UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce

IMUNOLOGICKÁ A EPIGENETICKÁ MODULACE GENOVÉ EXPRESE LEUKEMICKÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

Mgr. Klára Elknerová

2011

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Imunologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc

Školicí pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, Praha 2

Školitel: Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

ABSTRAKT **4**

ABSTRACT **5**

1. ÚVOD **6**

2. CÍL PRÁCE **7**

3. MATERIÁL A METODIKA **7**

4. VÝSLEDKY **11**

4.1 TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNICH PROTILÁTEK *11*

4.2 LÉČBA POMOCÍ INHIBITORŮ DEACETYLÁZ HISTONŮ *14*

5. DISKUZE **17**

5.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34. ..... *17*

5.2 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ, SAHA A VPA *21*

6. ZÁVĚR **23**

6.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34 (klon 4H11) *23*

6.2 EPIGENETICKÉ INHIBITORY HDAC - SAHA a VPA *23*

7. LITERATURA **24**

ABSTRAKT

Terapie pomocí monoklonální protilátky proti molekule CD34

Testovala jsem antiproliferativní a proapoptický účinek purifikované monoklonální protilátky (IgG1 třídy) proti proteinovému epitopu molekuly CD34 produkované hybridomovým klonem 4H11 na CD34+ leukemické linie (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- leukemickou buněčnou linii (PS-1). Zjistila jsem, že monoklonální protilátka proti CD34 molekule inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu CD34+ buněčných linií, avšak v koncentraci vyšší než 32 μg/ml má podobný účinek i na CD34- leukemickou buněčnou linii (PS-1). Protilátka indukuje zástavu buněčného růstu v G1/G0 fázi buněčného cyklu u CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) buněčných linií, ale neindukuje jejich diferenciaci. Kombinované působení této monoklonální protilátky s interferony IFN-α, IFN-β nebo IFN-γ nemá silnější účinek na inhibici buněčné proliferace než protilátka samotná. Kombinované působení této protilátky s hematopoetickými cytokiny (IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF) nebo s INF-γ také neindukuje diferenciaci leukemické buněčné linie MOLM-9.

Terapie pomocí inhibitorů deacetyláz histonů

Inhibitory deacetyláz histonů představují nový druh protinádorových léčiv. Mezi jejich hlavní biologické funkce patří zástava buněčného růstu, indukce diferenciace, podpora apoptózy v různých typech maligních buněk. Avšak, za určitých podmínek, může být apoptóza blokována. U buněk kde byla apoptóza blokována je aktivována ne-apoptotická buněčná smrt nebo ireverzibilní zástava buněčného růstu neboli senescence, jako další z možných tumor-supresorových mechanismů. V této práci jsem zkoumala účinek dvou inhibitorů HDAC: suberoylanilidu hydroxamové kyseliny (SAHA) a kyseliny valproové (VPA) v různých koncentracích na leukemické buněčné linie. Získané výsledky ukazují, že SAHA i VPA inhibují buněčný růst a indukují apoptózu v závislosti na dávce, době působení, typu buněčné linie. SAHA i VPA preferenčně indukují apoptózu a to již po 48 hodinách jejich působení, oproti senescenci, která byla pozorována až po 5 dnech inkubace s inhibitory HDAC. Vyšší dávky inhibitorů HDAC indukují více apoptózu a naopak nižší dávky indukují senescenci.

ABSTRACT

Therapy by monoclonal antibody to CD34 molecule

Growth-inhibitory and proapoptotic effect of the monoclonal antibody to CD34 molecule, clone 4H11, were tested on CD34+ leukemic cell lines (MOLM-9, JURL-MK1) and CD34- cell line (PS-1). We have found that the monoclonal antibody to CD34 inhibited the proliferation and induced apoptosis of all CD34+ cell lines tested, however it has similar effect on CD34- leukemic cell line (PS-1) in concentration higher than 32 μg/ml. We did not observe induction of differentiation by anti-CD34 antibody, but a growth arrest of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle was detected in CD34+ cell lines. Combinations of anti-CD34 antibody with both type I (α, β) or type II (γ) interferons did not enhance the effects on the cell growth or inhibition of cellular proliferation of the antibody alone. Combinations of anti-CD34 antibody with hematopoietic cytokines or INF-γ did not induced diferentiation. Our data suggest that the monoclonal antibody to CD34 molecule prepared from clone 4H11, after sufficient experimental and preclinical testing on laboratory animals, may provide a new basis for possible targeted antibody therapy of acute or chronic myeloid leukemia.

Therapy by histone deacetylase inhibitors

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are emerging new class of anticancer agents that act by inhibiting cell growth, inducing cell cycle arrest and apoptosis of various cancer cells. However, in some conditions, apoptosis can be blocked and non apoptotic cell death and irreversible growth arrest, namely senescence, can be activated as potential tumor-suppressor mechanism. Here we evaluated the dosage effects of HDAC inhibitors suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA) in a series of human leukaemia cell lines. We investigated, what concentration of SAHA and VPA can induce apoptosis, growth inhibition or stress-induced premature senescence. We have found that inhibition of proliferation and induction of apoptosis by the treatment with SAHA or VPA is variable depending on the dose, time of the treatment, and on the cell type. The senescence phenotype was preferentially induced by lower dosage of HDACi and required longer incubation time (5 days) while apoptosis was induced by higher dosage and appeared already after 48 h.

1. ÚVOD

Tato práce se zabývá studiem antiproliferativního, proapoptotického a diferenciačního účinku monoklonální protilátky proti povrchové molekule hematopoetických kmenových a progenitorových buněk - sialomucinu CD34 (mukosialinu). Pro srovnání bylo také studováno působení některých epigenetických modulátorů genové exprese leukemických buněk – kyseliny valproové (VPA) a suberoylanilidu hydroxamové kyseliny (SAHA) na leukemických buněčných liniích.

