

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: NMgr. Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Bc. Tomáš Groh

Indukce na caspasach nezávislé buněčné smrti inhibitory histondeacetylas
Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent cell death

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31.8.2011

Podpis:

Abstrakt

Neuroblastom je nejčastější extrakraniální solidní nádor u dětí. I přes velký pokrok moderní klinické medicíny, některé formy neuroblastomů jsou stále obtížně léčitelné. Tato práce se zabývá sledováním mechanismů působení inhibitorů histondeacetylasy (HDAC) na neuroblastomové buněčné linie. Inhibitory HDAC mohou přispět k regresi nádorových buněk ovlivněním struktury chromatinu a tím zvýšením exprese důležitých tumor supresorových genů. Tyto geny mimo jiné aktivují apoptotické dráhy, které mohou být i nezávislé na caspasach. Účinnost použitých inhibitorů HDAC jsme sledovali jak za standardních podmínek, tak i v hypoxii (1 % O₂). Neadekvátní zásobením nádorového ložiska kyslíkem je pro tumory charakteristické a může se podílet na chemorezistenci. U hypoxií indukované chemorezistence nádorových buněk se předpokládá vliv HIF-1 α . Některé inhibitory HDAC snižují v hypoxii množství HIF-1 α a tím aktivitu transkripčního faktoru HIF. První část předkládané práce se zabývá nalezením vhodného experimentálního uspořádání sledování indukce buněčné smrti u lidských neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3. Následuje studium vlivu kultivačních podmínek (standardních; hypoxických, 1 % O₂) na indukci buněčné smrti cisplatinou, kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným u těchto buněčných linií. V experimentech bylo zjištěno, že indukovaná buněčná smrt kyselinou valproovou může probíhat za daných podmínek nezávisle na aktivovaných caspasach. Nebylo zatím jednoznačně prokázáno, že takto indukovaná apoptóza probíhá díky translokaci AIF do buněčného jádra.

Abstract

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor that occurs during infancy. Despite the great progress has been made in contemporary clinic medicine some forms of neuroblastoma disease are still found very difficult to treat . This work focuses on the effects of histone deacetylase inhibitors (HDAC) in the neuroblastoma cell lines. It is known that HDAC inhibitors may contribute to recurrence of the tumor cells by affecting the chromatin structure and thus increase the expression of critical tumor suppressor genes. These genes activate apoptotic pathways that may even be independent of caspases. We observed the efficiency of used HDAC inhibitors as under standard conditions an in hypoxia (1 % O₂). Inadequate amount of oxygen supply is one of the characteristic features of tumors and it also may contribute to chemoresistance. With the hypoxia-induced chemoresistance of tumor cells, the influence of HIF-1 α is expected. Some HDAC inhibitors reduce the amount of HIF-1 α in hypoxia and thus HIF transcription factor activity. Thus, the first part of this study is concerned with the acquisition of suitable experimental arrangement for the monitoring of induction of cellular death in human neuroblastoma cell lines SK-N-AS and UKF-NB-3. Secondly, this paper provides the evaluation of the influence of culture conditions (standard; hypoxic, 1% O₂) on the induction of cell death by cisplatin, valproic acid, trichostatin A and sodium butyrate in these cell lines. In the following experiments it was found, that cellular death induced by valproic acid under the given conditions can occur independently of the activated caspases. However, it was not absolutely proved that this apoptosis is induced by AIF translocation to the cell nucleus.

(In Czech)

Poděkování:

Děkuji tímto RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a výborné vedení při vypracování diplomové práce. A dále pak také celému kolektivu pracovníků laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za cenné rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Obsah

Abstrakt	- 2 -
Abstract.....	- 3 -
Obsah.....	- 5 -
Seznam použitých zkratk a symbolů	- 7 -
1. Úvod	- 10 -
1.1. Nádorová onemocnění dětí.....	- 12 -
1.1.1. Neuroblastom.....	- 13 -
1.1.2. Léčba nádorových onemocnění	- 14 -
1.1.3. Vznik rezistence	- 16 -
1.1.4. Hypoxie solidních nádorů.....	- 17 -
1.1.5. Inhibitory HDAC	- 19 -
1.2. Buněčná smrt	- 21 -
1.2.1. Apoptóza.....	- 22 -
1.2.2. Autofagie	- 23 -
1.2.3. Nekróza.....	- 25 -
1.2.4. Buněčná smrt nezávislá na caspasach	- 25 -
2. Cíl diplomové práce.....	- 30 -
3. Materiál a metody.....	- 31 -
3.1. Použité chemikálie	- 31 -
3.2. Kultivace buněčných linií.....	- 33 -
3.3. Počítání buněk.....	- 33 -
3.4. Test klonogenicity	- 33 -
3.5. Stanovení koncentrace proteinů	- 33 -
3.6. Testování viability buněk	- 34 -
3.7. Detekce buněčné smrti	- 35 -
3.7.1. Vizualizace buněčných jader	- 35 -

3.7.2.	Kolorimetrické stanovení aktivity caspasy-3.....	- 35 -
3.7.3.	Annexin V-FITC	- 36 -
3.8.	Translokace AIF.....	- 36 -
3.9.	Izolace jaderné frakce.....	- 37 -
3.10.	Elektroforesa	- 38 -
3.11.	Western blot	- 38 -
4.	Výsledky	- 40 -
4.1.	Vliv kultivačních podmínek na růst buněk.....	- 41 -
4.2.	Cytotoxicita NaB a LiCl.....	- 42 -
4.3.	Detekce programované buněčné smrti	- 43 -
4.3.1.	Časová závislost indukce buněčné smrti kyselinou valproovou.....	- 44 -
4.3.2.	Fragmentace jader	- 46 -
4.3.1.	Indukce buněčné smrti cisplatinou, kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným	- 47 -
4.3.1.	Vliv pan-caspasového inhibitoru Z-VAD-fmk na aktivitu caspasy-3.....	- 49 -
4.3.2.	Detekce apoptózy po pan-caspasové inhibici	- 50 -
4.3.3.	Detekce translokace AIF do buněčného jádra	- 54 -
5.	Diskuse.....	- 58 -
6.	Závěr	- 65 -
	Seznam použité literatury	- 67 -

Seznam použitých zkratk a symbolů

5-FU	fluorouracil
AA mix	akrylamidový mix
AIF	apoptózu indukující faktor
ALK	„anaplastic lymphoma“ kinasa
Apaf-1	„apoptotic protease-activating“ faktor 1
APO-1	apolipoprotein A1
APS	amonium peroxodisulfát
atg 8	„autophagy-related“ protein 8
ATP	adenosintrifosfát
Bak	„Bcl-2 homologous antagonist/killer“
Bax	„Bcl-2 associated X“
Bcl-2	„B cell lymphoma-2“
Bid	„BH3 interacting domain death agonist“
BSA	sérový hovězí albumin
calpain	„calcium-activated neutral“ proteasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBP	CREB vázající protein
CD 30	„cluster of differentiation 30“
CD 40	„cluster of differentiation 40“
CD 95	„cluster of differentiation 95“
CDDP	cisplatina
c-FLIP	FLICE inhibiční protein
CNS	centrální nervová soustava
CREB	„cAMP response element-binding“ faktor
cyto c	cytochrom c
DEVD-pNA	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilin
DISC	„death-inducing“ signální komplex
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EFG-R	endoteliální růstový faktor - receptor
EGF	epidermální růstový faktor
eNOS	endoteliální NO syntasa

erb/B	„erythroblastic leukemia viral“ onkogenní homolog
FADD	„Fas-associating death“ doména
FasL	Fas ligand
FBS	fetální hovězí sérum
FGF1	fibroblastový růstový faktor 1
FITC	fluorescein isothiokyanát
FLICE	caspara-8
GADPH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
HAT	histonacetyltransferasa
HDAC	histondeacetylasa
HIF	„hypoxia-inducible“ faktor
Hoechst	2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid hydrát, bisBenzimid
HRP	křenová peroxidasa
HtrA2/Omi	„Omi/high temperature requirement A2“
I – typ	„intermediate“ prekurzor
IAP	„inhibitors of apoptosis“ protein
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk
IMDM	„Iscove's modified Dulbecco's“ médium
INSS	„International Neuroblastoma Staging System“
LC3	„microtubule-associated“ protein 1 lehký řetězec 3
LiCl	chlorid litný
MDR1	„multidrug resistance 1“ gen
MRP	„multidrug-resistance-associated“ protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid
N – typ	„neuroblastic“ neuroendokrinní prekurzor
NaB	butyrát sodný
NADH	nikotinamid adenindinukleotid
N-myc	„myelocytomatosis viral related, neuroblastoma derived“ gen
NSCLC	buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic
PARP	poly (ADP-ribosa) polymerasa
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H ⁺ iontů

PHD	„prolyl hydroxylase“ doména
PI	propidium jodid
pRb	retinoblastomový protein
pVHL	„von Hippel – Lindau“ tumor supresorový protein
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	„reactive oxygen species“
S – typ	„Schwannian“ melanoblastický prekurzor
SDS	dodecylsulfát sodný
Smac/DIABLO	„second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI“
tBid	„transduced“ Bid
TEMED	1,2-bis (dimethylamino) ethan
TGF α	transformující růstový faktor alfa
TGF β	transformující růstový faktor β
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRADD	TNF receptor „type 1-associated death domain“
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing“ ligand
Tris	1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan
TSA	trichostatin A
TUNEL	terminální deoxynukleotidyl transferasa dUTP „nick end labeling“
TWEEN 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
UTP	uridintrifosfát
VEGF	endoteliální růstový faktor
VPA	kyselina valproová
Z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (O-methyl)-fluoromethylketon

1. Úvod

Nádorová onemocnění patří v současné době k nejzávažnějším problémům klinické medicíny. Každý třetí obyvatel České republiky onemocní a každý čtvrtý v důsledku nádorového onemocnění umírá [1]. Významnými faktory, které se podílejí na vyšší incidenci nádorových onemocnění jsou současný životní styl (kouření, konzumace alkoholu, výživa - nadbytek kalorií a tuků, nedostatek vlákniny, obezita) a prodlužující se délka života lidí. Nádor, tumor, neoplazma či novotvar je abnormální tkáň, tvořená buňkami, se schopností autonomního růstu a neomezené proliferace. Přes značnou heterogenitu nádorových onemocnění byl identifikován poměrně malý počet molekulárních, biochemických a buněčných změn, které jsou společné pro většinu nádorových onemocnění. Jedná se o soběstačnost v růstových signálech, necitlivost k antiproliferačním signálům, rezistenci k apoptóze, neomezený replikační potenciál, angiogenezi, invazivitu a metastazování.

Aby se z normální buňky stala buňka nádorová, je potřeba souhry postupně získávaných genetických chyb najednou. Proces onkogenní transformace (kancerogeneze) je několikastupňový, zahrnuje fáze iniciace, promoce a progresu. Předpokládá se, že k rozvoji maligního fenotypu u lidí je nezbytná kumulace čtyř až osmi různých genetických či epigenetických změn [2].

Mezi faktory, které poškozují deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a jsou příčinou vzniku nádorů nebo zvyšují riziko jejich vzniku, patří fyzikální vlivy (mechanické faktory, ultrafialové záření, rentgenové a ionizující záření) a chemické kancerogeny. Ty mohou být genotoxické (primárně poškozující DNA; sekundárně poškozující DNA - po následné biotransformaci) či epigenetické, které s DNA nereagují přímo. Existují i biologická infekční agens, která se podílí na transformaci v nádorové buňky. Jsou to například onkoviry jako lidský papilomavirus, virus hepatitidy B či virus Epstein – Barrové [2]. Onkoviry mohou narušit sekvenci některého buněčného onkogenu, zvýšit telomerasovou aktivitu či produkty virových genů mohou interagovat s tumor supresorovými geny a tím významně přispět k nádorové transformaci buňky [3].

Normální buňka potřebuje k proliferaci mitogenní růstový podnět, aby se z klidového stádia aktivovala do proliferacího. Ten může být zprostředkován prostřednictvím ligand receptorové interakce či vzájemnou komunikací okolních buněk. Signál je přenášen membránovými receptory (např. „erythroblastic leukemia viral“ onkogenní homolog

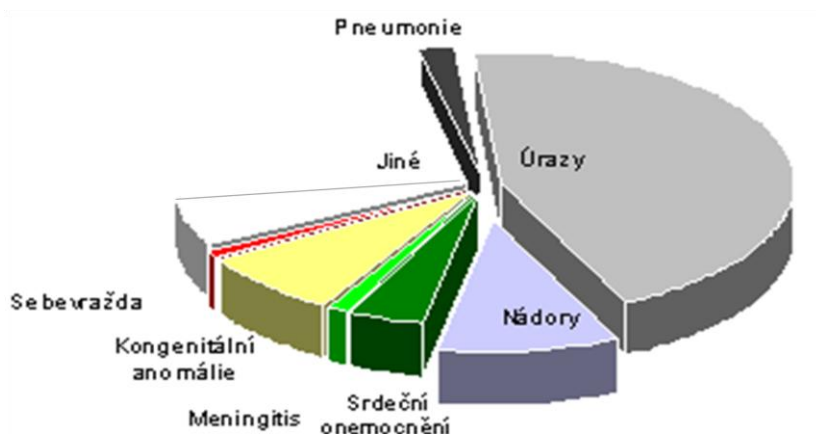
(erb/B), endoteliální růstový faktor - receptor (EFG-R)). Bylo zjištěno, že nádorové buňky jsou nezávislé na exogenních růstových faktorech, ale produkují vlastní růstové faktory (např. transformující růstový faktor α (TGF α), epidermální růstový faktor (EGF)) a tím narušují homeostázu. Protichůdný účinek těchto signálů mají růstové inhibitory (např. transformující růstový faktor β (TGF β)). Mají schopnost zastavit buněčný cyklus v G₀ fázi či specificky diferencovat buňku. Zastavení buněčného cyklu může probíhat pomocí „retinoblastoma protein“ (pRb) dráhy závislé na růstových aktivátorech a inhibitech. Pokud je pRb hyperfosforylovaný, aktivuje transkripční faktor E2F, který reguluje expresi genů zodpovědných za přechod z G₁ fáze buněčného cyklu do S fáze. Nádorové buňky mají často pRb dráhu disregulovanou. Dalším znakem nádorových buněk je schopnost rezistence k apoptóze. Nádorově transformovaná buňka může mít chybné sensory poruch extracelulárního či intracelulárního prostředí buňky (např. p53) či nefunkční samotné efekторы apoptózy (např. caspasy). Nádorová buňka může také ignorovat autonomní regulační mechanismus četnosti dělení, kdy se zdravá buňka dostane do stádia senescence po tom, co vyčerpá svůj proliferační potenciál [4].

Pro zdravou tkáň je charakteristická odpovídající vaskularizace vyvinutá v průběhu organogeneze, která je zodpovědná za efektivní zásobení kyslíkem a živinami. U nádorových ložisek dochází k angiogenezi, která je iniciována faktory (např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) či fibroblastový růstový faktor 1(FGF1)), které se váží na receptory endoteliálních buněk. Rovnováha mezi aktivátory a inhibitory angiogeneze je u nádorových buněk narušena. Zároveň struktura okolního cévního řečiště souvisí s invazivitou nádorových buněk. Ta je, spolu se schopností metastazovat, dalším rysem nádorových buněk. Dochází ke zvýšené tvorbě a aktivaci extracelulárních proteas, které se podílejí na uvolnění buňky ze svého okolí. Dále pak dochází ke změnám v tvorbě např. E-cadherinu, který spojuje buňky a přenáší důležité signály [4].

Na procesu transformace normální buňky v nádorovou se tedy podílí pozměněné geny, které patří do skupiny tzv. onkogenů a tumor supresorových genů. Jsou disregulovány následkem mutací poškozené DNA. Jejich produkty se podílejí na transformačním procesu akcelerací proliferace a snížením citlivosti buněk k apoptóze.

1.1. Nádorová onemocnění dětí

V České republice jsou nádory druhou nejčastější příčinou úmrtí u dětí (obrázek č. 1) [5]. Pro dětská nádorová onemocnění jsou charakteristické rychle rostoucí agresivní nádory s brzkým metastazováním [6].



Obrázek č. 1. Příčiny úmrtí v dětském věku. V České republice jsou nádorová onemocnění po úrazech druhou nejčastější příčinou úmrtí dětí. Převzato a upraveno z [5].

Nejčastějším dětským nádorovým onemocněním jsou leukémie, dále nádory centrálního nervového systému, sarkomy a neuroblastomy (tabulka č. 1) [7].

Tabulka č. 1. Incidence dětských nádorů dle typu malignity. Počet dětských pacientů v České republice mezi roky 2007 a 2009. Převzato a upraveno z [7].

Typ nádorového onemocnění	počet pacientů
Leukémie	242
Nádory CNS	197
Embryonální non-CNS nádory (neuroblastom, Wilmsův nádor, hepatoblastom)	182
Sarkomy	113
Neuroblastom	50
Hodgkinova nemoc	64
Non-Hodgkinovy lymfomy	57
Ewingův sarkom	28

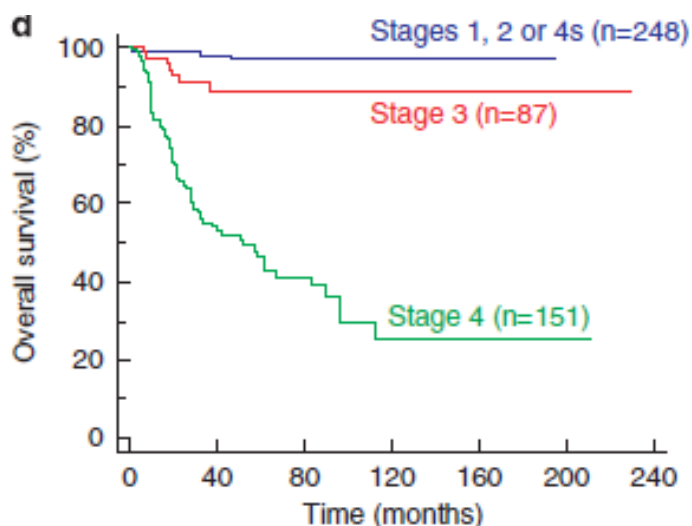
1.1.1. Neuroblastom

Neuroblastom je maligní embryonální nádor, který patří mezi nejčastější extrakraniální solidní nádory u dětí. U pacientů do jednoho roku života se jedná o nejčastější malignitu vůbec [8].

Klinické příznaky neuroblastomu jsou různé povahy podle lokalizace nádoru a stádia onemocnění. Jedná se většinou o bolesti v místě nádoru, neurologické příznaky jako motorickou slabost a třes, chronické průjmy a podobně. Nádor vychází z nezralých buněk sympatiko-adrenální linie neurální lišty, je biologicky velmi variabilní a má různé stupně diferenciaci. Průběh onemocnění je závislý na klinickém stádiu onemocnění (tabulka č. 2). U pacientů nízkého rizika a věku do 1,5 roku dochází často ke spontánní regresi. U pacientů vysokého rizika se navzdory multimodální terapii s transplantací kostní dřeně nedaří dosáhnout uspokojivých výsledků, viz obrázek č. 2 na straně 14. Nejčastěji (40 % případů) vychází z dřeně nadledvin, dále paraspinálních ganglií sympatiku v různých lokalizacích (krk, hrudník, pánev) [6].

Tabulka č. 2. Klinická stádia neuroblastomu. „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS). Převzato a upraveno z [6].

STÁDIUM NEMOCI	POPIS
Stádium I	Nádor je lokalizovaný na výchozí orgán nebo strukturu, makroskopicky je kompletně odstraněn, s mikroskopickým reziduem nebo bez něj. Lymfatické uzliny ipsilaterální a kontralaterální jsou histologicky negativní.
Stádium II A	Unilaterální nádor makroskopicky neradikálně odstraněný, lymfatické uzliny ipsilaterální a kontralaterální jsou histologicky negativní.
Stádium II B	Unilaterální nádor makroskopicky radikálně nebo neradikálně odstraněný, lymfatické uzliny ipsilaterální jsou histologicky pozitivní, kontralaterální jsou histologicky negativní.
Stádium III	-Unilaterální nádor s histologicky pozitivními kontralaterálními lymfatickými uzlinami. -Unilaterální nádor, který přesahuje přes střední čáru s postižením ipsilaterálních nebo kontralaterálních lymfatických uzlin nebo bez něj. -Nádor středočárový s bilaterálním postižením lymfatických uzlin.
Stádium IV	Diseminace nádoru do vzdálených lymfatických uzlin, kostí, kostní dřeně, jater nebo jiných orgánů (s výjimkou definovanou pro stádium IV S).
Stádium IV S	Pouze u dětí mladších jednoho roku. Primární nádor odpovídající I. nebo II. klinickému stádiu, ale jsou přítomny metastázy v kostní dřeni, játrech a kůži.



Obrázek č. 2. Vývoj přežití u pacientů s neuroblastomem. Převzato z [9].

Etiologie neuroblastomu není dosud zcela objasněna. Sekvenací genomu bylo zjištěno, že je možný hereditární výskyt neuroblastomů. U vzorků buněčných linií byla nalezena mutace v „anaplastic lymphoma kinase“ (ALK) genu, která může být dědičným znakem neuroblastomů [10]. Možný je také vliv některých toxických látek, kterým jsou ženy vystaveny během těhotenství. Může se jednat především o látky obsažené v tabákovém kouři, marihuaně či alkoholických nápojích. Spekuluje se také o možném vlivu těžkých kovů v barvách na vlasy [8].

Výskyt neuroblastomu je asociován s určitými chromosomálními amplifikacemi a delecemi. Ty mohou mít vliv na agresivitu nádoru. Nejpodstatnější genetickou abnormalitou, související s horší prognózou, je amplifikace onkogenu „myelocytomatosis viral related, neuroblastoma derived“ (N-myc), jehož produktem je transkripční faktor. Ten je amplifikován asi u 30 % všech neuroblastomů [11, 12].

