Brno. 2007;76:619-625. IF 0.687

Gryndler M., Hrselová H. and **Strítěská D.** Effect of Soil Bacteria on Hyphal Growth of the Arbuscular Mycorrhizal fungus *G. claroideum*. Folia Microbiol. 2000;45(6),545–551. IF 0.989

Přehledové články:

Strítěská D. Tumor supresorový gen p53. Acta Medica Suppl. 2005;48(1),21-26.

Abstrakta:

Kralovcová D., Rudolf E., Pejchalová M. Kvantifikace genové exprese u nádorové buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy. In: Sborník abstraktů, Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40. výroční cytogenetická konference, Praha 2007.

Kralovcová D. Kvantifikace genové exprese u buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy. In: Sborník abstraktů, XX. Biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské spoločnosti pre biochemiu a molekulárnu biológiu. ISBN 80-969532-6-5, Piešťany, 2006.

Strítěská D., Hrdinová M. Detekce *Mycoplasma hominis* komerčními sety Mycoplasma DUO. In: Sborník abstraktů, XIV. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2005, Brno, 2005.