Molekula CD34 (mukosialin) je vysoce glykosylovaný monomerní membránový protein I. typu o relativní molekulové hmotnosti 111-115 kDa. Je exprimována například na povrchu hematopoetických kmenových a progenitorových buněk a v některých tkáních cévního systému. Její funkce zatím není dostatečně známa, ale hraje roli v mezibuněčné adhezi a usnadňuje buněčnou migraci. Buňky exprimující CD34 (CD34+ buňky) se vyskytují zejména v pupečníkové krvi, v kostní dřeni, na některých endotheliálních buňkách cévního systému a na subpopulaci dendritických buněk. Protilátky proti CD34 molekule se používají k izolaci a kvantifikaci pluripotentních hematopoetických buněk. Kromě těchto buněk ovšem s anti-CD34 protilátkou reaguje i určité množství prekurzorů B-lymfocytů, CD34+ megakaryocyty a také některé bazofily a žírné buňky, takže pro přesnou kvantifikaci pluripotentních prekurzorů se značení CD34 kombinuje s negativitou v expresi jiné povrchové molekuly, CD38.

Monoklonální protilátka proti molekule CD34 produkovaná myším hybridomovým klonem 4H11 (APG), připraveným dříve v naší laboratoři, reaguje s proteinovým epitopem (tzv. epitopem III. třídy) této molekuly na povrchu některých hematopoetických buněčných linií (MOLM-7, MOLM-9, HEL) ustavených od nemocných s leukemií. Testovala jsem antiproliferativní a proapoptický účinek této purifikované monoklonální protilátky anti-CD34 (v koncentracích 16-170 μg/ml) na leukemické buněčné linie CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1). Je známo, že některé hematopoetické cytokiny samotné nebo v kombinaci indukují diferenciaci nezralých leukemických myeloidních buněk a také inhibují buněčnou proliferaci v kulturách *in vitro.* Z tohoto důvodu jsem se rozhodla zjistit, zda samotná monoklonální protilátka proti CD34 molekule nebo v kombinaci s interferony nebo jinými hematopoetickými cytokiny (IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF) je schopna inhibovat proliferaci nebo indukovat diferenciaci leukemické buněčné linie MOLM-9.

Inhibitory histonových deacetyláz (HDAC) jsou novou třídou účinných protinádorových látek. Indukují expresi genů, které jsou v nádorových buňkách potlačeny, což vede mimo jiné k zástavě buněčného cyklu, indukci diferenciace, apoptózy nebo senescence těchto buněk. Sledovala jsem účinek dvou inhibitorů HDAC: suberoylanilidu hydroxamové kyseliny (SAHA) v koncentracích 0,5-10 μM a kyseliny valproové (VPA) v koncentracích 0,5-10 mM na leukemické buněčné linie MOLM-7, JURL-MK1, HL-60 a HEL. Zjišťovala jsem, vliv těchto inhibitorů na inhibici proliferace, indukci apoptózy či senescence. Dosažené výsledky ukazují, že genovou expresi některých genů v buněčných kulturách in vitro lze modulovat směrem k navození apoptózy, nekrózy nebo senescence působením vhodných epigenetických (VPA, SAHA) nebo imunologických (anti-CD34) modulátorů. Tato skutečnost je využitelná pro navržení případně i vývoj nových cílených terapeutik leukemií i ostatních maligních onemocnění.

2. CÍL PRÁCE

1. Prostudovat účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 na proliferaci, apoptózu nebo zástavu buněčného cyklu u leukemických buněčných linií CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a pro kontrolu i CD34- (PS-1) linie.
2. Zjistit, zda samotná monoklonální protilátka proti CD34 nebo v kombinaci s rekombinantními hematopoetickými cytokiny (IL-3+IL-6+SCF+ G-CSF+GM-CSF) nebo v kombinaci s interferony je schopna inhibovat proliferaci nebo indukovat diferenciaci leukemické buněčné linie MOLM-9.
3. Sledovat vliv koncentrace inhibitorů HDAC (SAHA a VPA) na inhibici proliferace, indukci apoptózy nebo senescence těchto buněk.
4. Vytipovat koncentraci a čas, za jaký jsou inhibitory HDAC schopny indukovat apoptózu nebo senescenci.

3. MATERIÁL A METODIKA

Leukemické buněčné linie

- **MOLM-9:** ustavená od pacienta s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastickém zvratu (CD34+)
- **MOLM-7:** ustavená od pacienta s CML v blastickém zvratu (CD34+)

- **JURL-MK1:** ustavená od pacienta s CML v blastickém zvratu (CD34+)
- **HEL:** ustavená od pacienta s akutní erytroleukemií Dr. P. Martinem, Seattle, USA
- **HL-60:** ustavená od pacienta s akutní promyelocytární leukemií Dr. R.C. Gallo v NCI, Bethesda, USA (CD34-)
- **PS-1:** ustavená od pacienta s akutní T-lymfoblastickou leukemií (CD34-) Dr. P. Stöckbauerem v Bethesde, USA v r. 1984

Buňky byly kultivovány v RPMI-1640 médiu (Sigma-Aldrich, USA), které bylo obohaceno 10% fetálním telecím sérem (FTS, Sigma-Aldrich, USA), antibiotiky penicilinem (50 000 U/ml) a streptomycinem (50 mg/ml), dále L-glutaminem (150 mg/l) a 0,18% $NaHCO_3$. Buněčné kultury byly inkubovány při 37 °C a 5% CO_2. Třikrát týdně se buněčné kultury pasážovaly na hustotu buněk 2- 4x10^5 buněk/ml.

Použitá agens

- *Myší monoklonální protilátka proti CD34 IgG1* byla připravena již dříve na našem pracovišti pomocí hybridomové technologie. BALB/c myši byly imunizovány buňkami CD34+ leukemické buněčné linie MOLM-7, ustavené od pacienta s CML v blastickém zvratu (Tsuji-Takayama, 1994). Po fúzi myších buněk ze sleziny s buňkami SP2/0 myší leukemické buněčné linie byl získán hybridomový klon, produkující monoklonální protilátku proti hematopoetickým kmenovým a progenitorovým buňkám, klon 4H11 (APG)(70066) třídy IgG1. Tato protilátka reaguje s většinou myeloidních progenitorových buněk a buněčných linií (MOLM-6, MOLM-7, MOLM-9, HEL, JURL-MK1) a reaguje s proteinovým epitopem (tzv. epitopem III. třídy) tohoto antigenu na CD34 molekule. Specifita této protilátky byla definována na 6. mezinárodním workshopu lidských leukocytárních diferenciačních antigenů v Kobe v roce 1996 (Stöckbauer et al., 2002).