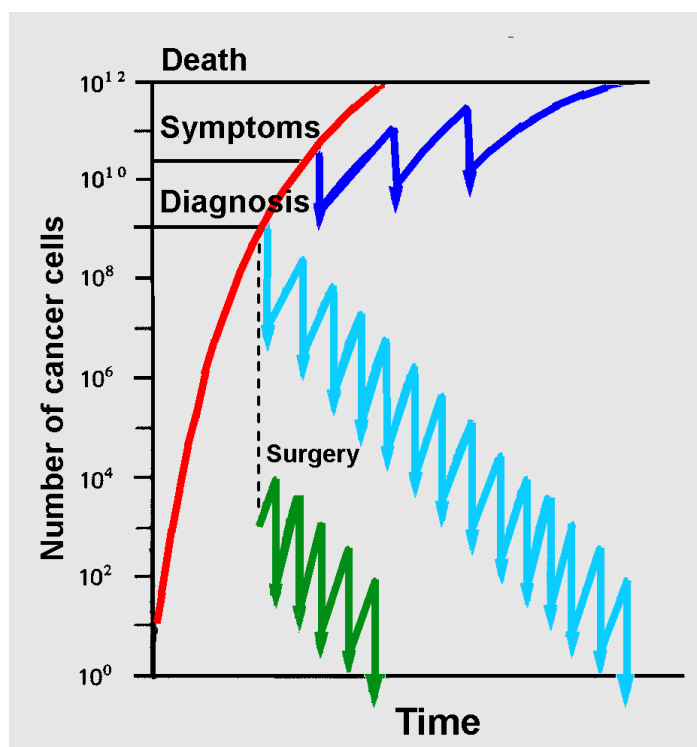
1.1.2. Léčba nádorových onemocnění

Léčba nádorů je namířená proti buňkám vlastního těla, které se transformovaly v nádorové. Protinádorová léčba využívá prostředků moderní medicíny, snaží se maximálně redukovat, či úplně eliminovat nádorové buňky v těle pacienta. Léčba je úspěšná tehdy, pokud je u pacienta navozena kompletní remise onemocnění, tedy stav, kdy nejsou v jeho těle detekovatelnými metodami zjištěny nádorové buňky. Pacient je ale

nadále v pravidelných intervalech sledován. Kontroly mohou včas rozpoznat relaps nádorového onemocnění [2].

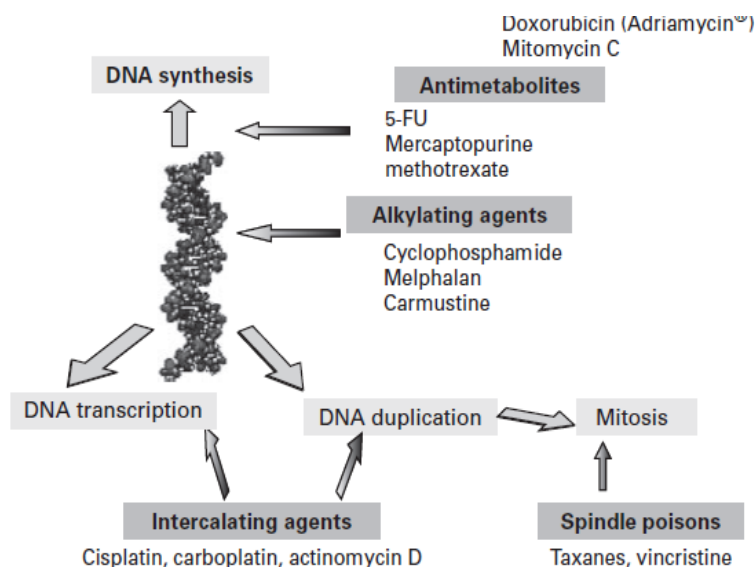
Léčba samotná probíhá nejčastěji kombinací chirurgického zákroku (odstraněním nádorové tkáně či alespoň její části), radioterapie, chemoterapie či biologické léčby. Jejím cílem je efektivní likvidace nádorového ložiska (obrázek č. 3). I přes velký pokrok v současné klinické medicíně je léčba neuroblastomů vysokého rizika málo úspěšná.

Radioterapie využívá ionizujícího záření, které předává svou energii molekulám, které excituje. Tím dojde k závažnému poškození těchto buněk. Pomocí různých modelů lze vypočítat poměrně přesné rozložení dávky záření do postižené tkáně pacienta. Úspěšnost radioterapie souvisí se znalostí přesné lokalizace nádoru a jeho radiosenzitivity, aby způsob aplikace a opakování dávek byly co nejefektivnější [2, 13].



Obrázek č. 3. Srovnání počtu detekovaných nádorových buněk neléčeného pacienta (červeně), s množstvím nádorových buněk pacienta s velkým časovým odstupem mezi kůrami (tmavě modře), při vhodné léčbě (světle modře) a při kombinaci včasného chirurgického zákroku s následnou chemoterapií (zeleně). Převzato z [14].

V praxi se používá několik různých druhů cytostatik, která mají různé terapeutické účinky (obrázek č. 4).



Obrázek č. 4. Cytotoxické látky používané při chemoterapii poškozují buňky různými způsoby. Převzato a upraveno z [15].

Příkladem běžně používaného cytostatika v klinické praxi je cisplatina (CDDP). Cisplatina (cis-diamindichlorplatinum) je anorganický metalický komplex, látka poškozující buněčnou DNA (obrázek č. 4). Patří mezi široce používaná protinádorová léčiva. Užívá se i při léčbě neuroblastomů. Podává se formou infuze o koncentraci 20 - 120 mg na m² povrchu těla pacienta. Přesný mechanismus účinku cisplatininy není dosud znám, předpokládá se, že interkaluje do buněčné DNA, což ve výsledku vede k buněčné smrti. Dochází k modifikaci bazí DNA kovalentními interakcemi s CDDP s následnou mutací genů. Kovalentní vazby mezi řetězci DNA zabraňují rozpletení dvouvláknové DNA a transkripci. Cisplatina má ovšem řadu vedlejších účinků, především nauzeu a zvracení [15-17]. Vážným problémem léčby chemoterapeutiky je možný vznik rezistence [17].

1.1.3. Vznik rezistence

Účinnost chemoterapie do jisté míry závisí na možné rezistenci vůči podanému léku. Rezistence může být primární, kdy již při prvním podání látky nedochází k odpovědi na léčivo, nebo získaná. Ta vzniká až po delší expozici dané látce [17]. Buněčná membrána

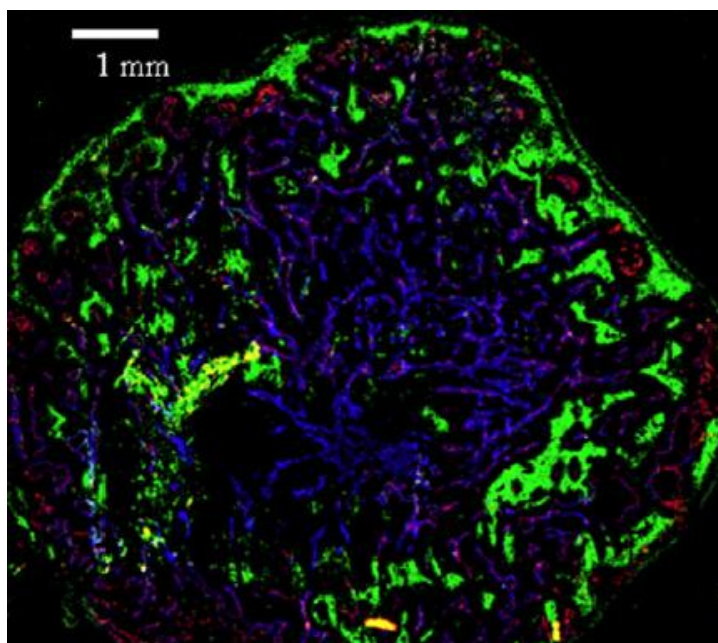
každé buňky těla je vybavena obrannými mechanismy, jak se zbavovat toxických látek. Těmito transportními mechanismy jsou často vybaveny i buňky nádorové [2].

Právě chemorezistence bývá nejčastější překážkou úspěšné léčby. Mohočetná léková rezistence nastává v případě, kdy pacient neodpovídá na podávání funkčně nepříbuzného chemoterapeutika. Příčinou bývá nejčastěji zvýšená exprese genu pro „multidrug-resistance-associated“ protein (MRP) a gen „multidrug resistance 1“ (MDR1) [18, 19]. MDR1 kóduje transportní P-glykoprotein, který funguje jako adenosintrifosfát (ATP)-závislá aktivní pumpa chemoterapeutik respektive cizorodých látek [20, 21].

Jako vhodnou skupinou látek, na které by v určitých případech nemusela vznikat rezistence, se ukazují inhibitory histondeacetylasy (HDAC). Bylo zjištěno, že v nádorových liniích rezistentních na některá cytostatika zvyšují míru apoptózy [22]. Ovšem studie V. R. Fantina a V. M. Richona ukazuje, že za určitých podmínek může být účinek inhibitorů HDAC snížen například desenzitizací či aktivací antiapoptotických mechanismů [23].

1.1.4. Hypoxie solidních nádorů

V porovnání s normální tkání je nádorová tkáň neadekvátně zásobena kyslíkem. Je to dáno tím, že v proliferujícím nádorovém ložisku se vytváří špatně organizovaná a nedostatečná vaskularizace. Z pohledu množství dostupného kyslíku z krve je tedy nádorová tkáň velmi nehomogenní (obrázek č. 5 na straně 18). Předpokládá se, že hypoxie u savčích buněk nastává při $\leq 2\%$ kyslíku [24]. Při krátkodobých, šokových hypoxických podmínkách ve tkáni dochází ke snížení tvorby ATP, snížení aktivity Ca^{2+} kanálů, zvýšení koncentrace vápenatých iontů uvnitř mitochondrií a následné změně metabolismu z oxidativní fosforylace na anaerobní glykolýzu. Pokud jsou hypoxické podmínky dlouhodobější, nastávají změny v expresi genů rodiny HIF [25].

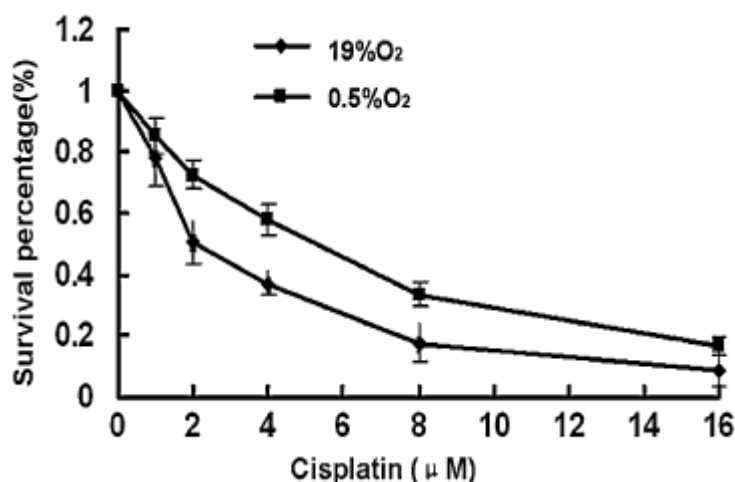


Obrázek č. 5. Zhoubný nádor o velikosti 8 mm. Zeleně jsou značena místa s nedostatkem kyslíku pomocí pimonidazolu - markeru hypoxie. Distribuce kyslíku v nádoru je silně nehomogenní. Převzato a upraveno z [26].

Do rodiny „hypoxia-inducible“ faktor (HIF) patří HIF-1, HIF-2 a HIF-3. Nejlépe prozkoumaným faktorem je heterodimer HIF-1 složený ze dvou podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β . Podjednotka HIF-1 α je citlivá na koncentraci kyslíku v buňce a determinuje aktivitu komplexu HIF. Pokud je v buňce dostatečné množství kyslíku, je poločas života HIF-1 α jen několik minut. Dochází k hydroxylaci prolylových zbytků HIF-1 α . Tento děj probíhá díky dioxygenasám „prolyl hydroxylase domain“ (PHD) rodiny, donorem kyslíku je molekulární kyslík. Poté dochází k vazbě „von Hippel – Lindau“ tumor supresorového proteinu (pVHL) a interakci v cytosolu s ubiquitin E3 ligasou a následné proteasomální degradaci. Při nedostatku kyslíku k hydroxylaci nedochází a HIF-1 α není v cytosolu odbouráván, translokuje se do jádra a dimerizuje s HIF-1 β . Vzniklý komplex následně interaguje s transkripčními koaktivátory p300 a CREB vázajícím proteinem (CBP). Komplex HIF reguluje v jádře více než 100 genů důležitých pro buněčnou proliferaci a apoptózu [25, 27, 28]. Může se také podílet na rezistenci vůči konvenčním radio- i chemoterapeutickým postupům (obrázek č. 6 na straně 19). X. Song a kolektiv ve své práci uvádí, že umlčení genu pro HIF-1 α , vede k výraznému snížení rezistence v hypoxických podmínkách [29]. Mechanismus působení HIF-1 komplexu a zvýšení rezistence vůči chemoterapeutikům není přesně znám. Předpokládá se, že HIF-1 se podílí na zvýšení exprese genů MDR1 a MRP1 a tím na tvorbě transportních kanálů. Léčiva jsou

tak z buňky odstraňována. HIF-1 také reguluje několik anti-apoptotických faktorů jako jsou „Bcl-2 homologous antagonist/killer“ (Bak), „Bcl-2 associated X“ (Bax) či p53 [30].

V hypoxických podmínkách jsou aktivované promotory genů zprostředované transkripčním faktorem HIF-1. Bylo zjištěno, že inhibitory HDAC mohou jeho transkripční aktivitu snížit [31].



Obrázek č. 6. Závislost přežívání buněk na koncentraci cisplatinu (μM). Buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) byla kultivována při 19% množství kyslíku (spodní linie grafu) a v hypoxických podmínkách (0,5 % O₂). Hypoxické kultivační podmínky navozují rezistenci na CDDP. Převzato a upraveno z [29].

1.1.5. Inhibitory HDAC

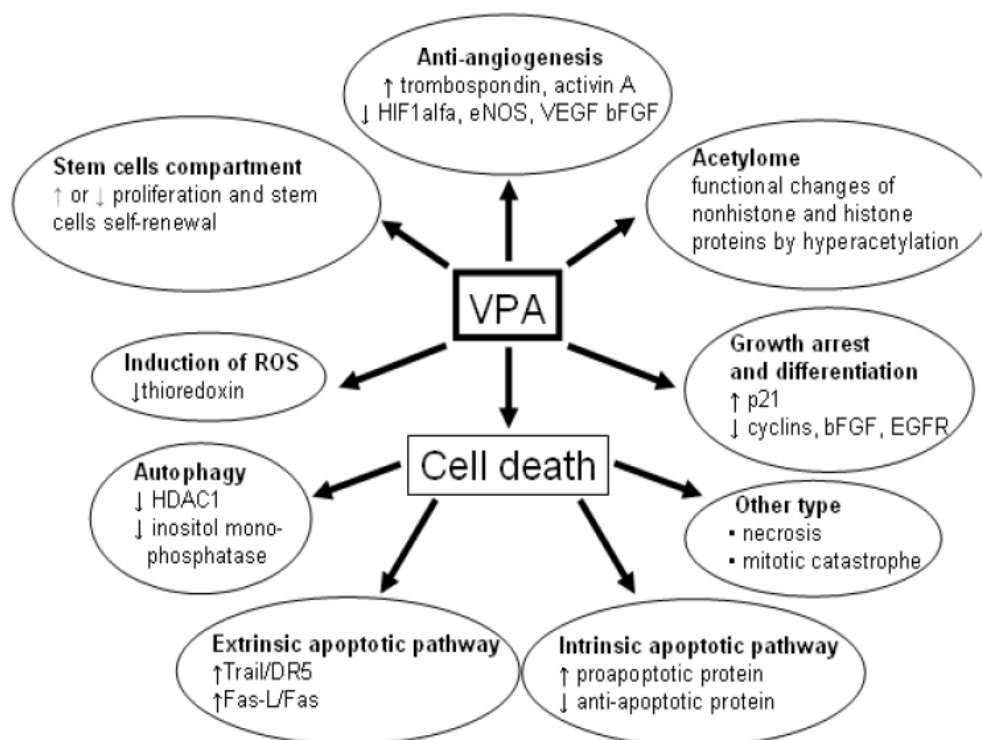
Genetická informace zapsaná ve formě DNA je v jádře vysoce organizována. Nukleosomy jsou tvořeny histonovými oktamerem, kdy 146 parů bazí je asociovaných s histony H2A, H2B, H3 a H4. Postranlační modifikací těchto bazických proteinů (acetylace, deacetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace atd.) dochází k modulaci genové exprese [32]. Postranlačních modifikací acetylací a deacetylací histonů se účastní dvě skupiny enzymů, histonacetyltransferasy (HAT) a histondeacetylasy (HDAC). Mezi těmito skupinami enzymů existuje reversibilní regulace dynamické rovnováhy. Většina inhibitorů HDAC je charakteristická doménou vážící kov, která může zablokovat aktivní místo enzymu HDAC [33]. HAT acetyluje histony, tím ovlivňuje vazbu histonu na DNA, respektive dochází k jejímu uvolnění a zpřístupnění DNA. Naopak HDAC odebírají acylovou skupinu navázanou na postranním řetězci aminokyseliny lysinu a tím dojde

k vytvoření kladného náboje histonu a pevnější vazbě ke struktuře DNA. Dochází k potlačení genové exprese (např. důležitých tumor supresorových genů) díky kompaktnější vazbě DNA k histonům. Savčí HDAC jsou rozděleny do tří skupin, inhibitory HDAC působí na první dvě [32].

Inhibitory HDAC mohou uvolnit deregulované geny důležité pro regulaci buněčného cyklu, diferenciaci buňky, apoptózu či pro potlačení angiogeneze. Mohou potlačovat růst nádorového ložiska. Částečně díky snížení funkce HIF, zejména díky acetylaci koaktivátorů HIF-1 α [27, 32]. Inhibitory HDAC, kyselina valproová (VPA), trichostatin A (TSA) a butyrát sodný (NaB), snižují množství HIF-1 α a tak snižují transkripční aktivitu komplexu HIF u nádorových linií [34].

Několik efektivních inhibitorů HDAC je v I/II fázi klinického testování jako protinádorové léky [35]. Předmětem výzkumu je také hledání vzájemných vztahů mezi inhibitory HDAC a konvenčními cytostatiky. Bylo zjištěno, že preinkubace nádorových linií s inhibitory HDAC může zvýšit cytotoxicitu a efektivitu účinku následně přidaného cytostatika dokonce i u rezistentních buněčných linií [36]. Použití inhibitorů HDAC v kombinaci s cisplatinou a dalšími cytostatiky je tedy jedním z možných budoucích terapeutických zásahů při léčbě neuroblastomů [19].

Mezi inhibitory HDAC patří kyselina valproová. V klinické praxi se používá při léčbě bipolárních onemocnění a epilepsie. Zjistilo se, že kyselina valproová je účinný inhibitor HDAC a angiogeneze [37]. Kyselina valproová může aktivovat dráhy, které jsou pro nádorové buňky fatální (obrázek č. 7 na straně 21). V popředí výzkumu však zůstává její schopnost inhibovat HDAC.



Obrázek č. 7. Několik možných mechanismů účinku VPA na nádorové buňky. Podstatná vlastnost VPA je schopnost inhibovat HDAC a tím zvýšit možnost transkripce důležitých apoptotických genů. Převzato z [38].

1.2. Buněčná smrt

Buněčná smrt je v našem organismu zcela přirozený děj. Podle Lockshina a Zakeriho lze buněčnou smrt rozdělit do tří kategorií s tím, že spojitost mezi apoptózou a autofagií je velice úzká [39].

- I. Apoptóza
- II. Autofagie
- III. Nekróza

Zejména apoptóza je důležitý děj pro udržení homeostázy organismu. Zajišťuje rovnováhu poměru nových a starých buněk. Je to přirozený nástroj pro zánik buněk poškozených či nadbytečných.

1.2.1. Apoptóza

Termín apoptóza byl zaveden v roce 1972 J. F. R. Kerr. Od té doby je synonymem pro řízenou, programovanou buněčnou smrt. Proces apoptózy je zodpovědný za eliminaci buněk jak během embryonálního vývoje, tak i v dospělém organismu [40].

Apoptóza má několik charakteristických morfologických a biochemických vlastností. Je to smrštění buňky, její deformace a následná ztráta kontaktu s okolními buňkami. Uvnitř apoptotické buňky dochází ke kondenzaci a degradaci chromatinu, pyknóze a rozpadu mitochondrií. Tento proces je doprovázen vylitím důležitých mediátorů pro dokončení buněčné smrti. V konečné fázi dojde k rozpadu celého obsahu buňky na malé membránové fragmenty nazývané apoptotická tělíška [41, 42].

Celý proces je ukončen fagocytózou makrofágy či parenchymálními buňkami. Ty pohltí apoptotická tělíška obsahující cytoplasmu, organely a jaderné fragmenty. Nedochází při tom k zánětlivé reakci, protože je zamezeno uvolnění buněčných partikulí do okolí a pohlcující buňky neprodukují protizánětlivé cytokiny [43, 44].

Prvotní mechanismus spuštění celé apoptotické kaskády je velmi sofistikovaný. Rozlišujeme různé apoptotické dráhy, dvě z nich jsou majoritní. A to vnější či „death receptorová“ dráha a vnitřní neboli mitochondriální dráha.

Vnější signální dráha je spuštěna interakcí transmembránového receptoru s extracelulárním ligandem. Signál zprostředkovaný ligandy, především Fas ligandem (FasL), který patří do velké rodiny tumor nekrotizujících faktorů (TNF). FasL mohou být molekuly lymphotoxinu, „cluster of differentiation 30“ (CD 30) ligand, 4-1 BB ligand, „cluster of differentiation 40“ (CD 40) ligand, „TNF-related apoptosis-inducing“ ligand (TRAIL) a další z rodiny TNF. Nejlépe je charakterizovaná interakce mezi Fas ligandem a Fas receptorem (někdy také „cluster of differentiation 95“ (CD 95) či apolipoprotein A1 (APO-1)) a mezi TNF- α ligandem a TNF receptorem. Po vazbě ligandu na transmembránový receptor dojde k vazbě adaptorového proteinu „Fas-associating death domain“ (FADD) či „TNF receptor type 1-associated death domain“ (TRADD). V tomto momentě dochází také k formování „death-inducing“ signálního komplexu (DISC), který je zodpovědný za aktivaci iniciačních caspas. Ty aktivují efekторы buněčné smrti [45, 46].