- *Suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA)*, Alexis Corporation (USA)

- *Kyselina valproová (VPA)*, Alexis Corporation (USA)

Detekce životnosti buněk a zástavy buněčného růstu

K navození inhibice buněčné proliferace byly použity tyto látky: 1. purifikovaná myší IgG1 monoklonální protilátka proti proteinovému epitopu molekuly CD34, klon 4H11, 2. kyselina valproová (VPA) a 3. suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA).

Po 24, 48 a 72 hod. působení těchto induktorů byla zjišťována životnost buněk obarvením trypanovou modří a k detekci inhibice proliferace bylo použito měření inkorporace ^{3}H-thymidinu do DNA.

Analýza buněčného cyklu

Analýzou buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie byly sledovány frakce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Tato metoda využívá fluorescenční barvičku, která se váže k DNA, v našem případě propidium jodid, jež emituje světlo o vlnové délce 617 nm v červené oblasti. Buňky v jednotlivých fázích buněčného cyklu obsahují různá množství DNA a množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. To se poté odráží na intenzitě fluorescenčního signálu.

Z buněčné suspenze bylo odebráno 1x10^{6} buněk a živné médium bylo odstředěno na centrifuze. Buňky ošetřené SAHA, VPA nebo protilátkou proti CD34 (klon 4H11) byly po 24, 48 a 72 hodinách resuspendovány v 4,5 ml 70% etanolu, inkubovány půl hodiny při 10 ºC a následně uchovány 5 – 7 dní při -20 ºC. Po 5-7 dnech byly vzorky promyty v PBS a inkubovány 30 minut v 1 ml modifikovaného Videlovova pufru s propidium jodidem při pokojové teplotě. Propidium jodid interkalovaný do DNA emituje po ozáření argonovým laserem (488 nm) červenou fluorescenci, která byla měřena pomocí průtokového cytometru Coulter Epics XL flow cytometer (USA). Histogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru FLOWjo (Flow Cytometry Analysis Software). Bylo sledováno nejen množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G1, G2/M a S fáze), ale také množství (procento) apoptotických buněk, neboli procento buněk v subG1 fázi.

Sledování apoptózy pomocí průtokové cytometrie testem tunel

Tato metoda je založena na značení fragmentů DNA pomocí terminální deoxynukleotidyl-transferázy (TUNEL − TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Umožňuje vizualizaci frakce buněk, které jsou v terminální fázi apoptózy. Terminální deoxynukleotidyl-transferáza (TdT) katalyzuje polymerizaci značených nukleotidů (např. BrdUTP) k volným 3´-OH koncům fragmentů DNA. Ty jsou potom

vizualizovány pomocí monoklonální protilátky proti BrdUTP konjugované s fluorochromem FITC.

Při detekci apoptotických buněk se postupovalo podle přiloženého návodu z kitu (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH) pro test TUNEL. Buňky byly ošetřeny SAHA, VPA a nebo protilátkou proti CD34 (klon 4H11). Z buněčné suspenze bylo odebráno po 24, 48 a 72 hodinách $1x10^6$ buněk a médium bylo odstředěno. Buněčný sediment byl fixován 4% roztokem formaldehydu v PBS po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Fixované buňky byly promyty a poté permeabilizovány 100 μl permeabilizačního roztoku (0,1% Triton X-100 v 0,1% citronanu sodném). Permeabilizace probíhala 2 minuty při 2 - 8 °C. Pro značení DNA fragmentů byly promyté a permeabilizované buňky inkubovány 60 minut při 37°C s 50 μl reakční směsi TUNEL (značící roztok + enzymový roztok). Ke vzorku představujícímu negativní kontrolu bylo přidáno pouze 50 μl značícího roztoku. Poté byly buňky 2x promyty v PBS, naředěny na konečný objem 500 μl a pomocí průtokové cytometrie byla měřena intenzita zelené (FITC) fluorescence.

Detekce senescence (senescentních buněk)

Významným směrodatným biomarkerem senescentních buněk *in vitro* i *in vivo* je detekce aktivity lysozomální β-galaktozidázy spojené se senescencí (SA-β-gal, senescence-associated β-galaktosidase). V senescentních buňkách je aktivita SA-β-gal zvýšena, jelikož obsahují více lysozomů (Campisi, 2005; Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006).

Při detekci senescentních buněk se postupovalo podle přiloženého návodu z kitu: Senescence β-Galaktosidase Staining Kit od Cell Signaling Technology. Pomocí kitu se u buněk v kultuře detekuje β-galaktosidázová aktivita při pH 6, jež je typická pouze pro senescentní buňky a nebyla nalezena u presenescentních, klidových nebo imortalizovaných buněk. Buňky byly ošetřeny SAHA nebo VPA a po 24, 48, 72, 96 nebo 120 hodinách byly odebrány vzorky ($1x10^6$ buněk). Buňky byly nejprve promyty a poté 10 minut fixovány ve fixačním roztoku (2% formaldehyd, 0,2% glutaraldehyd). Poté byly znovu promyty a inkubovány po dobu 24 hodin při 37°C s X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside) (1 mg/ml), rozpuštěné v roztoku obsahujícím 40 mM kyselinu citrónovou pH 6,5; 5 mM hexakyanoželezitan draselný; 5 mM hexakyanoželeznatan draselný; 150 mM NaCl a 2 mM $MgCl_2$. Po 24 hodinách se sledoval výskyt modrého zbarvení

v cytosolu (pouze u senescentních buněk) pod mikroskopem v režimu fázového kontrastu.

Morfologická analýza

Buňky MOLM-9 byly 72 nebo 120 hodin inkubovány se směsí rekombinantních cytokinů (IL-3 1 ng/ml, IL-6 10 ng/ml, SCF 5 ng/ml, G-CSF 1 ng/ml, GM-CSF 1 ng/ml) nebo s IFN-γ (0,125 μg/ml) a to buď v kombinaci s monoklonální protilátkou proti CD34 (klon 4H11) nebo bez ní. Poté byly vytvořeny cytospinové preparáty na cytocentrifuze Cytospin 2, firmy Shandon, Anglie, centrifugací suspense živých buněk na mikroskopická podložní skla 800 otáček/minutu (rpm) po dobu 10 minut.