Tato cesta může být inhibována molekulou sekvenčně homologní s caspasou-8, tedy tak zvaným buněčným FLICE inhibičním proteinem (c-FLIP). Ten inhibuje aktivaci caspasy-8 a tím blokuje spuštění apoptózy cestou Fas receptoru [47]. Caspasa-8 může

zprostředkovávat spojení mezi vnější a vnitřní apoptotickou dráhou. Caspasa-8 aktivovaná vnější cestou štěpí protein „BH3 interacting domain death agonist“ (Bid), patřící do rodiny proteinů „B cell lymphoma-2“ (Bcl-2), které kontrolují většinu apoptotických reakcí. Fragmenty „transduced“ Bid (tBid) proteinu se přemísťují následně do mitochondrií a evokují vnitřní apoptotickou cestu [48].

Vnitřní apoptotická cesta je iniciována nereceptorovými stimuly, velká část důležitých podnětů vychází z mitochondrií. Signály ke spuštění programované smrti mohou být negativní, například nedostatečná stimulace hormony, cytokiny či růstovými faktory, nebo také pozitivní. Mezi pozitivní faktory patří radiace, toxiny, zvýšená teplota, hypoxie, virová infekce či volné radikály [46]. Všechny tyto podněty vyvolávají změny mitochondriální membrány buňky. Dochází k otevření permeabilních pórů v membráně a její depolarizaci. Tomuto jevu napomáhají Ca^{2+} ionty, alkalické pH a tzv. „reactive oxygen species“ (ROS) [49]. Současně dochází k uvolnění pro-apoptotických proteinů z mezimembránového prostoru do cytosolu. Jsou to cytochrom c, „second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI“ (Smac/DIABLO) a „Omi/high temperature requirement A2“ (HtrA2/Omi), zodpovědné za aktivaci buněčné smrti. Cytochrom c se váže následně na „apoptotic protease-activating“ faktor 1 (Apaf-1), spolu s inaktivní procaspasou-9 a vytváří tak molekulární útvar zvaný apoptozóm, který aktivuje caspasu-9 důležitou pro spuštění apoptózy. Molekuly Smac/DIABLO a HtrA2/Omi jsou zodpovědné za inhibici „inhibitors of apoptosis“ proteinů (IAP) [46].

Z mitochondrií se mohou uvolnit také proteiny důležité pro indukci buněčné smrti, která probíhá na caspasach nezávisle (kapitola 1.2.4).

Vnitřní a vnější apoptotické dráhy se sbíhají a ve výsledku dochází k aktivaci exekučních caspas (především caspasy-3), které interagují s cytoplasmatickými endonukleasami a proteasami a degradují tak jaderný a cytosolární materiál [46].

1.2.2. Autofagie

Při autofagii se degradují vlastní buněčné kompartmenty lysozomy. V těch se při krátkodobém nutričním stresu degraduje cytoplasmatický materiál a organely. Ukázalo se také, že za určitých podmínek, může autofagie napomáhat buněčné smrti. A to i v případě, že nemůže dojít z nějakého důvodu k apoptóze. Otázkou stále zůstává, zda je proces

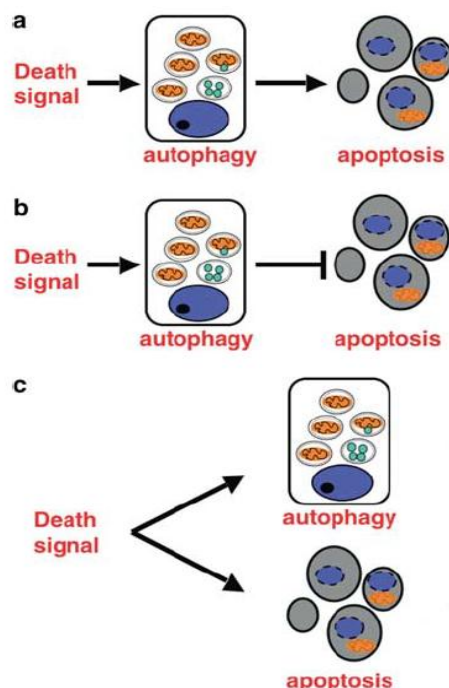
autofagie na caspasach nezávislý. Autofagie je tedy pro buňku dvousečná zbraň, může jí pomoci přežít hladovění a zároveň ji může programově usmrtit, pokud je to potřeba [50].

Při autofagii se vytváří tak zvaný autofagozóm, který fúzuje s lysozomem. Pro jeho formaci jsou důležité mimo jiné molekuly „microtubule-associated“ protein 1 lehký řetězec 3 (LC3)-(„autophagy-related“ protein 8 (atg 8)) a Beclin 1 (atg 6) [50]. LC3 je jedním z molekulárních markerů autofagie. Je produkován ve dvou formách, LC3 I a LC3 II [51].

Dle genetické analýzy má Beclin 1 velmi různorodé vlastnosti. Je to tumor supresorový gen, regulátor buněčné smrti, podílí se na embryonálním vývoji a působí preventivně proti neurodegenerativním chorobám. Je zástupcem fosfatidylinositol 3-kinas [52]. Bylo zjištěno, že pokud je Beclin 1 downregulován metodou RNA interference, či je autofagie inhibována farmakologicky, buňky během nutriční deprivace rapidně umírají znemožněním tvorby autofagozómu. Ve spojitosti s rakovinou bylo zjištěno, že gen pro Beclin 1 je v některých nádorech deletovaný či je jeho exprese snížena [50, 53].

V posledních letech se věnuje poměrně velká pozornost sledování vzájemných vztahů mezi apoptózou a autofagií (obrázek č. 8 na straně 25). Jednoznačný mechanismus jejich kooperace nebyl zatím stanoven. Z některých studií vyplývá, že selhání procesu autofagie může přispět k vývoji zhoubného bujení [54].

Například také radiační léčba může u některých typů nádorů vyvolat autofagii, jak popisují S. Paglin a kol. ve své práci [55]. Bylo zjištěno, že buněčná smrt autofagií může být aktivována u některých nádorových linií různými chemoterapeutiky. Bylo také publikováno, že inhibitor angiogeneze a potencionální medikament, endostatin, může vyvolat zánik endoteliálních buněk právě autofagií. Respektive, že buňky exponované endostatinu vykazují charakteristické znaky této smrti [54]. To otevírá další možnosti terapeutického zásahu a prostor k dalšímu výzkumu.



Obrázek č. 8. Schéma popisující možný vztah apoptózy a autofagie. A) autofagie předchází navození apoptózy, na rozdíl od b), kde autofagie může mít antagonistické účinky vůči apoptóze. Třetí možnost je znázorněna na obrázku c), kdy je apoptóza a autofagie na sobě nezávislá. Může pak při inhibici apoptózy docházet k autofagii a obráceně. Převzato a upraveno z [54].

1.2.3. Nekróza

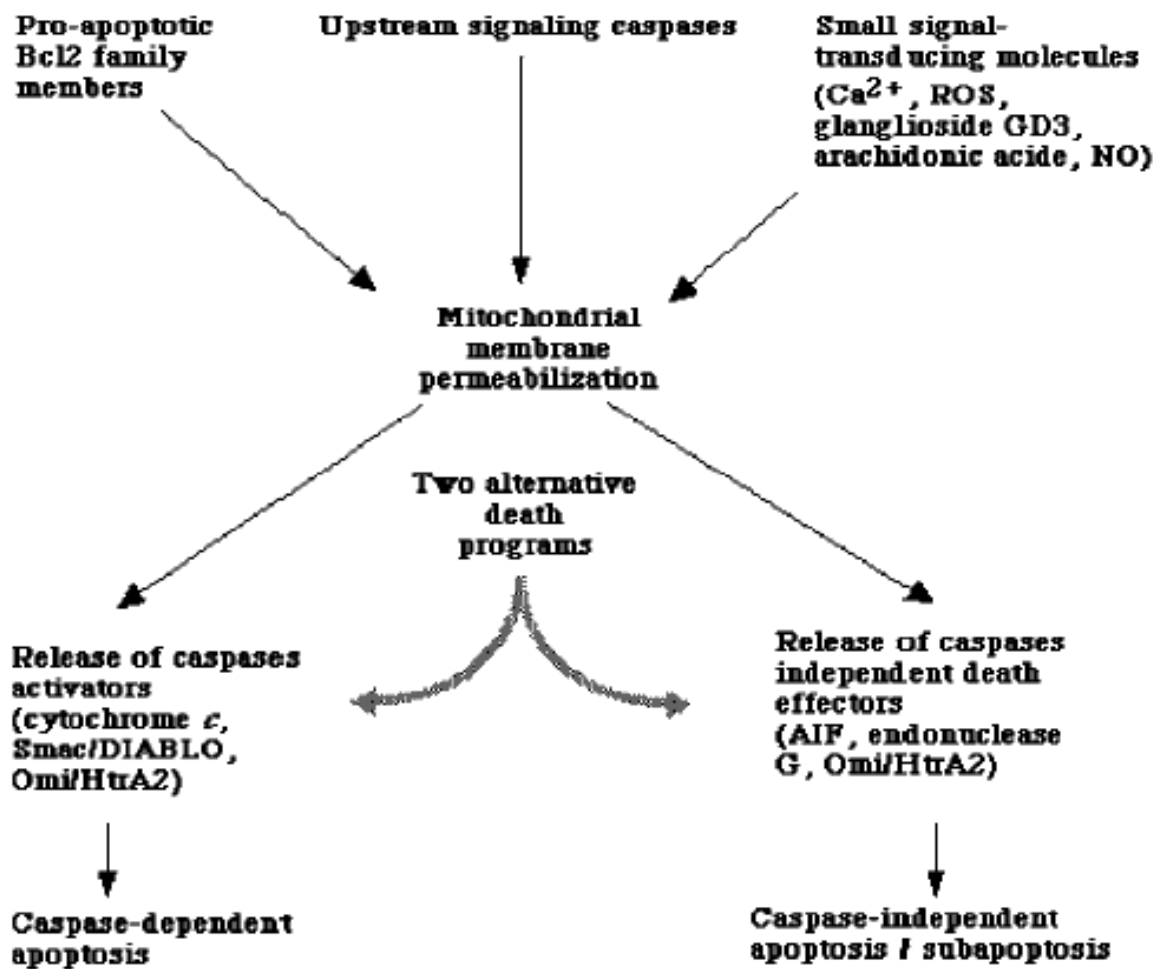
Nekróza je geneticky nekontrolovaná buněčná smrt. Poslední výzkumy ovšem ukázaly, že to není absolutní pravda. Například pokud jsou inhibovány určité regulátory apoptózy či autofagie, může umírající buňka podlehnout nekróze. Při ní může docházet k lokálnímu zánětu v okolní tkáni díky velkému zvětšení buňky a možné nekontrolované lýze [56]. Obvykle bývá spuštěna jako odpověď buňky na vnější podnět jako je styk s jedy či vystavení nepříznivým teplotám.

1.2.4. Buněčná smrt nezávislá na caspasach

Bylo zjištěno, že programovaná buněčná smrt může nastat za určitých okolností i bez aktivace caspas, jako hlavních efektorů buněčné smrti. Překvapivě může být apoptóza na caspasach nezávislá spuštěna vnitřní i vnější cestou. Vnější „death receptorová“ dráha

může po vazbě ligandu na buněčný membránový receptor signalizovat uvolnění ROS za přispění fosfolipasy A₂, která může destabilizovat mitochondriální membránu. Vnitřní dráha probíhá primárně v závislosti na mitochondriích [57, 58]. Mitochondrie se podílí na caspasach závislé i nezávislé buněčné smrti (obrázek č. 9 na straně 27). Po iniciaci proapoptotickými signály dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a aktivaci caspas díky uvolnění cytochromu c a také aktivaci na caspasach nezávislých efektorů buněčné smrti. Mezi ně patří především apoptózu indukující faktor (AIF), endonukleasa G a HtrA2/Omi [59]. Otázkou stále zůstává, do jaké míry tyto dvě dráhy kooperují. Zda probíhají zároveň či zda jedna druhou dokáže plnohodnotně nahradit. V experimentech, kdy je nutné vyřadit aktivitu caspas, se obvykle používají jejich specifické inhibitory. Mohou to být inhibitory jednotlivých caspas, či látky schopné inhibovat všechny caspasy současně. Mezi takové inhibitory patří N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (O-methyl)-fluoromethylketon (Z-VAD-fmk), kompetitivní ireverzibilní syntetický inhibitor caspas [60].

Na rozdíl od buněčné smrti závislé na caspasach, kdy dochází k externalizaci fosfatidylserinu a ve velké míře kondenzaci chromatinu buňky, smrt na caspasach nezávislá tyto vlastnosti jednoznačně nevykazuje. Pro ní je charakteristická velká cytoplasmatická vakuolizace, kumulace autofagosomů a periferní jaderná kondenzace. Z hlediska kinetiky reakcí je pomalejší [57].

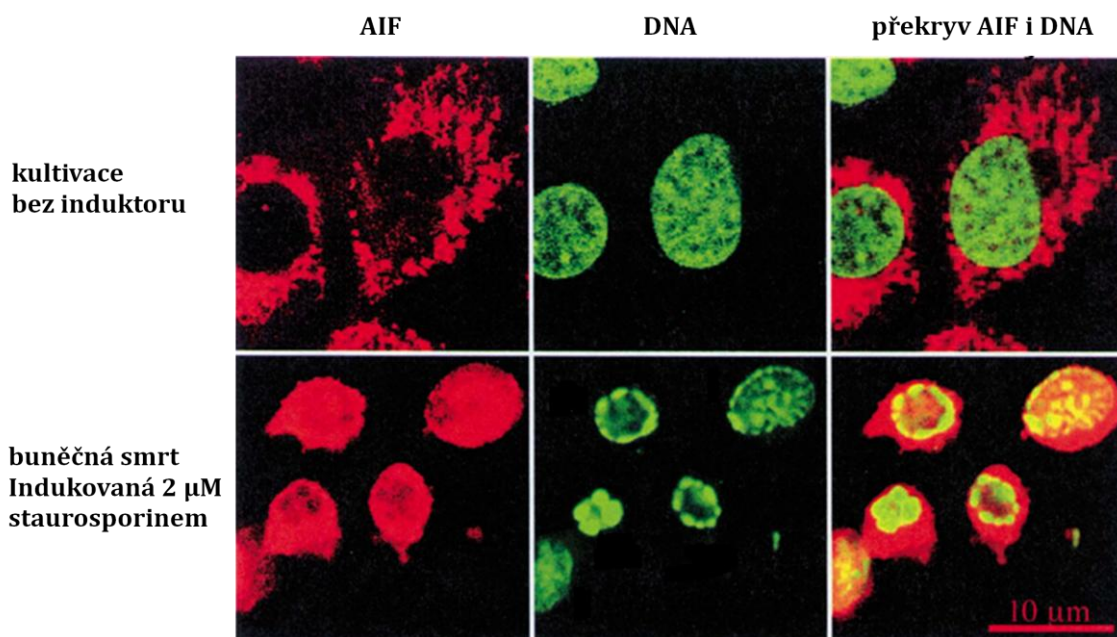


Obrázek č. 9. Schéma dvou alternativních drah apoptózy po permeabilizaci mitochondriální membrány. Levá, klasická, na caspasach závislá dráha. Pravá cesta na caspasach nezávislá, zprostředkovaná efektry AIF, endonukleasou G či Omi/HtrA2. Převzato z [61].

Endonukleasa G se v mitochondriích účastní procesů replikace DNA, uvolněná z mitochondrií se translokuje do jádra během apoptózy. V jádře pak štěpí DNA na jednotlivé fragmenty. Je považována za jeden z důležitých efektorů na caspasach nezávislé buněčné smrti [62].

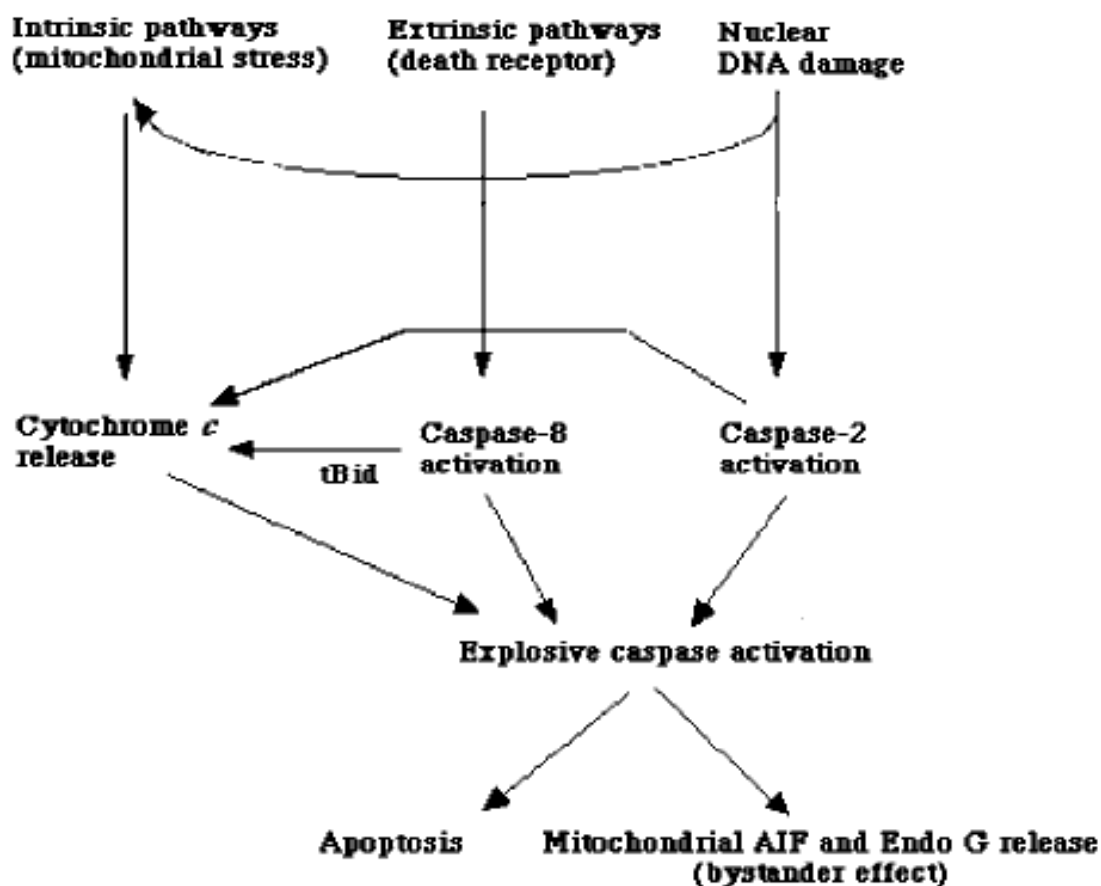
AIF je flavoprotein s nikotinamid adenindinukleotid (NADH) oxidasovou aktivitou, který se translokuje z mitochondrií do cytoplasmy a jádra v případě, že je indukovaná apoptóza (obrázek č. 10 na straně 28). V mitochondriích je AIF inertní molekula. V buněčném jádře se váže na DNA díky elektrostatickým interakcím. Proč přechází do jádra a jestli je tento děj striktně nezávislý na caspasach je předmětem celé řady studií. C. Candé a kol. ve své práci uvádí, že jsou dvě možnosti. Jedna teorie říká, že se AIF

uvolňuje z mitochondrií opravdu nezávisle na caspasach. Ovšem je-li dogma, že apoptóza se rovná aktivaci caspas, pak můžeme říci, že smrt způsobená translokací AIF do jádra je „neapoptotická“. Přiklání se tedy k variantě, že AIF se může uvolnit na základě několika, zatím nespecifikovaných, podnětů a připouští dokonce, že to mohou být v některých případech caspasy (obrázek č. 11 na straně 29) [61].



Obrázek č. 10. Imunofluorescenční metoda zobrazující lokalizaci proteinu AIF ve fibroblastové linii rat-1. AIF značeno červeně, DNA zeleně. Na spodním pravém obrázku, kdy jsou obrázky překryty, je vidět, že AIF je po indukci staurosporinem lokalizován v jádře. Doba inkubace s induktorem byla 4 hodiny. Převzato a upraveno z [63].

Bylo zjištěno, že molekula AIF má na svém povrchu velmi silný pozitivní elektrostatický potenciál. Po translokaci do jádra je elektrostatická interakce mezi AIF a DNA nezávislá na sekvenci DNA. Není zcela jisté jakým mechanismem probíhá samotná kondenzace chromatinu a fragmentace DNA. Teoreticky existují zatím tři možná vysvětlení. Je možné, že AIF může mít sám o sobě nukleasovou aktivitu nebo že interakce s DNA zvýší jeho náchylnost k latentním nukleasám. Či že AIF může indukovat pomocí „downstream“ nukleas parciální lýzu chromatinu [59].



Obrázek č. 11. Jedna z možných teorií, AIF se (spolu s endonukleasou G) uvolňuje z mitochondrií až po aktivaci caspas. Jeho translokace do jádra je tedy na caspasach závislá. Převzato a upraveno z [61].

Doposud není objasněn přesný mechanismus apoptotické buněčné smrti. Vedle dráhy na caspasach závislé je možná cesta na těchto proteasach nezávislá. Otázkou ovšem zůstává, do jaké míry obě cesty spolupracují, zda probíhají paralelně jedna vedle druhé současně a zda jsou redundantní. V souvislosti s nezávislými cestami na caspasach jsou zkoumány také inhibitory HDAC. U některých nádorových linií se mohou podílet na výrazném zvýšení efektorů caspasově nezávislé smrti, jako je například AIF [22].

2. Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit současné poznatky působení inhibitorů HDAC na neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3. Práce přispívá k objasnění indukce buněčné smrti inhibitory HDAC nezávislé na caspasach. V rámci této práce byly řešeny následující problematiky:

- vhodné experimentální uspořádání sledování indukce buněčné smrti cisplatinou, kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným u lidských neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3
- vliv kultivačních podmínek (standardních; hypoxických, 1 % O₂) na indukci buněčné smrti cisplatinou, kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným
- detekce buněčné smrti s cílem zjistit, zda probíhá závisle na caspasach
- translokace AIF z mitochondrií do jádra buněk u neuroblastomové linie SK-N-AS

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Abcam (USA): primární protilátka proti poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)

BIO-RAD (USA): sekundární protilátka (koží proti myši s HRP konjugátem), souprava pro stanovení koncentrace proteinů (DC Protein Assay), sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non – Fat Dry Milk)

BioVision (USA): Caspasa-3/ CPP32 kolorimetrická sada, Annexin V-FITC sada detekce apoptózy, sada izolace jaderné/cytoplasmatické frakce

Fluka (Německo): Igepal CA 630, Ponceau, 1,2-bis (dimethylamino) ethan, amonium peroxodisulfát (APS), glycin

FOMA BOHEMIA (ČR): MEDIX XBU lékařský x-ray film

Invitrogen (USA): primární protilátka proti AIF, sekundární protilátka Alexa Fluor® 488, L-glutamin, sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), trypsin

LACHEMA (ČR): 1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris)

Linde (ČR): kalibrační plyn (1% O₂, 5% CO₂, zbytek N₂), CO₂ medicínální

Lonza (USA): „Iscove’s modified Dulbecco’s“ médium (IMDM) s glutaminem

Millipore Corp. (USA): primární protilátka proti glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenase (GADPH)

PAA (Rakousko): fetální hovězí sérum (FBS)

Penta (ČR): hydrogenuhličitan sodný, methylalkohol, formaldehyd, bromfenolová modř, pracovní roztok barviva Giemsa-Romanovski

Pliva (ČR): cisplatina

Roche (Německo): Complete (proteasový inhibitor)

Serva (Německo): t-oktylfluoxypolyetoxyetanol

Sigma (USA): 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid hydrát, bisBenzimid (Hoechst 33258), deoxycholát sodný, dodecylsulfát sodný (SDS), chlorid litný (LiCl), AA mix (akrylamid/bis-akrylamid = 29/1), polyoxyethylensorbitanmonolaurát (TWEEN 20), kyselina valproová, 1,2-bis(dimethylamino) ethan (TEMED), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT), butyrát sodný, Triton X-100, merkaptoethanol, trichostatin A

Neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS s katalogovým číslem 94092302 byla zakoupena od firmy ECACC. Neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-3 byla darem profesora Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem.

Snímky buněčných linií byly pořízeny fotoaparátem Olympus C-5050 připojeným k mikroskopu Olympus IX51. Dále pak fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70 PROVIS.

Voda používaná při experimentech byla upravena přístrojem Millipore Direct-Q3 UV.

Všechny používané chemikálie byly čistoty p.a. či lepší.

3.2. Kultivace buněčných linií

Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (N-*typ*) a UKF-NB-3 (S-*typ*) byly kultivovány v „Iscove's Modified Dulbecco's Medium“ (IMDM) s glutaminem, doplněném 10% fetálním hovězím sérem. Kultivace probíhala při 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti vzduchu v inkubátoru Jouan IGO 150. Kultivace v hypoxických podmínkách (1 % O₂), byla prováděna v hypoxické komůrce Modular incubator chamber (Billups-Rothenberg). Buněčné linie byly pasážovány v pravidelných intervalech. Z povrchu kultivačních nádob byly uvolňovány 0,25% roztokem trypsinu v PBS po promytí PBS a resuspendovány v potřebném množství připraveného média.

3.3. Počítání buněk

Po trypsinaci a resuspendaci buněk, bylo odebráno 0,5 ml buněčné suspenze, která byla dále ředěna PBS. Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce umístěné v mikroskopu Olympus IX51. Počet buněk v jednom mililitru média odpovídá počtu buněk spočítaných ve 24 čtvercích Bürkerovy komůrky násobených ředěním a 10⁴.

3.4. Test klonogenicity

Rozdíl ve viabilitě lidských neuroblastomových buněčných kultur SK-N-AS a UKF-NB-3 kultivovaných při standardních podmínkách a při nedostatečném množství kyslíku (1 % O₂) byl zjišťován testováním klonogenicity. Buněčná suspenze byla ředěna tak, aby výsledný počet buněk v 5 ml IMDM média byl 300. Po osmidenní kultivaci v 20 cm² miskách v normoxii a hypoxii (1 % O₂) bylo kultivační médium odstraněno a kolonie buněk fixovány methanolem. Kolonie buněk byly následně obarveny dle Giemsy 5x ředěným pracovním roztokem v PBS. Počet kolonií byl spočítán okem.

3.5. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Lowryho a kol. [64]. Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita sada DC Protein Assay firmy BIO-RAD. Dle pokynů

výrobce bylo vždy k 5 μ l připravených standardů (hovězí sérový albumin) a 5 μ l vzorků přidáno 25 μ l roztoku A' připraveného smícháním 1000 μ l roztoku A s 20 μ l roztoku S. Ke všem vzorkům bylo následně přidáno 200 μ l roztoku B. Po 15 minutové inkubaci za laboratorní teploty a mírného míchání na třepačce Edmund Bühler Swip KM-2 byla měřena optická denzita na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max při vlnové délce 750 nm. Naměřená data byla vyhodnocena softwarem SoftMax Pro.

3.6. Testování viability buněk

Cytotoxicita NaB a LiCl vůči neuroblastomovým buněčným liniím SK-N-AS a UKF-NB-3 byla měřena MTT testem. Živé buňky metabolizují 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid (MTT) na barevný produkt formazan.

Do prvního sloupce 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l média IMDM. Do druhého až dvanáctého sloupce vždy 50 μ l IMDM média. Poté bylo do třetího sloupce pipetováno 50 μ l IMDM média se 400mM NaB respektive 800mM LiCl. Látky byly tzv. „dvojkovou řadou“ pipetovány do všech dalších sloupců destičky. Dále bylo do sloupců dvě až dvanáct pipetováno 10 000 buněk v 50 μ l média. Mikrotitrační destička byla inkubována 72 hodin v inkubátoru Jouan IGO 150. Kultivace buněk v hypoxických podmínkách (1 % O₂) byla prováděna v hypoxické komůrce Modular incubator chamber (Billups-Rothenberg). Poslední 4 hodiny experimentu byla mikrotitrační destička inkubována s 50 μ l MTT (2 mg/ml v PBS). Poté bylo přidáno 100 μ l 50% N,N-dimethylformamidu v 20% SDS, pH 4,5. Následovala pětiminutová inkubace. Směs byla následně promíchána pipetou a výsledné zabarvení bylo měřeno spektrofotometrem Molecular Devices VERSA max při vlnové délce 570 nm. Optická denzita média byla odečtena jako pozadí a hodnota optické denzity živých kontrolních buněk v druhém sloupci byla brána jako 100 %. Koncentrace látky způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC₅₀) pro jednotlivé látky byla vypočtena programem SoftMax Pro.

3.7. Detekce buněčné smrti

3.7.1. Vizualizace buněčných jader

Hoechst je látka, která interkaluje do A-T oblastí DNA a vizualizuje tak jádra buněk. Do IMDM média narostlých buněčných kultur byl přidán 1 µg/ml Hoechst 33258. Inkubace probíhala 5 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně bylo IMDM médium odstraněno a přisedlé obarvené buňky opláchnuty 2x 1 ml PBS a poté uvolněny trypsinizací. Směs byla centrifugována při 250 g po dobu 2 minut v centrifuze Hettich Universal 320. Přibližně 90 % supernatantu bylo odstraněno a peleta buněk byla rozsuspendována. Ze směsi bylo odebráno 15 µl pro analýzu fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70 PROVIS. V každém experimentu bylo počítáno vždy 100 buněčných jader.

3.7.2. Kolorimetrické stanovení aktivity caspasy-3

Stanovení aktivity caspasy-3 bylo provedeno soupravou Caspasa-3/ CPP32 kolorimetrická sada od firmy BioVision. Neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly 48 hodin vystaveny standardních podmínek a v hypoxii (1 % O₂) 5 µg/ml respektive 2 µg/ml CDDP, 5 mM respektive 2 mM VPA, 200 nM respektive 200 nM TSA, 5 mM respektive 2 mM NaB a 20 µM Z-VAD-fmk. Poté byly buňky mechanicky sklizeny a promyty 2x 1 ml PBS. Lýza buněk byla provedena přidáním 100 µl vychlazeného lyzačního pufru k peletě buněk. Buňky byly resuspendovány a 10 minut inkubovány na ledu. Následně byla směs 1 minutu centrifugována při 10 000 g a 4°C v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R. Odebraný supernatant byl pro další použití skladován při -80°C.

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla stanovena soupravou DC Protein Assay, jak je uvedeno v kapitole 3.5 na straně 33. Stanovení aktivity caspasy-3 bylo provedeno v tripletech. Na ledu bylo k 150 µg proteinů jednotlivých vzorků přidáno příslušné množství lyzačního pufru tak, aby výsledný objem směsi byl 150 µl. Následně bylo přidáno ke každému vzorku 150 µl 2x reakčního pufru s 10 mM dithiothreitem (DTT) a 5 µl 4 mM Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilin (DEVD-pNA). Dále byla mikrotitrační destička se vzorky inkubována při 37°C po dobu 2 hodin. Optická denzita

jednotlivých vzorků byla měřena na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max při vlnové délce 400 nm.

3.7.3. Annexin V-FITC

Fosfatidylserin, součást buněčné membrány, přechází při apoptóze z vnitřní strany buněčné membrány na vnější. Fluorescenčně značený Annexin V (Annexin V-FITC) má vysokou afinitu právě k fosfatidylserinu. Apoptóza je od nekrózy odlišena přidavkem propidium jodidu (PI). Propidium jodid pozitivní buňky podléhají nekróze.

Neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly kultivovány 48 hodin za standardních podmínek a v hypoxii (1 % O₂) s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 mM respektive 2 mM VPA; 5 mM respektive 2 mM VPA v kombinaci s 20 μM ZVAD-fmk. Buňky byly sklizeny trypsinem a promyty 2x 1 ml PBS. Dle instrukcí výrobce soupravy Annexin V-FITC detekce apoptózy (BioVision) byla peleta resuspendována v 500 μl 1x vazebného pufru. Poté bylo ke směsi přidáno 5 μl Annexinu V-FITC a 5 μl propidium jodidu. Buňky byly inkubovány 5 minut ve tmě při pokojové teplotě a následně analyzovány průtokovým cytometrem Becton Dickinson FACS Calibur.

3.8. Translokace AIF

Translokace AIF z mitochondrií do buněčného jádra je dalším znakem probíhající apoptózy. Neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS byla kultivována jak za standardních podmínek, tak v hypoxii (1 % O₂) s 5, 10 a 15 mM VPA respektive 5 μg/ml CDDP různou dobu (1-48 hodin) ve 24 jamkové destičce. Na dně každé z jamek bylo umístěno sterilní krycí sklíčko, na které buňky adherovaly. Fixace na sklíčko byla provedena následovně. Buňky byly promyty 2x 1 ml PBS, 2 minuty prefixovány 500 μl 4% roztokem formaldehydu v PBS. Poté bylo přidáno 300 μl 2% roztoku formaldehydu v PBS na 20 minut. Fixace probíhala za laboratorní teploty. Buňky byly promyty 2x 1 ml PBS a 2x 1 ml odmývacího pufru o složení 0,1% fetální hovězí sérum v PBS. Dále bylo do každé jamky přidáno 400 μl blokovacího pufru o složení 10% fetální hovězí sérum 0,3% Triton® X-100 v PBS. Destička byla inkubována 45 minut za laboratorní teploty. Blokovací pufr byl

odebrán a do jamek bylo přidáno 200 μ l ředícího roztoku, který obsahoval 3% fetální hovězí sérum a 0,3% Triton® X-100 v PBS) a 1 μ l primární myši monoklonální protilátky proti AIF. Vzorky byly inkubovány přes noc ve 4°C. Roztok protilátky byl odebrán a buňky promyty 2x 1 ml odmývacího pufru. Do 200 μ l ředícího pufru o složení 2% fetální hovězí sérum, 0,3% Triton® v PBS byl přidán 1 μ l sekundární protilátky (kuřecí anti-myší) značené Alexa Fluor® 488. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu za tmy při laboratorní teplotě. Poté byly promyty 2x 1 ml promývacího pufru. Podle potřeby byla barvena i buněčná jádra barvivem Hoechst 33258 (1 μ g/ml) v PBS. Inkubace probíhala 5 minut za tmy při laboratorní teplotě. Buňky byly následně promyty 1 ml PBS a 1 ml destilovanou vodou. Sklíčka s fixovanými obarvenými buňkami byla překlopena na podložní sklíčko s malým množstvím „anti-fade“ zpevňujícího roztoku. Okraj krycích sklíček byl fixován lakem, pro delší konzervaci vzorků. AIF bylo následně vizualizováno fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70 PROVIS.

3.9. Izolace jaderné frakce

K oddělení cytosolární a jaderné frakce byla použita souprava chemikálií firmy Biovision. 4×10^6 buněk bylo centrifugováno při 600 g a 4°C v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R. Následně k nim bylo přidáno 200 μ l roztoku CEB-A mix (CEB-A mix = 1ml roztoku CEB-A, 2 μ l proteasového inhibitoru, 1 μ l DTT). Vzorek byl 15 sekund vortexován (Scientific Industries Vortex Genie 2) při maximálních otáčkách a dále inkubován 10 minut na ledu. Poté bylo přidáno 11 μ l vychlazeného CEB-B roztoku a směs vortexována 5 sekund. Následovala inkubace na ledu po dobu 1 minuty. Dále byl vzorek znovu 5 sekund vortexován a 5 minut centrifugován při 16 000 g a teplotě 4°C. Supernatant (cytosolární frakce) byl odebrán do vychlazené zkumavky eppendorf a peleta resuspendována ve 100 μ l vychlazeného NEB mix (NEB mix = 1 ml roztoku NEB, 2 μ l proteasového inhibitoru, 1 μ l DTT). Vzorek byl vortexován 15 sekund a dále inkubován 10 minut na ledu. Poté opět vortexován 15 sekund a inkubován 10 minut, takto celkem po dobu 40 minut. Poté byl vzorek centrifugován 10 minut při 16 000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl odebrán do vychlazené zkumavky eppendorf jako jaderná frakce. Vzorky byly do dalšího použití skladovány při -80°C.

3.10. Elektroforesa

Proteiny cytosolární a nukleární frakce byly elektroforeticky rozděleny na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Rozdělovací 11% gel o objemu 10 ml obsahoval: 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8; 2,5 ml 40% AA mix (akrylamid/bisakrylamid = 29/1); 100 μ l 10% SDS; 10 μ l TEMED; 100 μ l 10% APS a destilovanou vodu. Zaostrovací 6,6% gel o objemu 5 ml byl připraven smícháním 1,25 ml 1M Tris pH 6,8; 750 μ l 40% AA mix; 50 μ l 10% SDS; 10 μ l TEMED; 50 μ l 10% APS a destilovanou vodou. Elektrodový pufr byl připraven rozpuštěním 1,51g Tris; 9,4g glycinu; 0,5g SDS ve 450 ml destilované vody. K jednotlivým vzorkům (1-5 μ g proteinu na jamku) byl přidán vzorkový pufr (o složení: Tris-HCl pH 6,8 375mM; SDS 9%; glycerol 50%; merkaptanethanol 9% a bromfenolová modř 0,03%) v poměru 1:5. Vzorky byly dále 5 minut inkubovány při teplotě 95°C. Na zaostrovací gel bylo nanášeno vždy 1 – 5 μ g proteinu na jamku. Rozdělení proteinů probíhalo v elektroforetické aparatuře firmy Sigma, elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání 80 minut při pH 8,5 a konstantním proudu 20mA na jednu elektroforetickou desku. Po elektroforetickém rozdělení byly proteiny přeneseny metodou Western blot na nitrocelulosovou membránu.

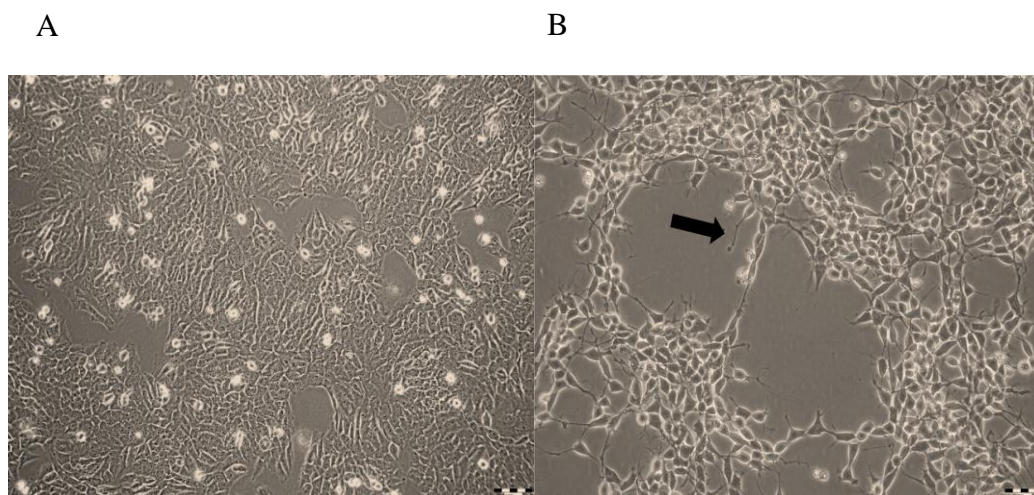
3.11. Western blot

Pro přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu byla použita aparatura firmy BIO-RAD (Mini Trans-Blot Cell). Do ní byly postupně navrstveny „fiber“, filtrační papír, nitrocelulosová membrána (0,45 μ m), elektroforetický gel, opět filtrační papír a „fiber“. Membrány spolu s „fibery“ a filtračními papíry byly ponořeny do přenosového pufru (3,05g Tris 14,5g glycinu v 10% methanolu). Přenos proteinů probíhal 80 minut při konstantním proudu 350mA. Poté byly membrány obarveny 0,2% roztokem Ponceau pro kontrolu správného přenosu a následně roztokem PBS odbarveny. Poté byly membrány 1 hodinu blokovány v blokovacím pufru (5% mléko BIO-RAD a 0,25% TWEEN 20 v PBS) za laboratorní teploty. Následovala inkubace se specifickou primární protilátkou (GADPH: 1:500; PARP: 1:500; AIF: 1:250) přes noc při 4°C za stálého míchání pomocí GYROTWISTER (Labnet). Membrány byly promyty pufrům C (1 ml 20% TWEEN 20 do 400 ml PBS) ve vakuové aparatuře SNAP i.d. (Millipore) a inkubovány 10 minut se sekundární protilátkou (kozí proti myši s HRP konjugátem 1:2000) ředěná v 0,1% mléku

v pufru C a membrána opět promyta 4x 15 ml roztoku pufru C. Poté byly membrány inkubovány 4 minuty s reagensy soupravy Immun-Star HRP Chemiluminescence Kit (BIO-RAD) smíchanými v poměru 1:1. Membrána umístěna do kazety firmy CAWO byla vyvolána na filmy MEDIX XBU v přístroji FOMA Optimax dle údajů výrobce.

4. Výsledky

Neuroblastomové nádorové buňky můžeme rozdělit do tří skupin: N – typ („neuroblastic“ neuroendokrinní prekurzor), I – typ („intermediate“), S – typ („Schwannian“ melanoblastický prekurzor) [65]. Experimenty byly prováděné na dvou lidských neuroblastomových buněčných liniích vysokého rizika SK-N-AS (S-typ) a UKF-NB-3 (N-typ). Snímky jednotlivých linií jsou na obrázku č. 12. Použité buněčné linie se od sebe liší nejen buněčným typem (S- a N-typ), ale také amplifikací genu N-myc, který je negativním prognostickým znakem tohoto nádorového onemocnění. Buněčná linie UKF-NB-3 pochází z metasáz v kostní dřeni od pacienta ve IV stádiu neuroblastomu a má amplifikaci genu N-myc [66]. Buněčná linie SK-N-AS pochází z kostní dřene pacienta také ve IV stádiu. Tato buněčná linie má pouze zmnožení genu N-myc [67].



Obrázek č. 12. Snímky lidských neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS (S-typ), (A), UKF-NB-3 (N-typ), (B), pořízené mikroskopem Olympus IX51. SK-N-AS zvětšeno 200x, UKF-NB-3 zvětšeno 400x. Černá šipka na obrázku B naznačuje charakteristické výběžky.

Obě studované neuroblastomové buněčné linie se od sebe morfologicky liší (obrázek č. 12). Linií UKF-NB-3 (N-typ) tvoří malé buňky s malým obsahem cytoplazmy. Naproti tomu linie SK-N-AS (S-typ) je charakteristická velkými plochými buňkami. Dále je pro ni typická tvorba poměrně dlouhých výběžků (naznačeno černou šipkou na obrázku č. 12 (B)). Obě buněčné linie byly kultivovány v normoxii, tedy za standardních podmínek a při nedostatku kyslíku - v hypoxii (1 % O₂). Solidní nádory nejsou obvykle dostatečně zásobeny kyslíkem, jsou v nich patrné hypoxické ostrůvky také v důsledku nedostatečné

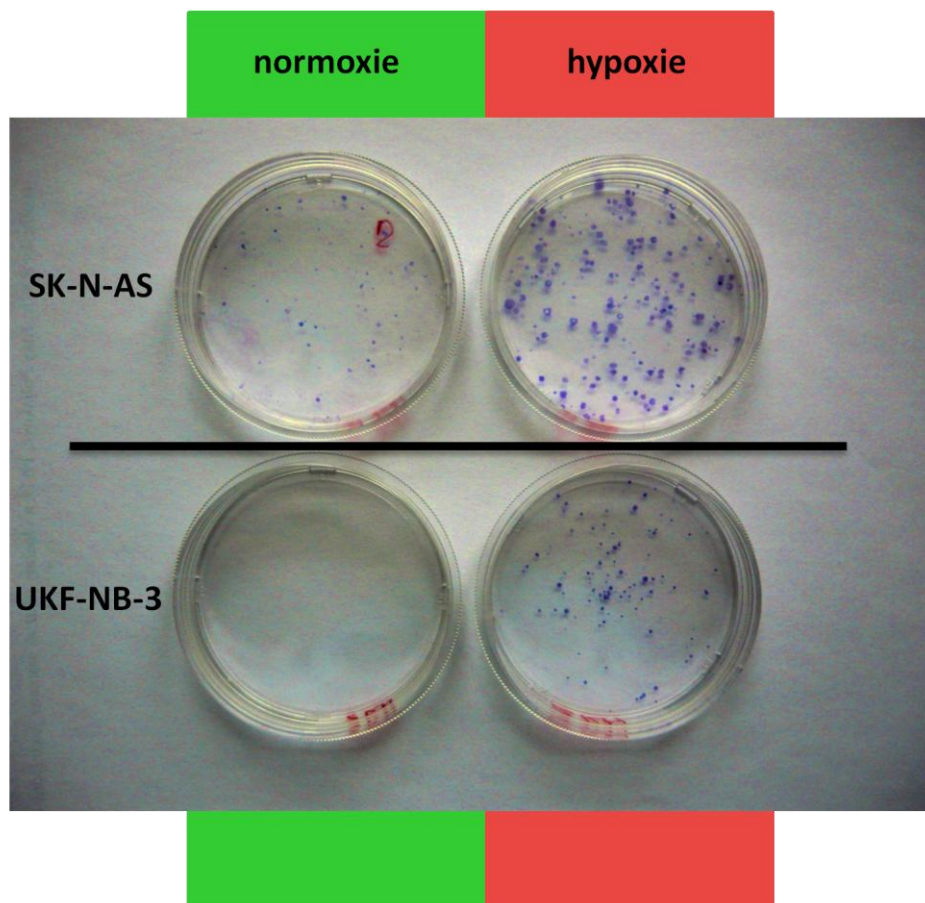
vaskularizace. Právě snížením dostupnosti kyslíku při kultivaci neuroblastomových buněčných linií jsme se snažili přiblížit biologickým podmínkám.