4. VÝSLEDKY

4.1 TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNICH PROTILÁTEK

V první části předkládané práce jsem studovala antiproliferativní, proapoptický a diferenciační účinek monoklonální protilátky proti proteinovému epitopu molekuly CD34 na CD34+ a CD34- leukemických buněčných liniích.

4.1.1 Antiproliferativní účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 klonu 4H11 na leukemické buněčné linie

Leukemické buněčné linie CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1) byly inkubovány v přítomnosti 16-170 μg/ml purifikované myší monoklonální protilátky proti antigenu CD34, třídy IgG1, produkované klonem 4H11. K detekci inhibice proliferace po 24, 48 a 72 hodinách působení protilátky bylo použito měření inkorporace ^{3}H-thymidinu do DNA. Radioaktivita nově syntetizované DNA byla měřena s použitím beta scintilátoru. Výpočet byl proveden ze středních hodnot tripletů vyjádřených v cpm podle vzorce:

Inhibice proliferace [%] = [cpm (kontrolní) – cpm (ošetřené)] / cpm (kontrolní)]

Koncentrace 16 μg/ml a vyšší významně inhibovala proliferaci CD34+ linií. V koncentracích vyšších než 32 μg/ml však také docházelo k nespecifické inhibici proliferace u CD34- buněčné linie PS-1. Antiproliferativní účinek protilátky závisel na dávce a době působení. Nejsilnější inhibiční efekt byl pozorován po 72 hodinách inkubace s purifikovanou protilátkou

4.1.2 Účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 na životnost CD34+ a CD34- leukemických buněčných linií

Linie byly inkubovány v přítomnosti 16-170 µg/ml monoklonální protilátky proti CD34 molekule. Po 24, 48 a 72 hodinách byla zjišťována životnost buněk obarvením trypanovou modří. Počet živých buněk postupně klesal se zvyšující se koncentrací protilátky. V nejnižších koncentracích (16-32 µg/ml) byl počet obarvených buněk zanedbatelný.

4.1.3 Indukce apoptózy CD34+ a CD34- leukemických buněčných linií působením monoklonální protilátky anti-CD34

Sledovala jsem také účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 na indukci apoptózy u leukemických buněčných linií CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1). Dále jsem již pracovala s anti-CD34 protilátkou v koncentraci 61 µg/ml, neboť působením nižších koncentrací (např. 32 µg/ml) na linii MOLM-9 nedošlo k výrazné indukci apoptózy a k ovlivnění buněčného cyklu oproti kontrolním buňkám.

Buňky byly ošetřeny protilátkou v koncentraci 61 µg/ml a po 24, 48 a 72 hodinách jsme měřili pomocí průtokové cytometrie procentuální zastoupení TUNEL-pozitivních buněk. Procento apoptotických buněk (TUNEL-pozitivních) se během 72 hodinové inkubace s protilátkou postupně zvyšovalo, v kontrolních vzorcích bylo přitom stále jen asi 2% pozitivních buněk. Protilátka proti molekule CD34 v koncentraci 61 µg/ml indukuje apoptózu i u CD34- leukemické buněčné linie PS-1. Nejrychlejší proapoptotický účinek protilátky anti-CD34 v koncentraci 61 µg/ml byl pozorován u linie JURL-MK1.

4.1.4 Ovlivnění buněčného cyklu u leukemických buněčných linií CD34+ a CD34- působením protilátky proti molekule CD34

Pomocí průtokové cytometrie s použitím propidium jodidu jsem sledovala, zda ošetření buněk monoklonální protilátkou proti molekule CD34 v koncentraci 61 µg/ml ovlivňuje průběh buněčného cyklu u leukemických buněčných linií CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1). Po 24, 48 a 72 hodinové inkubaci s monoklonální protilátkou byla plazmatická membrána buněk permeabilizována 70% ledovým ethanolem. Poté byla DNA permeabilizovaných buněk označena propidium jodidem a na průtokovém cytometru byla změřena červená fluorescence.

Monoklonální protilátka proti molekule CD34 v koncentraci 61 μg/ml indukovala zástavu buněčného cyklu v G1/G0 fázi po 24 hodinách u linie MOLM-7 a po 24 a i po 48 hodinách u linie JURL-MK1. Naproti tomu u linie PS-1 nebyla pozorována zástava v G1/G0 fázi, ale ani v jiné fázi buněčného cyklu působením 61 μg/ml této protilátky. Z grafů udávajících počet buněk v subG1 fázi buněčného cyklu u linií MOLM-9, JURL-MK1 a PS-1 můžeme pozorovat zvyšující se počet buněk akumulovaných v subG1 regionu s dobou působení protilátky anti-CD34.

4.1.5 Účinek interferonů IFN-α, IFN-β, IFN-γ a monoklonální protilátky proti molekule CD34 na proliferaci buněk leukemické linie MOLM-9

Linie MOLM-9 byla inkubována buď se samotnými interferony: IFN-α (0.075 μg/ml) nebo IFN-β (0.375 μg/ml) nebo IFN-γ (0.125 μg/ml) anebo v kombinaci s protilátkou proti molekule CD34 (v koncentracích 16, 32 a 61 μg/ml). Po 24, 48 a 72 hodinách kultivace buněk MOLM-9 s interferony a/nebo s protilátkou byla sledována inhibice proliferace měřením inkorporace ^{3}H-thymidinu do DNA. Interferony IFN-α i IFN-β potlačují růst buněk linie MOLM-9 ve srovnání s kontrolními buňkami. IFN-γ také inhibuje proliferaci těchto buněk, ale s dobou působení antiproliferativní účinek IFN-γ klesá. Ošetření buněk MOLM-9 samotnou protilátkou proti molekule CD34 v koncentraci 61 μg/ml nebo 32 μg/ml nebo 16 μg/ml anebo v kombinaci s interferony má velmi podobný průběh. Oba typy ošetření (samotná protilátka anti-CD34 nebo kombinované ošetření) vykazují silnější antiproliferativní efekt než ošetření pouze s interferony na linii MOLM-9.