4.1. Vliv kultivačních podmínek na růst buněk

Do jaké míry závisí schopnost buněk tvořit kolonie v závislosti na dostupnosti kyslíku bylo zjišťováno testem klonogenicity. Neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly kultivovány za standardních, normoxických, a hypoxických (1 % O₂) podmínek. Buněčné kultury byly naředy tak, aby v každé kultivační misce bylo v 5 ml kultivačního média pouze 300 buněk. Po osmidenní kultivaci v odlišných kultivačních podmínkách byly buňky fixovány a počet kolonií, které vyrostly z jednotlivých buněk, vyhodnocen (tabulka č 3). Z obrázku č. 13 je zřejmé, že u obou linií, SK-N-AS a UKF-NB-3 byla po zafixování buněk zvýšená klonogenita v hypoxických kultivačních podmínkách. Naopak v normoxii byl růst kolonií snížen. Celkově byla více klonogenní neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS.

Tabulka č. 3. Počet klonů buněk po osmidenní kultivaci v normoxii a hypoxii (1 % O₂) neuroblastomových linií SK-N-AS a UKF-NB-3.

	počet klonů buněk	
	v normoxii	v hypoxii
SK-N-AS	71	167
UKF-NB-3	0	96

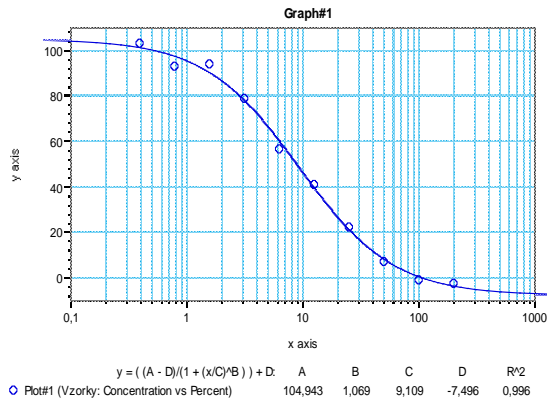


Obrázek č. 13. Kolonie buněk linií SK-N-AS a UKF-NB-3 kultivované v normoxii a hypoxii (1 % O₂). Obarvené dle Giemsy po 8 denní kultivaci.

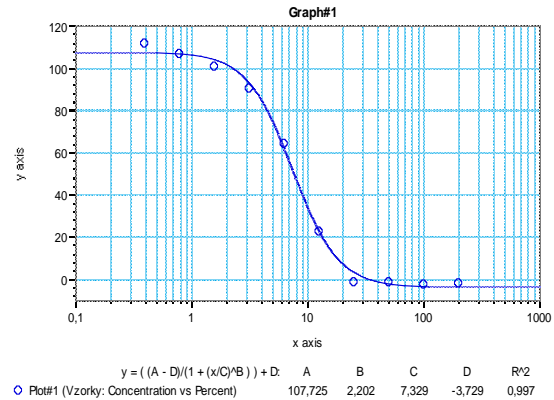
4.2. Cytotoxicita NaB a LiCl

Cytotoxicita butyrátu sodného a chloridu litného vůči lidským neuroblastomovým liniím SK-N-AS a UKF-NB-3 byla studována MTT testem. Buněčné linie byly kultivovány 72 hodin se vzrůstajícími koncentracemi jednotlivých látek. Pro porovnání a zjištění jejich účinnosti, byly buněčné linie kultivovány v normoxii a hypoxii (1 % O₂). Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena čtečkou mikroděstiček VERSA max při vlnové délce 570 nm. IC₅₀, tedy koncentrace látky při níž přežije 50% buněk, byly vyhodnoceny programem SoftMax Pro. Z obrázku č. 14 je patrné, že neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-3 (B) kultivovaná v normoxii je k LiCl senzitivnější než linie SK-N-AS (A) kultivovaná za stejných standardních podmínek.

A



B



Obrázek č. 14. Reprezentativní grafické srovnání cytotoxicity LiCl vůči lidským neuroblastomovým buněčným liniím SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) kultivovaných za standardních podmínek generované programem SoftMax Pro. Hodnota IC₅₀, byla vypočítána programem SoftMax Pro. Graf závislosti procentuálního přežití buněk na koncentraci LiCl.

Naměřené hodnoty IC₅₀ pro buněčnou linii SK-N-AS a UKF-NB-3 jsou uvedeny v tabulce č. 4. Zajímavé hodnoty koncentrací NaB byly zjištěny v hypoxické kultivaci u buněčné linie SK-N-AS. Hodnota koncentrace NaB výrazně nižší a NaB tedy účinnější v hypoxických podmínkách.

Tabulka č. 4. Hodnoty IC₅₀ jednotlivých studovaných látek v normoxii a hypoxii (1 % O₂) u buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3. Směrodatné odchylky byly počítány ze tří nezávislých experimentů.

	SK-N-AS		UKF-NB-3	
	normoxie	hypoxie	normoxie	hypoxie
IC ₅₀ (mM)				
NaB (mM)	2,08 ± 0,34	1,33 ± 0,22	0,71 ± 0,11	0,75 ± 0,21
LiCl (mM)	10,95 ± 1,64	18,41 ± 1,83	8,62 ± 0,75	10,27 ± 1,56

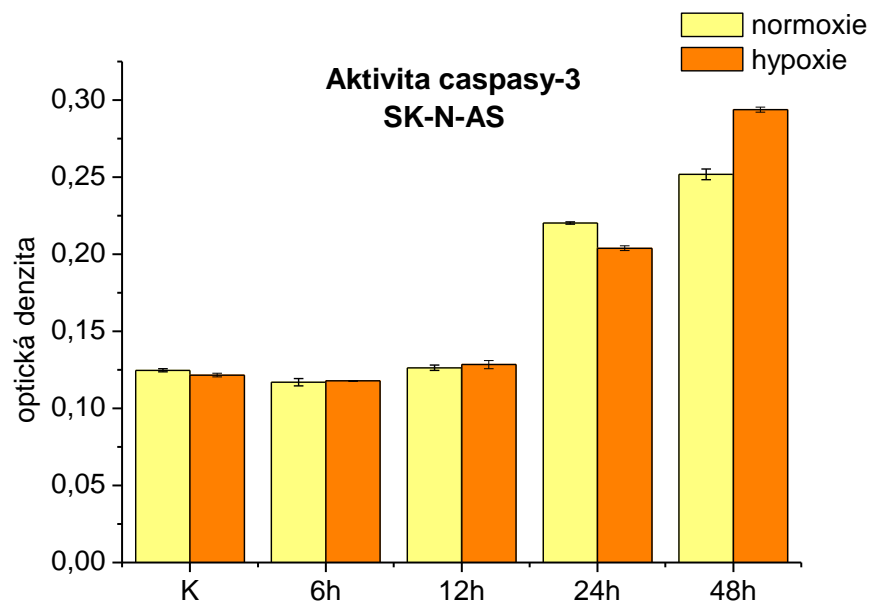
4.3. Detekce programované buněčné smrti

Buňky mohou být z lidského organismu odstraňovány několika typy programovaných buněčných smrtí (kapitola 1.2). V této diplomové práci byl kladen důraz na detekci nejčastější programované buněčné smrti – apoptózy. Programovaná buněčná smrt byla u neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 detekována několika různými metodami.

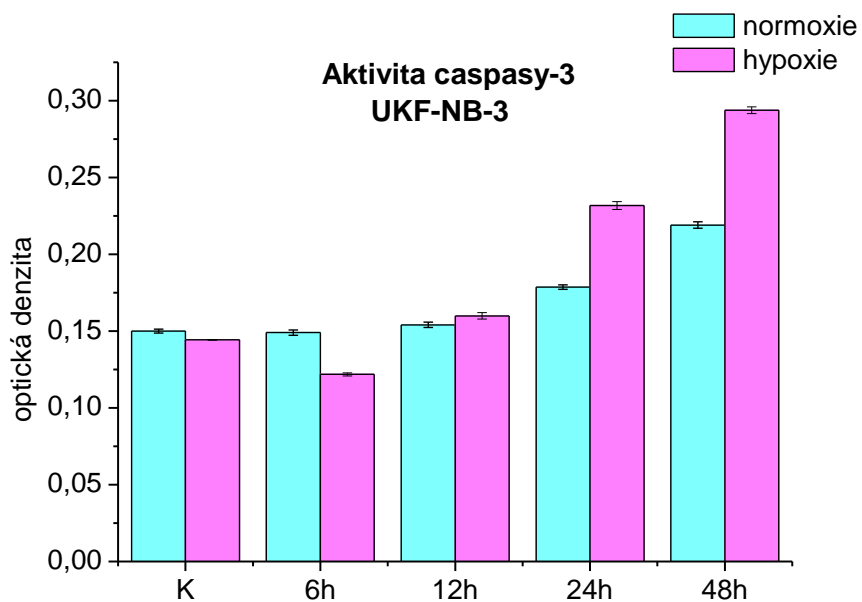
4.3.1. Časová závislost indukce buněčné smrti kyselinou valproovou

Nejprve bylo nutné zjistit, po jak dlouhé době je v buňkách zahájen proces programované buněčné smrti. Prvotním experimentem byla detekce buněčné smrti indukovaná inhibitorem HDAC – kyselinou valproovou. Buněčná smrt byla v tomto experimentu sledována na úrovni změny aktivity caspasy-3, jejíž zvýšená aktivita je charakteristickým rysem apoptózy. Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly kultivovány s 5mM respektive 2mM kyselinou valproovou 6 – 48 hodin. Vystavení buněčných linií inhibitorům HDAC, v tomto případě VPA, způsobuje, že buňky po určité době podstupují programované buněčné smrti. Aktivita caspasy-3 byla měřena v lyzátech buněk kultivovaných jak za standardních podmínek, tak v hypoxii (1 % O₂). Kontrolní vzorek byl kultivován po dobu 24 hodin.

Vliv kultivačních podmínek na aktivitu caspasy-3 byl patrný až při dlouhodobější kultivaci (24 a 48 hodin) neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS (obrázek 15 na straně 45) a UKF-NB-3 (obrázek 16 na straně 45) vystavených 5mM respektive 2mM VPA. Aktivita caspasy-3 nebyla při kratší době inkubace s kyselinou valproovou (6 a 12 hodin) ve srovnání s kontrolním vzorkem ovlivněna. Nejvyšší aktivita caspasy-3 byla detekována po 48 hodinové kultivaci u obou studovaných buněčných linií za nedostatku kyslíku (1 % O₂).



Obrázek č. 15. Aktivita caspasy-3 detekovaná po různě dlouhém vystavení neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS 5mM VPA.

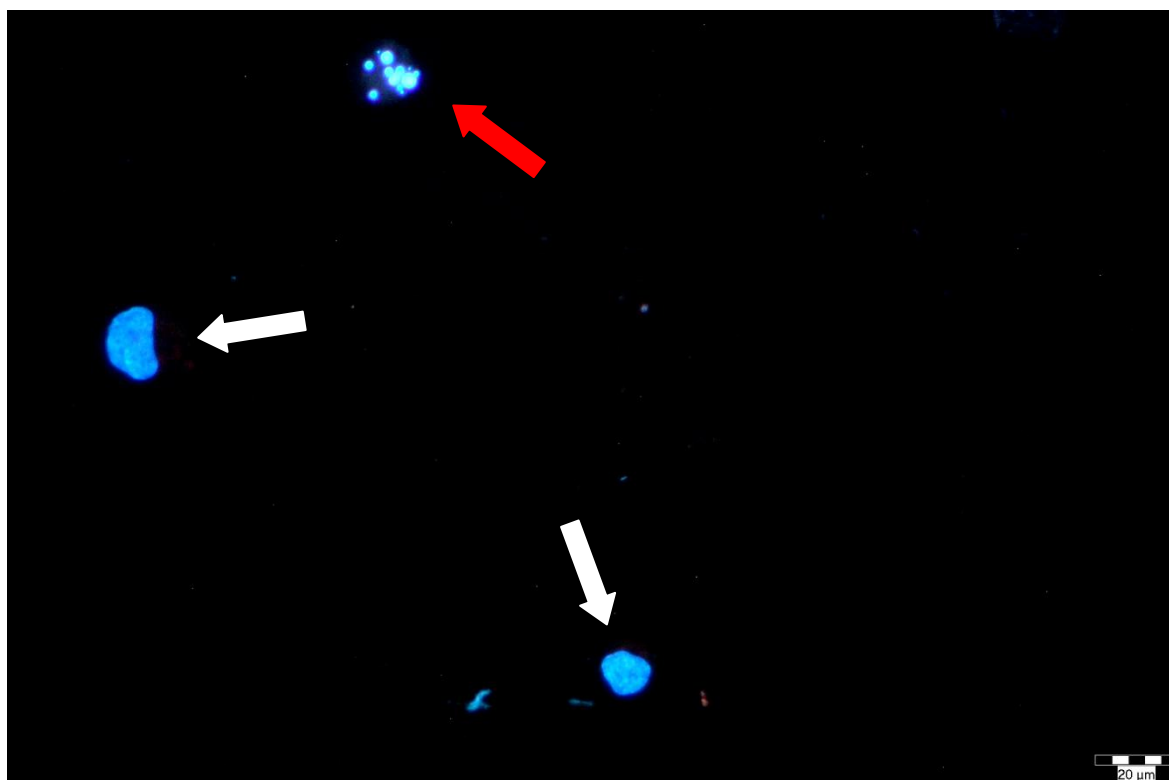


Obrázek č. 16 Aktivita caspasy-3 detekovaná po různě dlouhém vystavení neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 2mM VPA.

4.3.2. Fragmentace jader

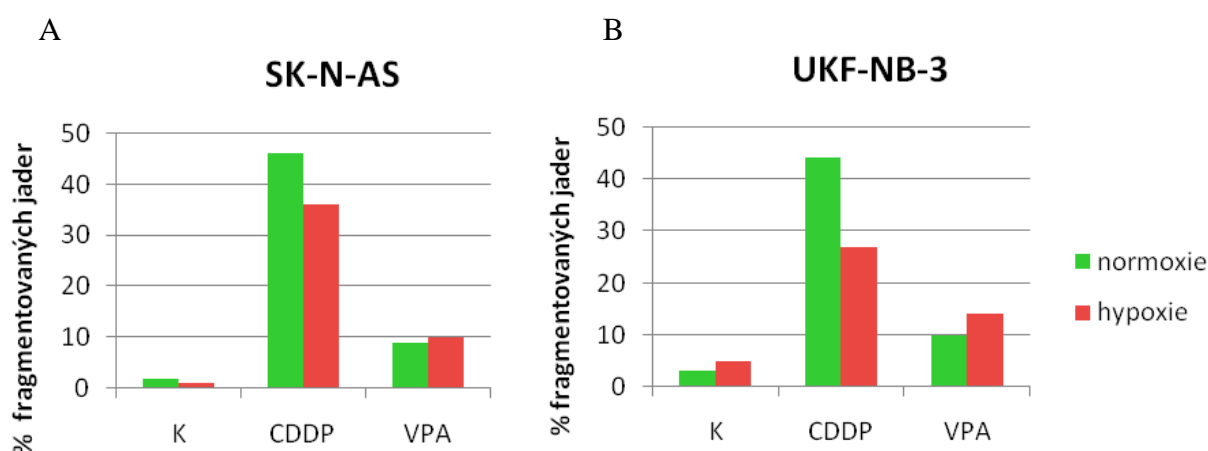
V daším kroku, pro navrhnutí rozsáhlejších experimentů, byla sledována fragmentace buněčných jader. Fragmentované jádro buňky je charakteristickým znakem pozdní apoptotické smrti. Programovaná buněčná smrt byla u neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 indukována 48 hodinovou kultivací s cisplatinou nebo kyselinou valproovou v normoxii i hypoxii (1 % O₂). CDDP byla použita jako konvenční cytostatikum, o kterém je známo, že je její účinnost v hypoxii snížena. Kyselina valproová byla použita jako zástupce inhibitorů HDAC.

Po 48 hodinové kultivaci buněk v normoxii a hypoxiii (1 % O₂) byly buňky barveny Hoechstem 33258 a buněčné suspenze pozorovány mikroskopem Olympus AX70 PROVIS. Vizualizovaná jádra byla počítána okem a rozlišena na normální a fragmentovaná (obrázek č. 17).



Obrázek č. 17. Fragmentovaná versus neporušená buněčná jádra neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 vizualizovaná barvivem Hoechst 33258 pozorovaná fluorescenčním mikroskopem. Červená šipka značí fragmentované jádro, tedy jádro zanikající buňky, bílé šipky značí neporušená jádra.

Pozorováním ve fluorescenčním mikroskopu bylo zjištěno, že u obou studovaných neuroblastomových linií, SK-N-AS a UKF-NB-3, jsou nejvíce buněčná jádra poškozena po 48 hodinové kultivaci s 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP za standardních podmínek. 48 hodinová kultivace neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 s 5mM respektive 2mM VPA v normoxii a hypoxii (1 % O₂) nevedla k tak početné fragmentaci buněčných jader jako po 48 hodinové kultivaci s CDDP. Fragmentace buněčných jader po kultivaci s kyselinou valproovou nebyla výrazně ovlivněna kultivačními podmínkami na rozdíl od 48 hodinové kultivace s CDDP (obrázek č. 18).



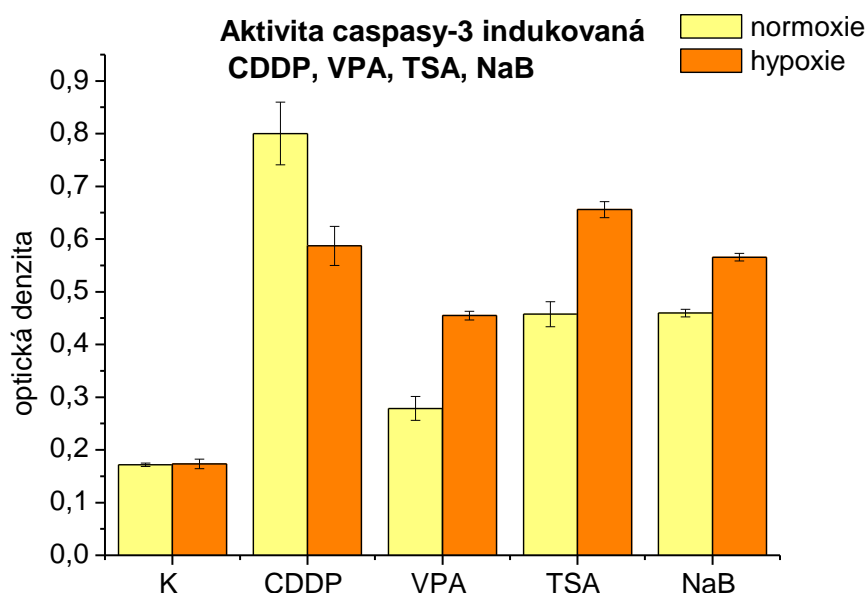
Obrázek č. 18. Zastoupení fragmentovaných buněčných jader u neuroblastomových linií SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) po 48 hodinové inkubaci s 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP nebo 5mM respektive 2mM VPA v normoxii a hypoxii (1 % O₂).

4.3.1. Indukce buněčné smrti cisplatinou, kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným

Z předchozích experimentů byla jako vhodná doba pro studium buněčné smrti zvolena 48 hodinová inkubace neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 s konvenčně používaným cytostatikem cisplatinou a inhibitory histondeacetylasy kyselinou valproovou, trichostatinem A a butyrátem sodným. Buněčná smrt byla v lyzátech buněk detekována změnou aktivity caspasy-3, která koreluje s rozsahem programované buněčné smrti. Dále byl sledován vliv kultivačních podmínek na indukcii buněčné smrti. Lidské

neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly 48 hodin vystaveny studovaným látkám: 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP, 5mM respektive 2mM VPA, 200nM respektive 200nM TSA a 5mM respektive 2mM NaB nejen za standardních kultivačních podmínek, ale také v hypoxii (1 % O₂).

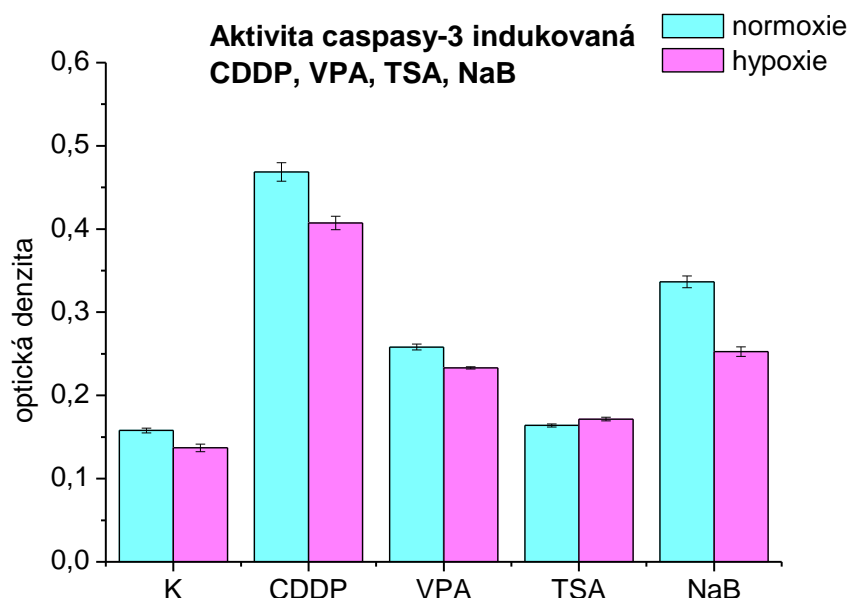
Aktivita caspasy-3, (obrázek č. 19), je po kultivaci neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS se všemi studovanými inhibitory histondeacetylasy (VPA, TSA a NaB) v hypoxii (1 % O₂) jednoznačně vyšší. Naopak kultivace této buněčné linie s cisplatinou za nedostatku kyslíku (1 % O₂) snížila aktivitu caspasy-3 ve srovnání s kultivací za standardních podmínek. To odpovídá skutečnosti, že buňky jsou při nedostatečném zásobení kyslíkem k cisplatině méně citlivé.



Obrázek č. 19. Aktivita caspasy-3 neuroblastomové linie SK-N-AS indukovaná 48 hodinovou inkubací s 5 μ g/ml CDDP, 5mM VPA, 200nM TSA a 5mM NaB v normoxii a hypoxii.

Druhá neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-3 se v obdobném experimentu chovala odlišně (obrázek č. 20 na straně 49). Obecně je tato linie k podávaným látkám citlivější ve srovnání s neuroblastomovou linií SK-N-AS, proto byla buněčná kultura UKF-NB-3 48 hodin vystavena nižším koncentracím sledovaných látek: 2 μ g/ml CDDP, 2mM VPA, 200nM TSA a 2mM NaB. Nedostatek kyslíku (1 % O₂) snižoval aktivitu caspasy-3 nejen po 48 hodinové kultivaci UKF-NB-3 s 2 μ g/ml konvenčního cytostatika CDDP, ale i po kultivaci s inhibítorem histondeacetylasy butyrátem sodným. Kultivační podmínky

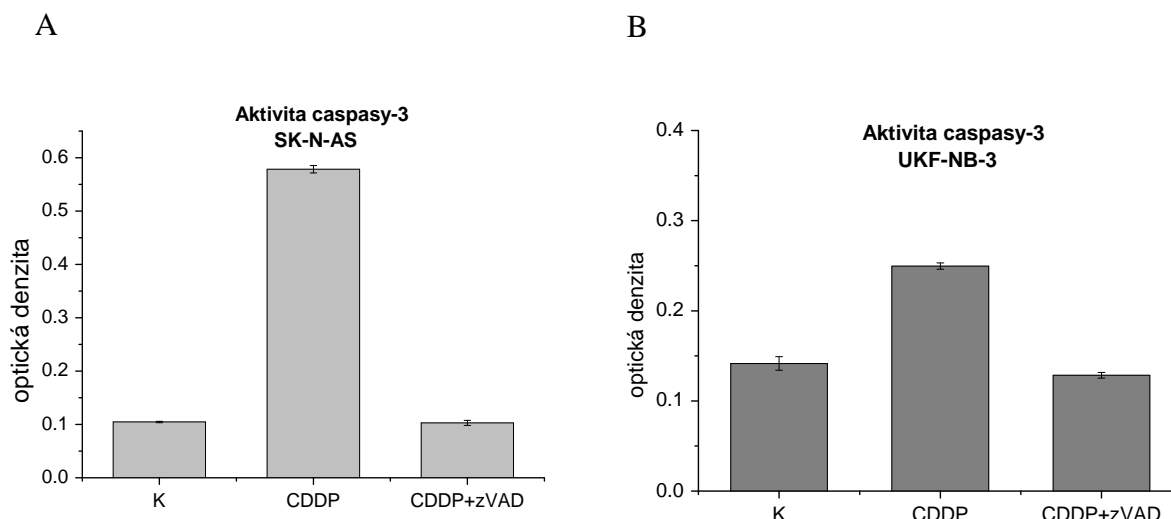
neměly téměř žádný vliv na aktivitu caspasy-3 po 48 hodinovém vystavení UKF-NB-3 dalším inhibitorům histondeacetylasy (VPA a TSA).



Obrázek č. 20. Aktivita caspasy-3 neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 indukovaná 48 hodinovou inkubací s 2 μ g/ml CDDP, 2mM VPA, 200nM TSA a 2mM NaB v normoxii a hypoxii (1 % O₂).

4.3.1. Vliv pan-caspasového inhibitoru Z-VAD-fmk na aktivitu caspasy-3

Pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk v dostatečné koncentraci v buňkách ireversibilně inhibuje aktivitu všech caspas. Nejprve jsme experimentálně zjišťovali, zda 20 μ M koncentrace Z-VAD-fmk dostatečně inhibuje aktivitu caspasy-3. Neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly kultivovány za standardních podmínek 48 hodin s konvenčně používaným cytostatikem cisplatinou o koncentraci 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml, která aktivitu caspasy-3 výrazně zvyšuje. Z obrázku č. 21 na straně 50 je patrné, že 20 μ M Z-VAD-fmk snižuje aktivitu caspasy-3 obou neuroblastomových buněčných linií na úroveň kontrolních vzorků po 48 hodinovém vystavení buněčných kultur 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP v kombinaci s 20 μ M Z-VAD-fmk.



Obrázek č. 21. Aktivita caspasy-3 neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) po 48 hodinové kultivaci za standardních podmínek. Aktivita caspasy-3 byla u buněčných linií indukována 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP. Aktivita caspasy-3 byla snížena na úroveň kontrolního vzorku u buněk vystavených 48 hodin kombinaci 5 μ g/ml respektive 2 μ g/ml CDDP v kombinaci s 20 μ M Z-VAD-fmk.

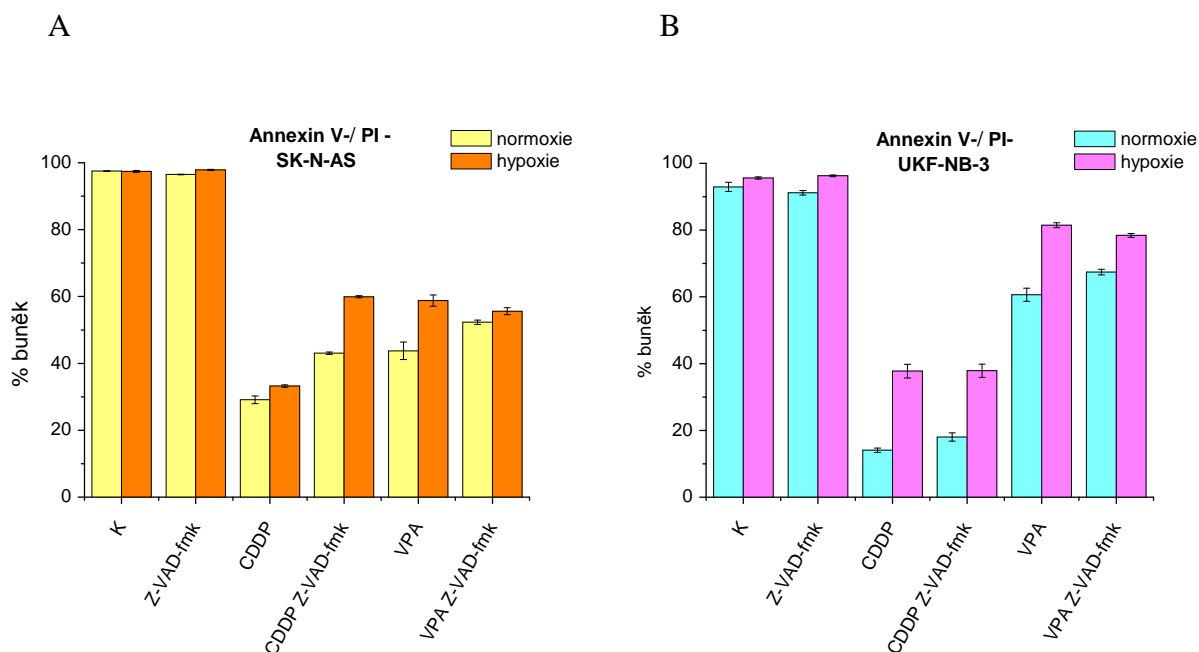
4.3.2. Detekce apoptózy po pan-caspasové inhibici

Pro rozlišení buněčné smrti na caspasach závislé od smrti na caspacach nezávislé byl použit pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk. Ten ireversibilně inhibuje všechny caspasy v buňce. V této části diplomové práce byla apoptóza detekována průtokovým cytometrem Becton Dickinson FACS Calibur pomocí značení membránového proteinu fosfatidylserinu Annexinem V s fluorescenční značkou FITC. Pro rozpoznání časných a pozdních apoptotických procesů v buňce se používá současně značení propidium jodidem. V časných stádiích apoptózy dochází k externalizaci fosfatidylserinu z cytosolární do extracelulární části membrány, kde je vizualizován fluorescenčně značeným Annexinem V. V pokročilém stádiu apoptózy propidium jodid vstupuje do buňky, jejíž membrána je permeabilizována a je interkalován do DNA, kde jej lze vizualizovat. Platí tedy, že buňky Annexin V s FITC negativní i propidium jodid negativní, jsou živé. Buňky ve stádiu časně apoptózy jsou Annexin V s FITC pozitivní ale propidium jodid negativní. Pokud jsou buňky Annexin V s FITC pozitivní a zároveň propidium jodid pozitivní, jsou ve fázi pozdní apoptózy nebo nekrotické [68]. Při vyhodnocení průtokovým cytometrem bylo

sledováno procentuální zastoupení jednotlivých populací buněk neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3.

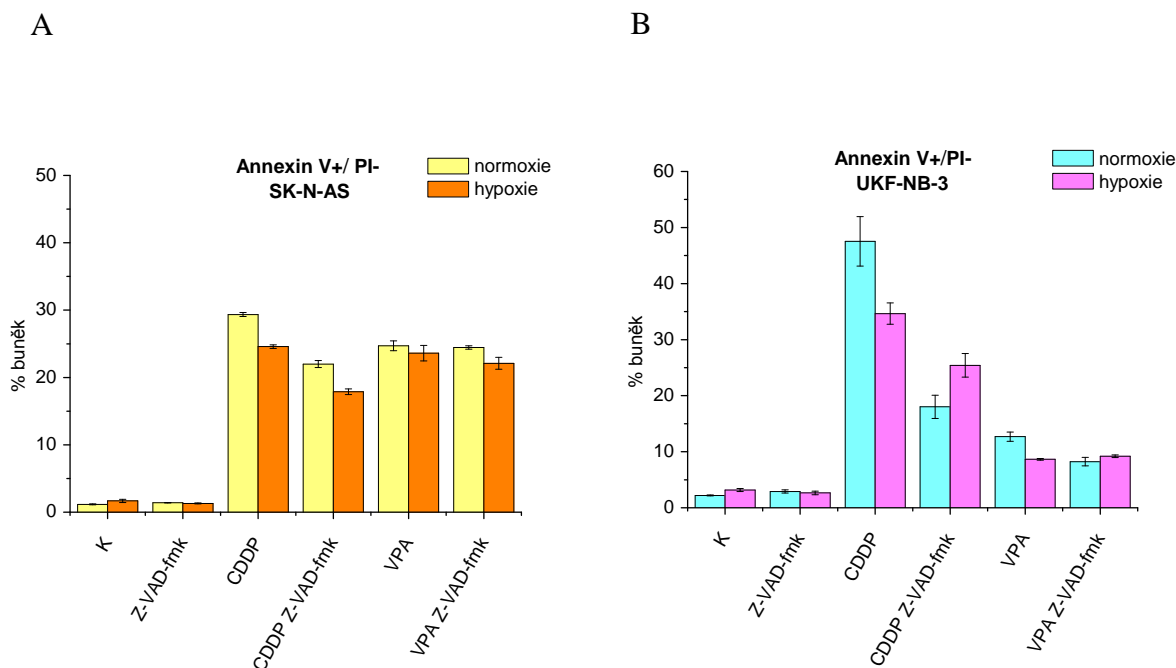
Lidské neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byly kultivovány jak za standardních kultivačních podmínek, tak v hypoxii (1 % O₂). Jednotlivé vzorky obou buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 byly připraveny 48 hodinovou kultivací s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 mM respektive 2 mM VPA a 5 mM respektive 2 mM VPA v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk.

Samotný pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk v koncentraci 20 μM, s nímž byly neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 48 hodin kultivovány, neměl na viabilitu buněk vliv (obrázek č. 22 na straně 52). Naopak 48 hodinová kultivace s 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP vyvolala masivní umírání buněk, zvláště u buněčné linie UKF-NB-3 v normoxii. Buňky neuroblastomové linie SK-N-AS, které byly 48 hodin vystavené kombinaci 5 μg/ml CDDP a 20 μM Z-VAD-fmk, přežily přibližně o 14 % respektive 26 % více, než buňky vystavené samotné cisplatině v normoxii či v hypoxii (1 % O₂) (obrázek č. 22 (A) na straně 52). Vliv pan-caspasového inhibitoru Z-VAD-fmk v kombinaci s cisplatinou (2 μg/ml) na kultivaci druhé neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 nebyl v normoxii statisticky významný a při kultivaci v nedostatku kyslíku (1 % O₂) byla viabilita buněk stejná jako při kultivaci UKF-NB-3 pouze s cisplatinou (obrázek č. 22 (B) na straně 52). 48 hodinová kultivace neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS za standardních podmínek s 5 mM VPA v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk vedla k přibližně 9% nárůstu viability ve srovnání s vystavením pouze 5 mM VPA. Rozdíl ve viabilitě neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS kultivované s 5 mM VPA, respektive s 5 mM VPA v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk v normoxii a za snížené dostupnosti kyslíku (1 % O₂) nebyl nestatisticky významný (obrázek č. 22 (A) na straně 52). Obdobných výsledků bylo dosaženo kultivací neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 s 2 mM VPA respektive 2 mM VPA v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk s tím rozdílem, že celková buněčná viabilita byla vyšší (obrázek č. 22 (B) na straně 52).



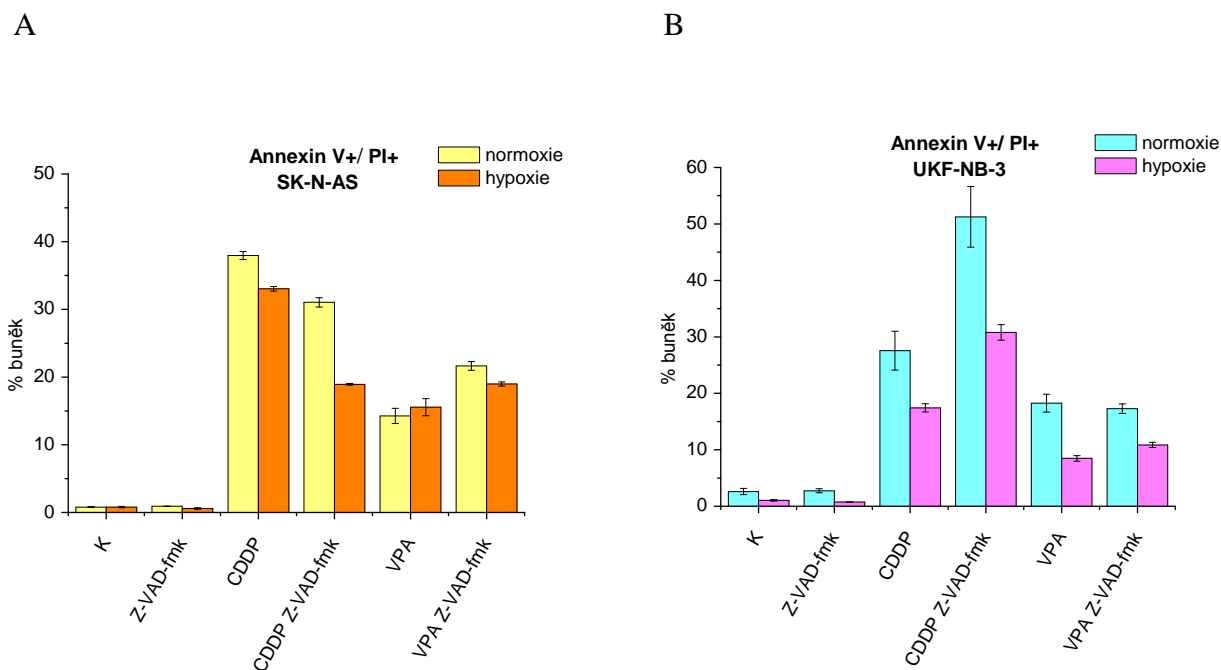
Obrázek č. 22. Viabilita neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) po 48 hodinové kultivaci v normoxii a hypoxii (1 % O₂) s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP; 5 μg/ml respektive 2 μg/ml CDDP v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk; 5 mM respektive 2 mM VPA a 5 mM respektive 2 mM VPA v kombinaci s 20 μM Z-VAD-fmk.

Procentuální zastoupení buněk lidských neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 Annexin V FITC pozitivních a zároveň propidium jodid negativních, které odpovídají časné apoptóze odpovídalo viabilitě buněk (obrázek č. 22). Vyšší viabilita SK-N-AS kultivovaných v hypoxii (1 % O₂) koreluje s nižším zastoupením buněk v časné apoptóze (obrázek č. 23 na straně 53). Časná apoptóza UKF-NB-3 buněk byla nejmasivnější při kultivaci s 2 μg/ml CDDP v normoxii, necelých 50 % buněk. V kultivaci s kombinací 2 μg/ml CDDP a 20 μM Z-VAD-fmk byla časná apoptóza zaznamenána u neuroblastomové linie UKF-NB-3 více v hypoxii. Procentuální zastoupení UKF-NB-3 buněk po 48 hodinové kultivaci s 2 mM VPA a 2 mM VPA se 20 μM Z-VAD-fmk bylo podobné (obrázek č. 23 (B) na straně 53). Dále bylo zjištěno, že neuroblastomové buňky SK-N-AS kultivované s 20 μM Z-VAD-fmk v kombinaci s 5 mM VPA mají přibližně stejné procentuální zastoupení jako buňky kultivované bez přidání pan-caspasového inhibitoru Z-VAD-fmk (obrázek č. 23 (A) na straně 53). To může znamenat, že časná apoptóza probíhá při inhibici caspas nezávisle na caspasach.



Obrázek č. 23. Procentuální zastoupení Annexin V FITC pozitivních a zároveň propidium jodid negativních buněk neuroblastomové linie SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) kultivovaných 48 hodin za standardních podmínek a v hypoxii (1 % O₂) s 20μM Z-VAD-fmk; 5μg/ml respektive 2μg/ml CDDP; 5μg/ml respektive 2μg/ml CDDP v kombinaci s 20μM Z-VAD-fmk; 5mM respektive 2mM VPA a 5mM respektive 2mM VPA v kombinaci s 20μM Z-VAD-fmk.

Na následujícím obrázku č. 24 na straně 54 je procentuální zastoupení neuroblastomových buněk SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B), Annexin V FITC, ale i propidium jodid pozitivních, tedy buněk, které jsou v pozdní fázi apoptózy nebo nekrotické. Kultivace neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS s pan-caspasovým inhibitorem Z-VAD-fmk v kombinaci s 5μg/ml CDDP snížila procentuální zastoupení buněk v pozdní apoptotické fázi jak v normoxii, tak hypoxii (1 % O₂) (obrázek č. 24 (A) na straně 54). Je tedy možné, že cisplatina vyvolává buněčnou smrt závislou na caspasach. Ukázalo se, že kombinace 5mM VPA s 20μM Z-VAD-fmk vedla narozdíl od kultivace neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS jen s 5mM VPA k mírnému zvýšení počtu buněk v pozdní apoptóze, což opět přispívá k hypotéze, že tyto buňky umírají na caspasach nezávislou cestou (obrázek č. 24 (A) na straně 54).



Obrázek č. 24. Procentuální zastoupení Annexin V FITC pozitivních a zároveň propidium jodid pozitivních buněk neuroblastomové linie SK-N-AS (A) a UKF-NB-3 (B) kultivovaných 48 hodin za standardních podmínek a v hypoxii (1 % O₂) s 20μM Z-VAD-fmk; 5μg/ml respektive 2μg/ml CDDP; 5μg/ml respektive 2μg/ml CDDP v kombinaci s 20μM Z-VAD-fmk; 5mM respektive 2mM VPA a 5mM respektive 2mM VPA v kombinaci s 20μM Z-VAD-fmk.

Buňky neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 byly ve fázi pozdní apoptózy nejvíce procentuálně zastoupeny u vzorku kultivovaného 48 hodin za standardních podmínek s 2μg/ml CDDP s přidavkem pan-caspasového inhibitoru. U neuroblastomové kultury UKF-NB-3 kultivované s 2μg/ml CDDP došlo k výraznému poklesu buněk Annexin V FITC, ale i propidium jodid pozitivních. Vzorky kultivované s 2mM VPA a 2mM VPA se 20μM Z-VAD-fmk byly podobně procentuálně zastoupeny (obrázek č. 24 (B)).