4.1.6 Účinek cytokinů a protilátky anti-CD34 na buněčný růst a diferenciaci buněk leukemické linie MOLM-9

Zkoumala jsem také účinek různých cytokinů [směs cytokinů: IL-3 (1 ng/ml) + IL-6 (10 ng/ml) + SCF (5 ng/ml) + G-CSF (1 ng/ml) + GM-CSF (1 ng/ml); nebo IFN-γ (0,125 μg/ml)] v kombinaci s protilátkou anti-CD34 (61 μg/ml) na buněčný růst a indukci diferenciace leukemické buněčné linie MOLM-9. Po 72 a 120 hodinách kultivace s danými látkami byla buněčná diferenciace vyhodnocena pomocí morfologické analýzy vytvořením cytospinových preparátů. Dále jsem hodnotila indukci diferenciace pomocí průtokové cytometrie- sledováním exprese povrchových membránových molekul nacházejících se u více diferenciovaných buněk, jako jsou CD14 a HLA-DR, ztrátu (snížení exprese)

molekuly CD34. Po ošetření IFN-γ se rapidně zvýšila exprese molekul CD38, CD14, HLA-DR zatímco exprese molekuly CD34 klesla oproti kontrolním neošetřeným buňkám. Ošetření ostatními látkami neovlivnilo expresi CD38, CD14 a HLA-DR. Pomocí morfologické analýzy (cytospinové preparáty) nebo průtokové cytometrie jsme neobjevili žádné znaky myeloidní nebo lymfoidní diferenciace po ošetření danými látkami. Inkubace buněk MOLM-9 se směsí cytokinů (IL-3+IL-6+G-CSF+GM-CSF+SCF) ze začátku inhibuje proliferaci, ale dobou působení (už po 48 hodinách) antiproliferativní účinek cytokinů klesá. Kombinované ošetření buněk MOLM-9 s cytokiny (IL-3+IL-6+G-CSF+GM-CSF+SCF) a INF-γ neovlivňovalo proliferaci buněk MOLM-9 během 48 hodin v porovnání s kontrolními buňkami, ale u buněk po 72 hodinách inkubace s cytokiny dochází k inhibici buněčného růstu linie MOLM-9. Ošetření buněk MOLM-9 směsí rekombinantních cytokinů (IL-3+IL-6+G-CSF+ GM-CSF+SCF) v přítomnosti protilátky anti-CD34 (61 μg/ml) inhibovalo proliferaci buněk MOLM-9.

4.2 LÉČBA POMOCÍ INHIBITORŮ DEACETYLÁZ HISTONŮ

V druhé části předkládané práce byl sledován účinek dvou inhibitorů deacetyláz histonů (suberoylanilid hydroxamové kyseliny, SAHA a kyseliny valproové, VPA) na indukci apoptózy a/nebo senescence a na zástavu buněčného růstu u leukemických buněčných linií MOLM-7, JURL-MK1, HL-60 a HEL.

4.2.1 SAHA i VPA inhibují proliferaci leukemických buněčných linií

K navození inhibice buněčné proliferace bylo použito látky SAHA v koncentracích 0,5-10μM a VPA v koncentracích 0,5-10 mM. K detekci životnosti buněk a inhibice proliferace byly použity stejné metody jako v případě sledování antiproliferativního účinku monoklonální protilátky anti-CD34. Výpočet byl taktéž proveden ze středních hodnot tripletů vyjádřených v cpm podle vzorce:

Inhibice proliferace [%] = [cpm (kontrolní) – cpm (ošetřené)] / cpm (kontrolní)]

4.2.1.1 Inhibice proliferace leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

SAHA i VPA inhibují proliferaci leukemických buněčných linií v závislosti na velikosti jejich dávky-koncentraci (čím vyšší koncentrace, tím silnější inhibice proliferace). Nejsilnější inhibiční účinek na linie JURL-MK1, HL-60 a HEL měly

koncentrace 2,5-10 μM pro SAHA a 2,5-10 mM pro VPA po 72 hodinách inkubace s inhibitory HDAC. Při ošetření linie MOLM-7 inhibitory HDAC (SAHA v koncetracích 0,5-5 μM a VPA v koncentracích 0,5-1 mM) klesala inhibice proliferace s dobou působení inhibitorů HDAC. Erytroleukemická linie HEL byla nejvíce citlivá k ošetření inhibitory HDAC. Hodnoty IC50 (koncentrace způsobující 50% inhibici proliferace) byly u linie HEL 0,3 μM pro SAHA a 0,3 mM pro VPA.

4.2.1.2 Účinek inhibitorů HDAC na životnost leukemických buněčných linií

Linie byly inkubovány v přítomnosti 0,5-10 μM SAHA a 0,5-10 mM VPA. Po 24, 48 a 72 hodinách byla zjištěna životnost buněk obarvením trypanovou modří. Počet živých buněk postupně klesal se zvyšující se koncentrací a dobou působení inhibitorů HDAC. V případě sledování (detekce) inhibice proliferace měřením inkorporace ^{3}H-thymidinu do DNA i při obarvení buněk trypanovou modří vykazovaly inhibitory HDAC největší cytotoxický efekt na linii HEL. Účinek inhibitorů HDAC na životnost leukemických linií v nejnižších koncentracích (0,5-1 μM pro SAHA a 0,5-1 mM pro VPA) byl zanedbatelný.

4.2.2 Indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

Vedle inhibice proliferace, jsme také sledovali, zda inhibitory HDAC indukují apoptózu u leukemických linií MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Buňky byly ošetřeny SAHA v koncentracích 0,5-10 μM a VPA v koncentracích 0,5-10 mM. Po 24, 48 a 72 hodinách jsme pomocí průtokové cytometrie měřili procentuální zastoupení TUNEL-pozitivních buněk. Naše data ukazují, že nejnižší koncentrace SAHA a VPA neindukují apoptózu u linií JURL-MK1 a HL-60. Vyšší koncentrace inhibitorů HDAC však prokazatelně zvýšují počet TUNEL-pozitivních buněk linie JURL-MK1 a HL-60 a to až k 40-60%. Koncentrace 0,5-10μM SAHA a 2,5-10mM VPA indukovaly fragmentaci DNA a zvyšovaly počet TUNEL-pozitivních buněk linie MOLM-7. Stejně jako u inhibice proliferace je indukce apoptózy závislá na koncentraci a době působení inhibitorů HDAC.

4.2.3 Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

Metodou průtokové cytometrie s použitím propidium jodidu jsem sledovala, zda ošetření SAHA v koncentracích 0,5-10 μM a VPA v koncentracích 0,5-10 mM ovlivnilo u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1 průběh buněčného cyklu.

U buněčné linie JURL-MK1 vystavené účinku 5 mM VPA docházelo po 24 hodinách k mírné zástavě v G1/G0 fázi buněčného cyklu a po 48 hodinách 5 mM VPA indukovala rovněž u buněk JURL-MK1 zástavu buněčného cyklu v G1/G0 fázi. Avšak delší dobou působení (72 hodin) vyšších koncentrací VPA docházelo už k rostoucí akumulaci buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. SAHA v koncentraci 1μM indukovala po 48 a 72 hodinách mírnou zástavu v G1/G0 fázi buněčného cyklu. Působením vyšších koncentrací SAHA na linii JURL-MK1 byla spuštěna apoptóza i bez zástavy buněčného cyklu, to můžeme pozorovat ze zvýšené akumulace buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. U linií HL-60 a MOLM-7 nebyla detekována zástava buněčného cyklu po ošetření SAHA nebo VPA. Avšak působením zvyšujících dávek SAHA a VPA roste i počet buněk akumulovaných v subG1 fázi buněčného cyklu během 72 hodin inkubace.

4.2.4 Indukce senescence leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

Inhibitory HDAC indukují zástavu buněčného cyklu a apoptózy u mnoha buněčných typů a jak bylo nedávno popsáno, jsou také schopny indukovat senescenci u normálních lidských fibroblastů a nádorových buněk (Munro et al., 2004; Ogryzko et al., 1996). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zjistit, zda inhibitory HDAC (SAHA a VPA) jsou schopny indukovat buněčnou senescenci u leukemických linií MOLM-7, HL-60, JURL-MK1. Detekce senescence byla provedena cytochemickým barvením, které umožňuje detekovat aktivitu β-galaktozidázy spojené se senescencí (SA-β-gal) při pH 6, která je jedním z biomarkerů senescence (Dimri et al., 1995). Buňky MOLM-7, HL-60 a JURL- MK1 byly inkubovány po dobu 24, 48, 72, 96 a 120 hodin se SAHA v koncentracích 1; 2,5; 5 μM a s VPA v koncentracích 1; 2,5; 5 mM. Buňky MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1 inkubované po dobu 24, 48, 72, 96 hodin nevykazovaly aktivitu SA-β-gal. Avšak po 120 hodinách (5 dnech) inkubace buněk MOLM-7, HL-60 a JURL- MK1 s inhibitory HDAC v koncentracích 1 a 2,5 μM pro SAHA a 1 a 2,5 mM pro VPA bylo u těchto buněk detekováno modré zabarvení,

prokazující zvýšenou aktivitu SA-β-gal. U kontrolních buněk nebyl pozorován vývoj modrého zabarvení. Avšak ve vyšších koncentracích SAHA i VPA indukovaly buněčnou smrt. Nejméně citlivá k indukci senescence byla linie HL-60.

5. DISKUZE

5.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34

Deregulované leukemické buňky prakticky všech typů leukémií vykazují poruchy fyziologické rovnováhy mezi diferenciací, proliferací a sebeobnovou ve prospěch proliferace (méně zralých) progenitorových buněk, klonálně pocházejících z leukemických (u leukemie) nebo myelomových (u myelomu) kmenových buněk (leukemia stem cells-LSC, myeloma stem cells-MSC). Nalezení specifických povrchových molekul exprimovaných na leukemických kmenových buňkách jak AML, tak i ostatních leukémií, myelomů a dalších nádorů má obrovský význam pro vývoj cílených terapeutik, především na bázi monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky cílené proti těmto povrchovým molekulám mohou představovat velice účinná terapeutika pro cílenou léčbu AML, CML i ostatních leukemií a nádorů. Jedním z předpokladů jejich účinnosti je však přesné zacílení na molekuly exprimované právě na leukemických kmenových buňkách, které mohou být i v klidovém neproliferujícím stavu a tedy rezistentní na látky inhibující buněčný cyklus. Dosud bylo prokázáno, že leukemické kmenové buňky u AML i CML mají membránový fenotyp CD34+ a CD38- nebo i CD34+ a CD38+ (Chan et al., 2008). Na základě těchto zjištění by mohla monoklonální protilátka proti molekule CD34 sloužit k cílené eliminaci leukemických kmenových buněk zodpovědných za rozvoj leukémií.

V naší laboratoři byla již dříve pomocí hybridomové technologie připravena myší monoklonální protilátka proti molekule CD34 třídy IgG1, klon 4H11, fúzí slezinných buněk myší imunizovaných buňkami CD34+ leukemické buněčné linie s buňkami myší myelomové linie SP2/0. Získaný hybridomový klon 4H11 produkoval monoklonální protilátku cílenou proti molekule CD34, která byla použita ve všech experimentech. V této práci jsem zkoumala účinek této purifikované myší monoklonální protilátky na proliferaci, diferenciaci a indukci buněčné smrti u leukemických buněčných linií. Jako model jsem si zvolila dvě **CD34+** leukemické buněčné linie **MOLM-9** a **JURL-MK1**, obě ustavené od pacienta s chronickou

myeloidní leukémií (CML) v blastickém zvratu, a pro srovnání jednu **CD34-** leukemickou buněčnou linii **PS-1,** ustavenou od pacienta s akutní T-lymfoblastickou leukémií. Dále jsem sledovala účinky různých rekombinantních cytokinů (směsi cytokinů: IL-3 + IL-6 + SCF + G-CSF + GM-CSF) nebo interferonů (IFN-α, IFN-β nebo IFN-γ) v kombinaci s naší protilátkou anti-CD34 na buněčný růst a indukci diferenciaci leukemické buněčné linie MOLM-9.