4.3.3. Detekce translokace AIF do buněčného jádra

Předchozí experimenty ukázaly, že kyselina valproová indukuje buněčnou smrt i po inhibici všech caspas pan-caspasovým inhibitorem Z-VAD-fmk. Z toho lze usoudit, že programovaná buněčná smrt vyvolaná 48 hodinovou kultivací buněčných linií SK-N-AS

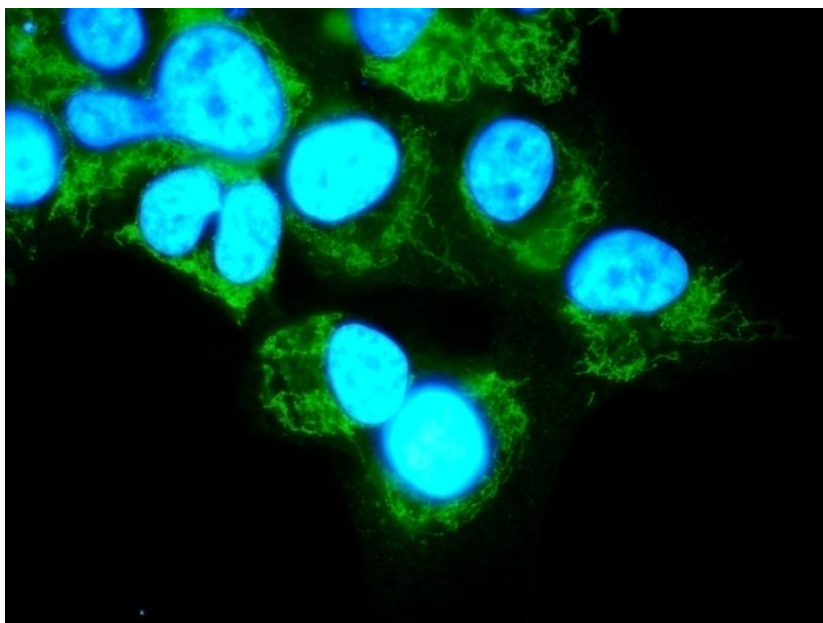
a UKF-NB-3 s 5mM respektive 2mM VPA v kombinaci s 20 μ M Z-VAD-fmk je na caspasach nezávislá. Buněčná smrt nezávislá na caspasach může probíhat několika drahami. Jednou z nich je translokace AIF z mitochondrií do buněčného jádra.

4.3.3.1. Vizualizace AIF

Apoptóza byla detekována imunofluorescenčním barvením a pozorováním jednotlivých buněk neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS fluorescenčním mikroskopem Olympus AX70 PROVIS. Buněčná linie SK-N-AS byla pro tento experiment vybrána pro velký objem buněk.

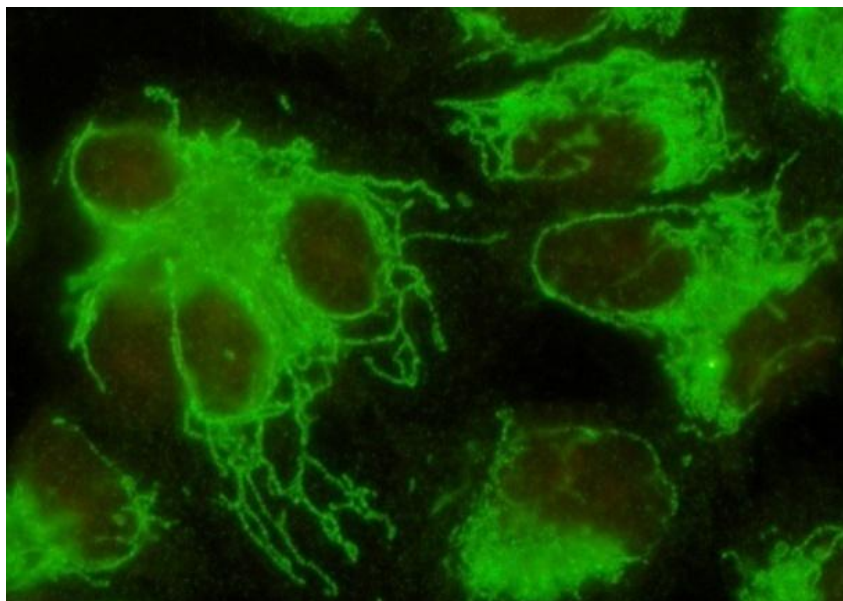
V tomto experimentu byla buněčná smrt indukována 48 hodinovou kultivací s 5, 10 a 15 mM VPA nebo 5 μ g/ml CDDP v normoxických podmínkách. Po fixaci buněk nebyla u žádného vzorku fluorescenčním mikroskopem zaznamenána translokace AIF do jádra (obrázky č. 25 a 26 na straně 55 a 56). Buněčná jádra jsou barvena Hoechstem 33258.

V dalším experimentu byla neuroblastomová linie SK-N-AS inkubována pouze s 5mM VPA po dobu 1, 2, 4 a 8 hodin. Buňky byly kultivovány v normoxii i hypoxii (1 % O₂). Po fixaci buněk byla zaznamenána ve vzorku po 4 hodinové kultivací s 5mM VPA v normoxii pro velmi minoritní počet buněk případná translokace AIF do jádra (obrázek č. 27 na straně 56).

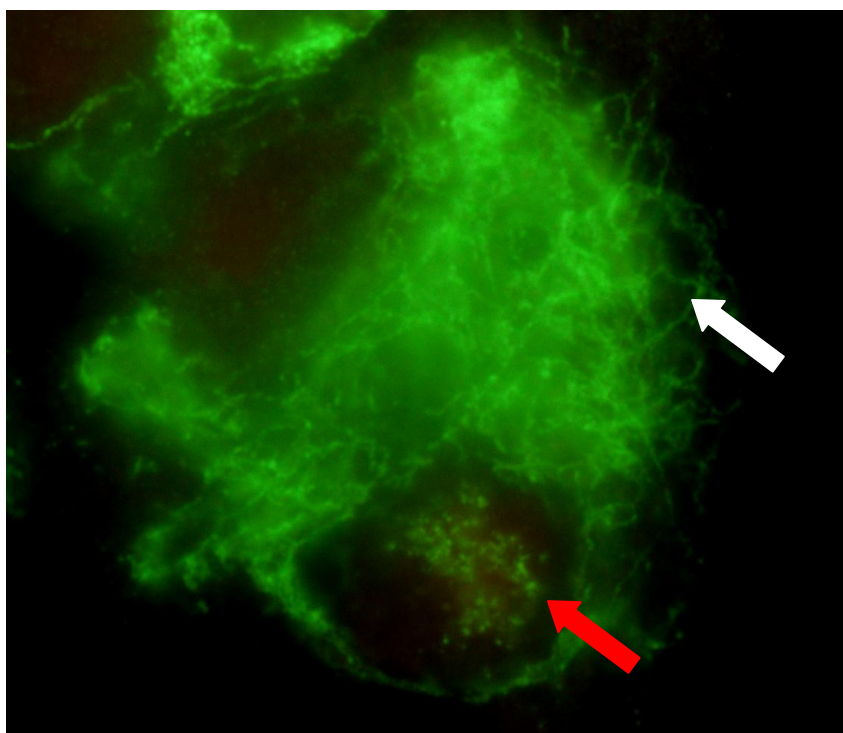


Obrázek č. 25. Imunofluorescenčně vizualizovaný AIF (zeleně) u neuroblastomové linie SK-N-AS. Modře jsou vizualizovaná jádra buněk. Zvětšeno 1000x.

Na obrázku č. 26 jsou buňky linie SK-N-AS s vizualizovaným AIF, které tvoří charakteristické řetízky.



Obrázek č. 26. Vizualizace AIF pomocí primární a sekundární protilátky u neuroblastomové linie SK-N-AS. Zvětšeno 1000x.

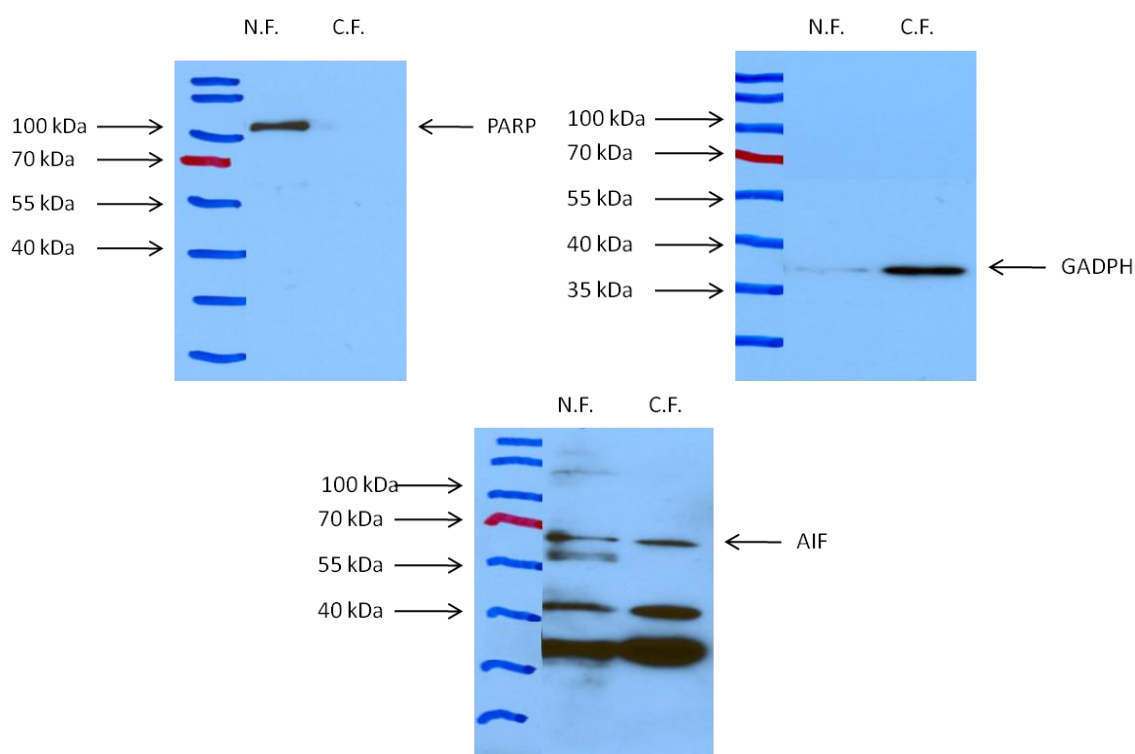


Obrázek č. 27. Vizualizace předpokládané translokace AIF do jádra buněčné linie SK-N-AS znázorňuje červená šipka. Bílá šipka znázorňuje AIF v prostoru cytoplasmatickém po 4 hodinové kultivaci s 5 mM VPA v normoxii. Zvětšeno 2000x.

4.3.3.1. Detekce AIF v nukleární a cytosolární frakci SK-N-AS

U neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS byla sledována exprese proteinu AIF v různých buněčných kompartmentech. Buňky byly lyzovány s následným oddělením cytosolární a nukleární frakce. Běžně je AIF lokalizován v mitochondriích, tedy v cytosolární frakci. Při jeho uvolnění a translokaci do jádra buňka podstupuje proces apoptózy, která nemusí být na caspasach závislá.

V izolované nukleární a cytosolární frakci neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS byla stanovena koncentrace proteinů. Proteiny byly dále elektroforeticky rozděleny a přeneseny na nitroceluloseovou membránu Western blotem. Pro kontrolu správné izolace cytosolární a nukleární frakce byly použity protilátky proti glycerinaldehydfosfát dehydrogenase (GADPH), kontrola cytosolární frakce a protilátka proti PARP jako kontrola nukleární frakce. Přítomnost AIF byla zjištěna v cytosolární i nukleární frakci (obrázek č. 28).



Obrázek č. 28. Přítomnost AIF v nukleární a cytosolární frakci neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS. Čistota nukleární a cytosolární frakce byla ověřena pomocí protilátky proti GADPH a PARP.

5. Diskuse

V popředí vědeckých zájmů je již dlouhou dobu výzkum nádorových onemocnění a procesů nekontrolovaného dělení buněk. Neuroblastomy, nádory vyskytující se nejčastěji u dětí, jsou jedním z nich. Primární výzkum může odhalit některé neznámé molekulární mechanismy existence nádorových buněk a přispět tak ke zlepšení léčebných postupů u pacientů se špatnými prognostickými znaky.

Jsou popsány tři morfologické typy neuroblastomových buněk: N-, S- a I-typ [65]. Pro experimenty byly použity dvě rozdílné neuroblastomové linie zastupující dva z nich, tedy linie SK-N-AS (S-typ) a linie UKF-NB-3 (N-typ). Buňky I-typu jsou velmi variabilní, tvoří mezník mezi S- a N-typem. Neuroblastomová buněčná linie SK-N-AS má zmnožení genu N-myc, zatímco buněčná linie UKF-NB-3 má N-myc amplifikovaný. N-myc je transkripční faktor a DNA vazebný protein, podílí se především na regulaci transkripční aktivity a je negativním prognostickým faktorem.

Neuroblastomové buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 se chovaly při kultivaci za standardních podmínek a za nedostatku kyslíku (1 % O₂) rozdílně. Testováním klonogenicity bylo zjištěno, že u obou studovaných linií SK-N-AS i UKF-NB-3 vedla osmidenní kultivace v hypoxii (1 % O₂) ke vzniku vyššího počtu buněčných kolonií ve srovnání s počtem kolonií tvořených za standardních kultivačních podmínek. Tento fakt může být částečně vysvětlen změnou metabolismu buněk při nedostatku kyslíku z aerobního na anaerobní, kdy dochází k expresi mnoha faktorů, které se podílí na přežití buňky ve stresovém prostředí. Mnoho důležitých genů je transkripčně aktivováno HIF-1 α , respektive komplexem HIF. Předpokládá se, že HIF-1 α je zodpovědný za zvýšení viability buněk v hypoxii [69]. U linie UKF-NB-3 nedošlo v normoxii k nárůstu kolonií buněk, i když jejich výchozí počet byl stejný jako u linie SK-N-AS. Může to být dáno rozdílným buněčným typem a tím i schopností přežít v nepříznivých podmínkách, kdy jsou buňky rozptýleny v kultivačním médiu daleko od sebe.

V nádorových ložiscích se často nacházejí místa, která jsou charakteristická nedostatečným zásobením kyslíkem v důsledku rychlého růstu a neadekvátní angiogeneze. Nedostatečné zásobením kyslíkem indukuje změnu metabolismu buněk a změnu exprese některých genů (např. MDR1) a tím se buňky mohou stávat rezistentní vůči konvenční léčbě chemoterapeutiky. Snahou tedy je najít látky, které se podílejí na smrti buněk v normoxii, ale také jsou přinejmenším stejně účinné v hypoxii. Jednou ze skupiny těchto látek mohou být inhibitory HDAC. Mezi ně patří například kyselina valproová (kapitola

1.1.5), trichostatin A či butyrát sodný. Trichostatin A a butyrát sodný, působí v buňce mnoha mechanismy jako je zastavení buněčného cyklu, indukce apoptózy a diferenciacie u změněných buněk [70, 71]. Trichostatin A je selektivní a reversibilní inhibitor, účinný ve velmi nízkých koncentracích (řádově v nanomolech) [72]. Bylo zjištěno, že v hypoxických podmínkách by mohl destabilizovat HIF-1 α a tím například ve zvýšené míře indukovat apoptózu. Pro zjištění vhodných koncentrací vybraných látek (NaB a LiCl) byl použit MMT test. Chlorid litný sice nepatří do skupiny inhibitorů HDAC ale je používán k léčbě maniodepresivních psychos [73]. Bylo zjištěno, že kultivace buněk s touto látkou ovlivňuje transkripční aktivitu genů důležitých pro regulaci apoptózy [74]. LiCl ovlivňuje v buňce GSK-3 („glykogen synthese kinase-3“), která fosforyluje několik buněčných substrátů, jako právě například transkripční faktory (fosforylací inaktivuje HIF-1, tím se podobá inhibitorům HDAC). Je také možné že LiCl indukuje apoptózu autokriním zvýšením TNF- α [75, 76]. Z naměřených dat je patrné, že cytotoxicita NaB vůči neuroblastomové buněčné linii SK-N-AS byla za standardních kultivačních podmínek nižší než v hypoxii (1 % O₂). Je tedy možné, že právě NaB, je pro linii S-typu účinnější v hypoxii než v normoxii. Ostatní látky v experimentech použité byly stejně účinné nebo účinnější za standardních kultivačních podmínek. LiCl byl z dalšího testování vyloučen, protože nevykazoval výrazně jiné vlastnosti než klasické inhibitory histondeacetylas.

Koncentrace natrium butyrátu užívaná v dalších experimentech je kongruentní se získanými výsledky MTT testů. Koncentrace dalších studovaných látek (CDDP, VPA, TSA) pro buněčné linie SK-N-AS a UKF-NB-3 byla použita z dřívějších laboratorních experimentů. Bylo nutné zjistit vhodnou dobu kultivace pro kvantifikaci buněčné smrti. Obě linie byly kultivovány 6, 12, 24 a 48 hodin v normoxii a hypoxii (1 % O₂). Buněčná smrt byla nejdříve indukována VPA, inhibitorem HDAC. Po sklizení buněk a přípravě vzorků, byla stanovena aktivita caspasy-3. Její aktivita je často spojována s pozdní fází apoptózy, je zodpovědná za velkou část enzymatického štěpení při apoptóze [77]. V buňkách obou buněčných linií je přítomna u kontrol bazální hodnota aktivita caspasy-3. Bylo zjištěno, že s prodlužující se dobou inkubace s kyselinou valproovou, roste aktivita caspasy-3. Zajímavé je, že v tomto experimentu se u obou linií zvýšila aktivita caspasy-3 při kultivaci se sníženou dostupností kyslíku (1 % O₂). Ta byla vůbec nejvyšší právě v hypoxii po 48 hodinové kultivaci. Je možné, že míra acetylace histonů byla v této době nejpříznivější a chromatinová struktura byla příznivě rozvolněná a přístupná pro transkripční faktory. Pro další experimenty byla vybrána nejvhodnější doba kultivace

buněk 48 hodin. Zajímavé by bylo sledovat také dlouhodobější vývoj aktivity caspasy-3 u buněčných linií. Takový experiment je ovšem technicky velmi těžko proveditelný z důvodu pokrytí celé kultivační plochy buňkami a vyčerpání živin v médiu.

Po zjištění koncentrací studovaných látek a vhodné kultivační doby, byly provedeny experimenty, kdy byl sledován vliv vybraných látek (CDDP, VPA, TSA, NaB) na míru buněčné smrti. Ta byla detekována několika metodami. První byl proveden experiment pouze s CDDP a VPA a sledována fragmentace jader. Buněčné linie kultivované v normoxii a hypoxii s příslušnými koncentracemi CDDP a VPA po dobu 48 hodin byly barveny Hoechstem. Jednotlivé vzorky byly vyhodnoceny okem po zvětšení mikroskopem. Častější fragmentace jader byla přítomna ve vzorcích obou neuroblastomových buněčných linií po 48 hodinové kultivaci s cisplatinou za standardních podmínek. Kultivace s VPA, vedla ke srovnatelné fragmentaci jader jak v normoxii, tak hypoxii. Fragmentace jádra může být považována za charakteristický znak pokročilého stádia apoptózy. Je zajímavé, že pro kultivace s VPA byla účinnost přibližně stejná v normoxii i hypoxii. Pro ověření tohoto výsledku byla použita další metoda a do experimentu zahrnuty také TSA a NaB (další inhibitory HDAC).

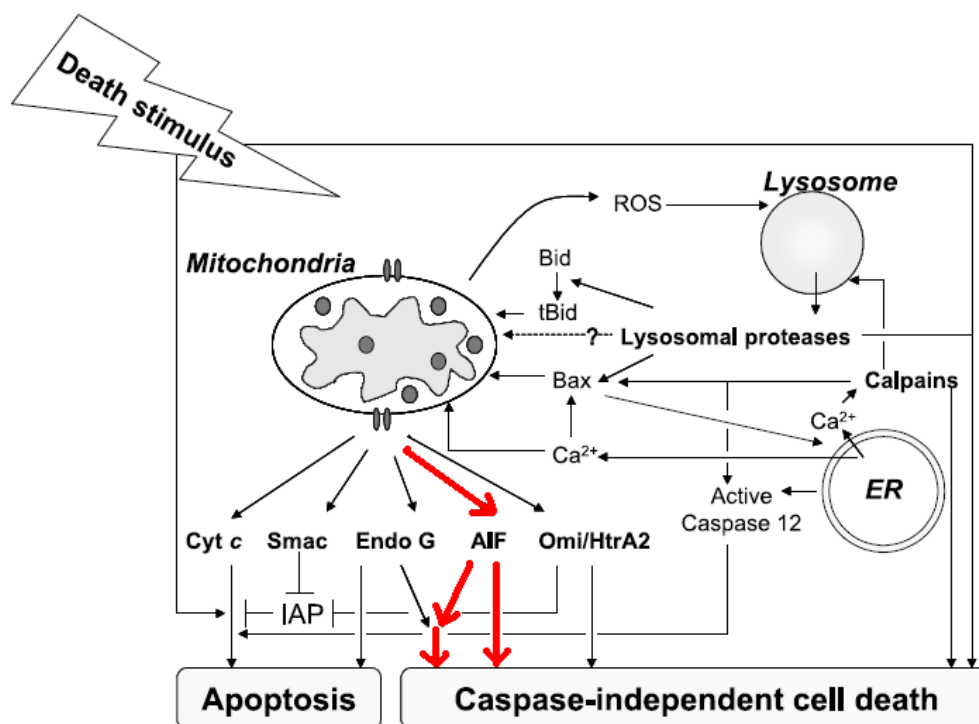
V dalším experimentu pomocí vyhodnocení aktivity caspasy-3, kdy bylo opět předpokládáno, že její aktivita koreluje s buněčnou smrtí, byly porovnány hodnoty aktivit jednotlivých látek v normoxii a hypoxii. Bylo zjištěno, že u buněčné linie SK-N-AS se zvýšila aktivita caspasy-3 v hypoxii oproti normoxii a kontrole u kultivací s VPA, TSA a NaB. Jejich účinnost v indukci apoptózy by mohla být vyšší právě v hypoxii. VPA, TSA a NaB jsou inhibitory HDAC a mohou v normoxii indukovat zvýšení exprese některých tumor supresorových genů, které může probíhat také v hypoxii. Za hypoxických podmínek mohou inhibitory HDAC snižovat navíc aktivitu transkripčního faktoru HIF, který je zodpovědný mimo jiné za tvorbu enzymů glykolýzy. V mitochondriích dochází při nedostatku kyslíku ke změně metabolismu. Energie z respiračního řetězce je částečně nahrazena glykolýzou [78]. Pokud nejsou enzymy glykolýzy díky nepřímému účinku inhibitorů HDAC přítomny v potřebném množství, může docházet k energetické deprivaci a spuštění například autofagie, která může potencovat apoptózu. Zvýšená aktivita caspasy-3 po 48 hodinové kultivaci obou neuroblastomových linií SK-N-AS a UKF-NB-3 s CDDP za standardních podmínek odpovídá jinému experimentu, kdy dochází k vyšší fragmentaci jejich jaderné DNA. Tento fakt může souviset se vznikem rezistence na CDDP zejména v hypoxii [79]. U buněčné linie UKF-NB-3 byly aktivity caspasy-3 v normoxii a hypoxii

srovnatelné po 48 hodinové kultivaci s VPA a TSA. U vzorků kultivovaných s CDDP a NaB došlo ke zvýšení aktivity caspasy-3 v normoxii. To může být způsobeno, jako v případě buněčné linie SK-N-AS, vznikem hypoxií navozené rezistence. Porovnáním aktivit caspasy-3 všech vzorků s kontrolním vzorkem buněk, bylo zjištěno, že všechny látky indukují její zvýšení. Cisplatina interkaluje do buněčné DNA, což ve výsledku vede ke zvýšení aktivity caspasy-3 a buněčné smrti. Použité inhibitory HDAC mohou rozvolňovat vazbu DNA na histony a tím usnadňovat transkripci důležitých genů, které nebyly za normálních podmínek u neuroblastomových buněčných linií transkribovány. Zvýšení aktivity caspasy-3 po kultivaci buněčných linií s inhibitory HDAC může být důsledkem přepisu některých genů, které jsou zodpovědné za spuštění programované buněčné smrti (ať už apopózy či autofagie). Mohou to být také geny kontrolující buněčný cyklus.