Ke sledování závislosti inhibice proliferace a životnosti leukemických buněk na koncentraci protilátky proti molekule CD34 jsem používala 5 různých koncentrací monoklonální protilátky v rozmezí 16-170 μg/ml během 72 hodin jejího působení na buněčné linie. Zjistila jsem, že růst CD34+ leukemických linií MOLM-9 a JURL-MK1 byl inhibován v závislosti na vzrůstající koncentraci a době působení protilátky. V koncentracích vyšších než 32 μg/ml však protilátka vykazovala nespecifický antiproliferativní účinek i na CD34- leukemickou buněčnou linii PS-1. Stejný účinek byl pozorován i na životnost těchto buněk. Z těchto výsledků lze odvodit, že monoklonální protilátka proti molekule CD34 by mohla *in vivo* potlačovat proliferační expanzi CD34+ leukemických kmenových i progenitorových buněk u leukémií, především CML i AML, což by mohlo být využito terapeuticky.

Jedním z možných účinků terapeutických monoklonálních protilátek je i přímá indukce apoptózy (Adams et al., 2005). Z tohoto důvodu jsem se rozhodla otestovat tuto protilátku, zdali je schopna indukovat apoptózu u leukemických CD34+ liniích MOLM-9, JURL-MK1 a pro srovnání i u CD34- linie PS-1. Ke sledování proapoptického účinku této protilátky jsem zvolila koncentraci 61 μg/ml, neboť působením nižších koncetrací (např. 32 μg/ml) na linii MOLM-9 nedošlo k výrazné indukci apoptózy (<10% apoptických buněk) a k ovlivnění buněčného cyklu. Monoklonální protilátka v koncentraci 61 μg/ml evidentně indukovala apoptózu u leukemických buněčných linií MOLM-9 a JURL-MK1. K vyššímu nárustu procenta apoptotických buněk však docházelo až po 72 hodinách působení protilátky, což bylo zřejmě způsobeno zástavou buněčného cyklu v G1 fázi během prvních dvou dnů u linie JURL-MK1 a po 24 hodinách u linie MOLM-9. Podobné výsledky zaznamenal, Zada et al. (2003), který ve své práci popisuje antiproliferativní a proapoptotický účinek monoklonální protilátky proti molekule CD44 na myeloidní leukemické buněčné linie. Tato protilátka je v současnosti již testována v preklinických studiích jako jedna z možných monoklonálních protilátek cílených na leukemické kmenové

buňky u AML (Jin et al., 2006; ten Cate et al., 2010). Naše protilátka proti molekule CD34 však neměla výrazný vliv na jednotlivé fáze buněčného cyklu u CD34- linie PS-1, avšak jejím působením docházelo i u této linie k indukci apoptózy. To by mohlo být způsobeno tím, že linie PS-1 byla ustavena od pacienta s tzv. "stem cell leukemií", která pochází z leukemických kmenových buněk - pravděpodobně z prekurzorů pro T-lymfoidní i myeloidní řadu (Stöckbauer,1986 a 2002). Přestože jsou PS-1 buňky opakovaně CD34-, jak ve fluorescenční mikroskopii, tak i v průtokové cytometrii, nelze vyloučit jejich možnou mikropozitivitu na tento antigen. A to by mohlo být příčinou nespecifické reziduální inhibice proliferace a indukce apoptózy této linie ve vyšších koncentracích protilátky proti CD34.

Interferony INF-α a INF-β mají významné účinky v léčbě mnoha maligních nádorů (Borden, 2005) a také se osvědčily při léčbě některých hematologických malignit, např. u chronické myeloidní leukémie (Allan et al., 1995) a u vlasatobuněčné leukémie (Jahagindar et al., 2001). INF-α a INF-β potlačují růst i leukemické buněčné linie MOLM-9. Benjamin et al. (2007) ve své práci popisuje antiproliferativní účinek IFN-α a IFN-β na sérii leukemických buněčných linií odvozených od AML. IFN-α a IFN-β inhiboval proliferaci buněk linie MOLM-9 účinněji než IFN-γ. Protilátka proti CD34 v různých koncentracích (16, 32 a 61 μg/ml) potencovala antiproliferativní účinek interferonů u linie MOLM-9.

Identifikace cytokinů ovlivňujících normální hematopoezu vznesla otázku, zdali cytokiny indukující diferenciaci normálních hematopoetických buněk, mohou též indukovat diferenciaci leukemických buněk do více zralých nedělících se buněčných stádií. Bylo prokázáno, že hematopoetické cytokiny samotné nebo ve vzájemných kombinacích mají schopnost indukovat terminální diferenciaci často doprovázenou i zástavou proliferace některých typů leukemických buněk (Leung et al., 2005; Sachs, 1996). Např. IL-3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-6, SCF, indukují diferenciaci myeloidních leukemických linií K562, HL-60, KG-1 a U-937 (Bedi et al., 1995; Ward et al., 1990). Jedna z možných funkcí molekuly CD34 může být právě blokování buněčné diferenciace kmenových a progenitorových buněk. Fackler a kol. (1995) zjistili, že posílení exprese molekuly CD34 brání v diferenciaci myší myeloblastické buněčné linie M1. Proto jsem zvolila jako jeden ze znaků stupně diferenciace resp. nezralosti leukemických buněk sledování exprese molekuly CD34. Jako model pro indukci diferenciace jsem si vybrala buňky linie MOLM-9, které jsem

inkubovala se směsí rekombinantních cytokinů (IL-3 + IL-6 + SCF+ G-CSF + GM-CSF) nebo s INF-γ nebo v kombinaci protilátky proti CD34 a směsí cytokinů. Indukci diferenciace jsem sledovala analýzou exprese některých povrchových molekul (CD34, CD14, CD38, HLA-DR) pomocí průtokové cytometrie (po 72 hodinách) a morfologickou analýzou cytospinových preparátů (po 3 a 5-ti dnech). Zjistila jsem, že inkubace buněk MOLM-9 s protilátkou proti CD34 nebo se směsí cytokinů nebo s jejich kombinací po dobu 72 hodin, významně neovlivnila expresi povrchových molekul oproti neošetřeným buňkám. Rovněž morfologickou analýzou cytospinových preparátů nebyl objeven žádný znak diferenciace. Dále jsem zjistila, že IFN-γ po 72 hodinách působení snižuje expresi antigenu CD34, což by mohlo být vysvětleno schopností IFN-γ stimulovat expresi MHC-II a jiných povrchových molekul vyskytujících se u více zralých buněk, jako např. CD38, CD14 a HLA-DR, v porovnání s neošetřenými kontrolními buňkami. Avšak morfologickým rozborem cytospinových preparátů nebyl objeven žádný konkrétní parametr diferenciace do myeloidní nebo lymfoidní řady.