V další části diplomové práce bylo zjišťováno, zda buněčná smrt indukovaná CDDP, VPA, TSA a NaB je závislá na caspasach či nikoliv. Apoptóza může být spuštěna ve své podstatě dvěma majoritními drahami – vnější a vnitřní. Obě tyto dráhy jsou závislé na aktivitě caspas. Vedle drah na caspasach závislých jsou možné další alternativní způsoby jako například uvolnění AIF či endonukleasy G z mitochondrií. Není dosud jasné, zda mohou různé cesty buněčné smrti probíhat paralelně a zda jsou redundantní. Příkladem může být situace, kdy dojde při permeabilizaci vnější membrány mitochondrií k uvolnění cytochromu c, který se podílí na aktivaci caspas a zároveň k uvolnění AIF, který je zodpovědný za smrt na caspasach nezávislé [80]. Pro experiment byl použit pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk. Jeho účinná koncentrace byla ověřena pomocí aktivní studie caspasy-3. Pro obě linie byla navržena koncentrace Z-VAD-fmk 20 μM postačující k inhibici caspasy-3 na úroveň kontrolního vzorku. Aktivitu caspasy-3 kontrolního vzorku lze tedy v experimentech považovat za nulovou.

Pro další sérii experimentů byl použit pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk v kombinaci s používanými látkami (CDDP, VPA, TSA, NaB) v normoxii i hypoxii (1 % O_2) pro obě linie. Buněčná smrt byla měřena průtokovým cytometrem, kde byly detekovány populace buněk značené Annexin V-FITC a propidium jodidem. U buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3 se ukázalo, že 48 hodinová inkubace s 20 μM Z-VAD-fmk nevedla ke snížení viability buněk oproti kontrole. Viabilita buněčné linie SK-N-AS po pan-caspasové inhibici kultivovaných buněk s CDDP vzrostla, čili buňky podléhaly apoptóze v menší míře. Lze tedy říci, že apoptóza indukovaná CDDP je z velké části spřažená s aktivními

caspasami. Zajímavý výsledek se ovšem ukázal u stejné linie, kdy po pan-caspasové inhibici buněk kultivovaných s VPA vykazovaly stejnou viabilitu jako buňky u kterých caspasy inhibovány nebyly. Apoptóza může být tedy po indukci VPA spuštěna jinou, alternativní cestou, která je nezávislá na aktivních caspasach. Pro buněčnou linii UKF-NB-3 byly výsledky s podobnými trendy při porovnání buněčných viabilit. Kultivace neuroblastomové linie UKF-NB-3 s CDDP byla ovšem více toxická, buňky podléhaly apoptóze ve větší míře. Účinnost VPA se při detekci pozdní apoptózy ukázala nižší v hypoxii (1 % O₂) v porovnání s kultivací za standardních podmínek. VPA, inhibitor HDAC, u obou buněčných linií indukoval, po inhibici caspas, apoptózu jak při kultivaci v normoxických i hypoxických podmínkách. Apoptóza mohla nastat permeabilizací vnější mitochondriální membrány a uvolněním AIF či enonukleasy G z mitochondrií. Tento proces je úzce kontrolovaný rovnováhou mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2. Jejich exprese může VPA ovlivňovat inhibicí HDAC. Na buněčné smrti nezávislé na caspasach se mohou v tomto případě podílet také proteasy cathepsin B, D či L, uvolněné z lysozomů. Další možné vysvětlení detekované apoptózy po inhibici caspas je uvolnění vápenatých iontů z endoplasmatického retikula do cytoplasmy, kde může dojít k aktivaci inaktivních zymogenů calpainů („calcium-activated neutral proteases“). Tyto dráhy mohou být navzájem propojené a vést tak k buněčné smrti (obrázek č. 29 na straně 63) [81]. Vliv kyseliny valproové na neuroblastomové buněčné linie může být multifaktoriální, může nejen indukovat buněčnou smrt, ale také se může podílet například na snížení angiogeneze. Možné způsoby účinku VPA jsou shrnuty na obrázku č. 7 na straně 21.



Obrázek č. 29. Participace mitochondrií, lysozomů a endoplasmatického retikula na buněčné smrti. Na buněčné smrti nezávislé na caspasach se mohou podílet AIF, endonucleasa G či calpains a cathepsiny. Podrobněji byla v práci studována červeně značená dráha pomocí AIF na caspasach nezávislé buněčné smrti. Převzato a upraveno z [81].

Podobný experiment by bylo možné provést jinou detekční metodou apoptózy. Vhodná metoda pro další experimenty sledování vlivu inhibitorů HDAC na neuroblastomové buněčné linie je například terminální deoxynukleotidyl transferasa dUTP „nick end labeling“ (TUNEL) využívající deoxynukleotidyl transferasy, která katalyzuje inkorporaci fluorescein-12-dUTP na volné 3'-hydroxylové konce fragmentů DNA.

Pro podrobnější studium apoptotické smrti na caspasach nezávislé byl vybrán AIF. Molekula, která může po translokaci do jádra spustit buněčnou smrt. Má i mnoho jiných funkcí, jako indukce ROS či uvolnění cytochromu c [82].

V literatuře jsou popsány dva rozdílné časy kultivace buněk při sledování translokace AIF. Daugas a kol. použili ke sledování translokace 4 hodinové kultivace, Lee a kol. 24 hodinové kultivace [83, 84]. V experimentech s buněčnou linií SK-N-AS, která se zdá vhodnější pro sledování AIF než UKF-NB-3 díky velkým plochým buňkám, byla zjištěna následující data. Krátkodobá (1, 2, 4, 8 hodin) ani dlouhodobá (48 hodin) kultivace buněk s různými koncentracemi VPA nevedla k masivní translokaci AIF do jádra. Na obrázku č. 27 na straně 56 je zobrazen jen velmi minoritní případ všech buněk, kdy bylo

předpokládáno, že došlo k translokaci AIF do jádra. Pro budoucí experimenty by bylo vhodné použít pozitivní kontrolu translokace AIF do jádra.

K určení zda dochází k translokaci AIF do jádra lze použít i metodu Western blot. Po izolaci nukleární a cytosolární frakce buněk, kdy bylo předpokládáno, že u buněčné linie SK-N-AS je za normálních podmínek AIF situován v mitochondriích respektive v cytosolární frakci, byly stanoveny koncentrace proteinů. Pro experiment je důležitá čistota jednotlivých frakcí. Pro kontrolu nukleární frakce byl použit PARP, pro kontrolu cytosolární frakce GADPH. AIF byl přítomen v obou frakcích. To může být způsobeno kontaminací frakcí, nelze však ani vyloučit translokaci AIF do jádra v množství nezjistitelném imunofluorescencí.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti působení inhibitorů HDAC na neuroblastomové buněčné linie.

- Byla stanovena vhodná kultivační doba pro detekci apoptózy neuroblastomových buněčných linií SK-N-AS a UKF-NB-3. Testem cytotoxicity byly porovnány účinnosti NaB a LiCl v normoxii a hypoxii (1 % O₂).
- Buněčná smrt byla sledována třemi různými metodami (fragmentací buněčných jader, změnou aktivity caspasy-3 a značením buněk Annexinem V-FITC a propidium jodidem).
- Pro zjištění, zda byla apoptóza závislá na caspasach byl použit pan-caspasový inhibitor Z-VAD-fmk. Při inhibici aktivity caspas se ukázalo, že buněčná smrt indukovaná VPA není na caspasach závislá.
- Při hledání mechanismu apoptózy na caspasach nezávislé u buněčné linie SK-N-AS byl sledován AIF a jeho translokace do jádra.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------

Seznam použité literatury

1. http://www.linkos.cz/pacienti/co_vedet.php, (3.8.2011)
2. Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, Grada, Praha, str. 19-33 (2003)
3. Butel, J. S.: *Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease*, *Carcinogenesis*, 21, 405-426 (2000)
4. Hanahan, D., Weinberg, R. A.: *The hallmarks of cancer*, *Cell*, 100, 57-70 (2000)
5. http://www.linkos.cz/pacienti/vek/deti_nador.php, (7.5.2011)
6. Koutecký, J., Kabíčková, E., Starý, J.: *Dětská onkologie pro praxi*, Triton, Praha, str. 11-21, 133-136 (2002)
7. <http://www.tribune.cz/clanek/21437>, (23.8.2011)
8. Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček J.: *Speciální onkologie, diagnostika a léčba maligních chorob*, Galen, Praha, str. 353-354 (2010)
9. Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Delattre, O.: *Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors*, *Oncogene*, 29, 1566-1579 (2010)
10. Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M., Maris, J. M.: *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*, *Nature*, 455, 930-935 (2008)
11. Livingstone, A., Mairs, R. J., Russell, J., O'Donoghue, J., Gaze, M. N., Wheldon, T. E.: *N-myc gene copy number in neuroblastoma cell lines and resistance to experimental treatment*, *Eur. J. Cancer*, 30A, 382-389 (1994)
12. Hashimoto, H., Daimaru, Y., Enjoji, M., Nakagawara, A.: *N-myc gene product expression in neuroblastoma*, *J. Clin. Pathol.*, 42, 52-55 (1989)
13. František, F.: *Účinky záření a chemických látek na buňky a organismus*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, str. 234 (1981)
14. <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/Antineoplastics/GeneralConcepts/CellKillHypothesis.html>, (9.5.2011)
15. Luqmani, Y. A.: *Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy*, *Med. Princ. Pract.*, 14, 35-48 (2005)
16. Zamble, D. B., Lippard, S. J.: *Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*, *Trends. Biochem. Sci.*, 20, 435-439 (1995)
17. Bertram, K. G.: *Základní & klinická farmakologie*, nakladatelství a vydavatelství H&H, Praha, str. 820-821 (1994)
18. Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M. P., van Wingerden, K. E., Henzen-Logmans, S. C., Scheper, R. J., Flens, M. J., Klijn, J. G., Stoter, G., Foekens, J. A.: *The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer*, *Br. J. Cancer*, 76, 486-493 (1997)
19. Stiborova, M., Poljakova, J., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E.: *DNA and histone deacetylases as targets for neuroblastoma treatment*, *Interdiscip. Toxicol.*, 3, 47-52 (2010)
20. Germann, U. A., Pastan, I., Gottesman, M. M.: *P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance*, *Semin. Cell. Biol.*, 4, 63-76 (1993)
21. Naito, S., Yokomizo, A., Koga, H.: *Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma*, *Int. J. Urol.*, 6, 427-439 (1999)
22. Garcia-Morales, P., Gomez-Martinez, A., Carrato, A., Martinez-Lacaci, I., Barbera, V. M., Soto, J. L., Carrasco-Garcia, E., Menendez-Gutierrez, M. P., Castro-Galache, M. D., Ferragut, J. A., Saceda, M.: *Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines*, *Mol. Cancer Ther.*, 4, 1222-1230 (2005)

23. Fantin, V. R. Richon, V. M.: *Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications*, Clin. Cancer Res., 13, 7237-7242 (2007)
24. Bertout, J. A., Patel, S. A. Simon, M. C.: *The impact of O₂ availability on human cancer*, Nat. Rev. Cancer, 8, 967-975 (2008)
25. Gilany, K. Vafakhah, M.: *Hypoxia: a Review*, J. Paramed. Sci., 1, 43-60 (2010)
26. Hendriksen, E. M., Span, P. N., Schuurin, J., Peters, J. P., Sweep, F. C., van der Kogel, A. J. Bussink, J.: *Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model*, Microvasc. Res., 77, 96-103 (2009)
27. Chen, S. Sang, N.: *Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors*, J. Biomed. Biotechnol., 2011, 197946 (2011)
28. Kaelin, W. G., Jr.: *The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 338, 627-638 (2005)
29. Song, X., Liu, X., Chi, W., Liu, Y., Wei, L., Wang, X. Yu, J.: *Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene*, Cancer Chemother. Pharmacol., 58, 776-784 (2006)
30. Rohwer, N. Cramer, T.: *Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways*, Drug Resist. Updat., 14, 191-201 (2011)
31. Bence, M., Koller, J., Sasvari-Szekely, M. Keszler, G.: *Transcriptional modulation of monoaminergic neurotransmission genes by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in neuroblastoma cells*, J. Neural. Transm., DOI: 10.1007/s00702-011-0688-4 (2011)
32. Acharya, M. R., Sparreboom, A., Venitz, J. Figg, W. D.: *Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review*, Mol. Pharmacol., 68, 917-932 (2005)
33. Rodriguez-Paredes, M. Esteller, M.: *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*, Nat. Med., 17, 330-339 (2011)
34. Kim, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Lee, J. W., Seo, J. H., Jung, B. K., Bae, M. K. Kim, K. W.: *Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases*, Oncol. Rep., 17, 647-651 (2007)
35. Kim, D. H., Kim, M. Kwon, H. J.: *Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents*, J. Biochem. Mol. Biol., 36, 110-119 (2003)
36. Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y. Carrier, F.: *Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA*, Cancer Res., 63, 7291-7300 (2003)
37. Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L. Klein, P. S.: *Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation*, Cancer Res., 64, 1079-1086 (2004)
38. Hrebackova, J., Hrabeta, J. Eckschlager, T.: *Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors*, Curr. Drug Targets, 11, 361-379 (2010)
39. Lockshin, R. A. Zakeri, Z.: *Apoptosis, autophagy, and more*, Int. J. Biochem. Cell Biol., 36, 2405-2419 (2004)
40. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. Currie, A. R.: *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, Br. J. Cancer, 26, 239-257 (1972)
41. Papaliagkas, V., Anogianaki, A., Anogianakis, G. Ilonidis, G.: *The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals*, Hippokratia, 11, 108-113 (2007)
42. Burgoyne, L. A.: *The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death*, Exp. Cell Res., 248, 214-222 (1999)
43. Savill, J. Fadok, V.: *Corpse clearance defines the meaning of cell death*, Nature, 407, 784-788 (2000)
44. Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. Kobayashi, Y.: *Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages*, J. Immunol., 171, 4672-4679 (2003)
45. Nagata, S.: *Apoptosis by death factor*, Cell, 88, 355-365 (1997)

46. Elmore, S.: *Apoptosis: a review of programmed cell death*, *Toxicol. Pathol.*, 35, 495-516 (2007)
47. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H.Peter, M. E.: *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis*, *J. Biol. Chem.*, 274, 1541-1548 (1999)
48. Esposti, M. D.: *The roles of Bid*, *Apoptosis*, 7, 433-440 (2002)
49. Kim, J. S., He, L.Lemasters, J. J.: *Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 463-470 (2003)
50. Eskelinen, E. L.: *Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death*, *Cell Death Differ.*, 12, 1468-1472 (2005)
51. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y.Yoshimori, T.: *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*, *EMBO J.*, 19, 5720-5728 (2000)
52. Sun, Q., Fan, W.Zhong, Q.: *Regulation of Beclin 1 in autophagy*, *Autophagy*, 5, 713-716 (2009)
53. Levine, B.Kroemer, G.: *Autophagy in the pathogenesis of disease*, *Cell*, 132, 27-42 (2008)
54. Gozuacik, D.Kimchi, A.: *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*, *Oncogene*, 23, 2891-2906 (2004)
55. Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D.Yahalom, J.: *A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles*, *Cancer Res.*, 61, 439-444 (2001)
56. Golstein, P.Kroemer, G.: *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*, *Trends. Biochem. Sci.*, 32, 37-43 (2007)
57. Tait, S. W.Green, D. R.: *Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut*, *Oncogene*, 27, 6452-6461 (2008)
58. Zhao, M., Brunk, U. T.Eaton, J. W.: *Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2*, *FEBS Lett.*, 509, 399-404 (2001)
59. Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P.Kroemer, G.: *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?*, *J. Cell Sci.*, 115, 4727-4734 (2002)
60. Ekert, P. G., Silke, J.Vaux, D. L.: *Caspase inhibitors*, *Cell Death Differ.*, 6, 1081-1086 (1999)
61. Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C.Kroemer, G.: *Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all*, *Cell Death Differ.*, 11, 591-595 (2004)
62. van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R.Vandenabeele, P.: *Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation*, *Cell Death Differ.*, 8, 1136-1142 (2001)
63. Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G.Wu, H.: *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor*, *Nat. Struct. Biol.*, 9, 680-684 (2002)
64. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L.Randall, R. J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)
65. Ross, R. A., Biedler, J. L.Spengler, B. A.: *A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors*, *Cancer Lett.*, 197, 35-39 (2003)
66. Van Maerken, T., Ferdinande, L., Taideman, J., Lambertz, I., Yigit, N., Vercruysse, L., Rihani, A., Michaelis, M., Cinatl, J., Jr., Cuvelier, C. A., Marine, J. C., De Paepe, A., Bracke, M., Speleman, F.Vandesompele, J.: *Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 101, 1562-1574 (2009)
67. Godfried, M. B., Veenstra, M., v Sluis, P., Boon, K., v Asperen, R., Hermus, M. C., v Schaik, B. D., Voute, T. P., Schwab, M., Versteeg, R.Caron, H. N.: *The N-myc and c-myc*

- downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2, *Oncogene*, 21, 2097-2101 (2002)
68. Eray, M., Matto, M., Kaartinen, M., Andersson, L. Pelkonen, J.: *Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17*, *Cytometry*, 43, 134-142 (2001)
 69. Blancher, C., Moore, J. W., Talks, K. L., Houlbrook, S. Harris, A. L.: *Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines*, *Cancer Res.*, 60, 7106-7113 (2000)
 70. Han, S., Lu, J., Zhang, Y., Cheng, C., Li, L., Han, L. Huang, B.: *HDAC inhibitors TSA and sodium butyrate enhanced the human IL-5 expression by altering histone acetylation status at its promoter region*, *Immunol. Lett.*, 108, 143-150 (2007)
 71. Rahman, M. M., Kukita, A., Kukita, T., Shobuike, T., Nakamura, T. Kohashi, O.: *Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages*, *Blood*, 101, 3451-3459 (2003)
 72. Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G. Rogiers, V.: *Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view*, *Curr. Med. Chem.*, 11, 1629-1643 (2004)
 73. Kleinerman, E. S., Knowles, R. D., Blick, M. B. Zwelling, L. A.: *Lithium chloride stimulates human monocytes to secrete tumor necrosis factor/cachectin*, *J. Leukoc. Biol.*, 46, 484-492 (1989)
 74. Zhang, W. V., Jullig, M., Connolly, A. R. Stott, N. S.: *Early gene response in lithium chloride induced apoptosis*, *Apoptosis*, 10, 75-90 (2005)
 75. Kaufmann, L., Marinescu, G., Nazarenko, I., Thiele, W., Oberle, C., Sleeman, J. Blattner, C.: *LiCl induces TNF-alpha and FasL production, thereby stimulating apoptosis in cancer cells*, *Cell. Commun. Signal*, 9, 15 (2011)
 76. Kast, R. E.: *How lithium treatment generates neutrophilia by enhancing phosphorylation of GSK-3, increasing HIF-1 levels and how this path is important during engraftment*, *Bone Marrow Transplant.*, 41, 23-26 (2008)
 77. Kaufmann, S. H. Vaux, D. L.: *Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance*, *Oncogene*, 22, 7414-7430 (2003)
 78. Kong, X., Lin, Z., Liang, D., Fath, D., Sang, N. Caro, J.: *Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*, *Mol. Cell. Biol.*, 26, 2019-2028 (2006)
 79. Wohlkoenig, C., Leithner, K., Deutsch, A., Hrzenjak, A., Olschewski, A. Olschewski, H.: *Hypoxia-induced cisplatin resistance is reversible and growth rate independent in lung cancer cells*, *Cancer Lett.*, 308, 134-143 (2011)
 80. Wang, H., Yu, S. W., Koh, D. W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M. Dawson, V. L.: *Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death*, *J. Neurosci.*, 24, 10963-10973 (2004)
 81. Broker, L. E., Kruyt, F. A. Giaccone, G.: *Cell death independent of caspases: a review*, *Clin Cancer Res.*, 11, 3155-3162 (2005)
 82. Cregan, S. P., Dawson, V. L. Slack, R. S.: *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*, *Oncogene*, 23, 2785-2796 (2004)
 83. Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. Kroemer, G.: *Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis*, *FASEB J.*, 14, 729-739 (2000)
 84. Lee, W. K., Abouhamed, M. Thevenod, F.: *Caspase-dependent and -independent pathways for cadmium-induced apoptosis in cultured kidney proximal tubule cells*, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 291, F823-832 (2006)