Ačkoliv přesný mechanizmus indukce buněčné smrti a antiproliferativního účinku monoklonální protilátky proti molekule CD34 produkované naším klonem 4H11 je zatím neznámý, mohla by tato protilátka po dalších studiích na buněčných liniích a leukemických buňkách nemocných s AML a CML a po úspěšných preklinických testech na laboratorních zvířatech představit další novou alternativu pro cílenou léčbu leukemií. Zvláště pak v případech, kde byl neúspěšně používán gemtuzumab-ozogamicin, (anti-CD33 značená calicheamicinem) (Mylotarg), který nemusí eliminovat všechny leukemické kmenové buňky, jež mohou po léčbě opět nastartovat rozvoj relapsu leukemie a proto byl v roce 2010 stažen z indikací doporučených FDA. Nicméně stále zůstává mnoho problémů, které musí být vyřešeny. Jedná se zejména o expresi molekuly CD34 na jiných typech buněk, především na normálních endoteliálních buňkách a případně i na dalších typech buněk zejména nehematopoetického původu. Rovněž možné poškození normálních hematopoetických buněk se musí brát v úvahu a pečlivě prozkoumat. V případě možného poškození normálních hematopoetických buněk, ale zároveň i silného zničení leukemických buněk, by mohla tato protilátka představovat nový potenciální postup i pro předtransplantační přípravu před autologní i alogenní transplantací hematopoetických buněk.

Výsledky této studie byly publikovány v roce 2007 v časopise Neoplasma:

Elknerová K., Lacinová Z., Souček J., Marinov I., Stöckbauer P. Growth inhibitory effect of the antibody to hematopoietic stem cell antigen CD34 in leukemic cell lines. Neoplasma. 2007. 54: 311-20.

5.2 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ, SAHA A VPA

Epigenetické mechanizmy, jako je dysregulace exprese určitých specifických genů mohou mít zásadní význam při vzniku nádorů (Li et al., 2005; Ahn et al., 2008). Inhibitory histondeacetyláz mohou znovu indukovat expresi „umlčených" genů a tím inhibovat růst a přežití nádorových buněk (Kouraklis et al., 2006). Remodelace chromatinu působením inhibitorů HDAC může indukovat odpověď buňky na poškození DNA (Gaymes et al., 2006), což může v konečném důsledku vyvolat zahájení apoptózy nebo senescence (Gaymes et al., 2006; te Poele et al., 2002). Ještě v nedávné době se jevilo, že indukce apoptózy je hlavním přijatelným přístupem k nádorové léčbě. Nyní je však patrné, že nejen vyvolání apoptózy, ale i autofágie, mitotické katastrofy nebo senescence jsou dalšími potenciálními přístupy k terapii nádorů. Vzhledem k tomu, že u mnoha nádorů během jejich vývoje dochází k inaktivaci apoptotických cest, mohla by být senescence indukovaná terapií (TIS, therapy-induced senescence) dalším alternativním přístupem, který může zlepšit stávající protinádorovou terapii (Ewald et al., 2010). Senescence může být indukována např. doxurubicinem, aphidicolinem, cis-platinou, ionizačním zářením nebo etoposidem a to v závislosti na buněčném typu a koncentraci (Chang et al., 1999). Studie ukazují, že senescence je indukována, když je apoptóza blokována zvýšenou expresí BCL2 nebo inhibicí kaspáz (Crescenzi et al., 2003; Rebbaa et al., 2003). Z výzkumů vyplývá, že TIS by mohla sloužit jako „záložní" odpověď na terapii nádorů, u kterých jsou poškozené apoptické signalizační cesty (Schmitt et al., 2002). Výhodou TIS je, že může být vyvolána jak u raných tak i u pozdních stádií nádorů (Xue et al., 2007).

Sledovala jsem účinek různých dávek inhibitorů HDAC, SAHA (0,5-10 μM) a VPA (0,5-10 mM) na sérii leukemických buněčných linií (MOLM-7, JURL-MK1, HL-60, HEL). Zjišťovala jsem, při které dávce inhibitorů HDAC dochází k indukci zástavy buněčného cyklu, vyvolání apoptózy nebo senescence.

Antiproliferativní účinek inhibitorů HDAC byl popsán u normálních i transformovaných buněk (Schwarze et al., 2005). Zjistila jsem, že inhibitory HDAC, SAHA a VPA, inhibují buněčný růst u všech testovaných leukemických buněčných linií a to v závislosti na koncentraci a době působení. Nejsilnější inhibiční efekt

vykazovaly dávky v rozmezí 2,5-10 μM SAHA a 2,5-10 mM VPA. Hodnoty IC50 (koncentrace způsobující 50% inhibici proliferace) se u testovaných leukemických linií pohybovaly v rozmezí 0,2-3,8 μM pro SAHA a 0,3-1,6 mM pro VPA během 72 hodinové inkubace. Erytroleukemická linie HEL byla nejvíce citlivá k ošetření inhibitory HDAC, na rozdíl od myeloidní linie MOLM-7, která byla k ošetření inhibitory HDAC nejméně citlivá.

Inhibitory HDAC indukují apoptózu u mnoha typů nádorových buněk. V našich experimentech jsme zjistili, že indukce apoptózy působením SAHA nebo VPA byla různá u každé testované leukemické buněčné linie. U buněk MOLM-7 se vyvíjí rozsáhlá, rychlá, na koncentraci závislá apoptóza. Tyto výsledky jsou také potvrzeny analýzou buněčného cyklu. Apoptóza je u těchto buněk spuštěna i bez zástavy buněčného cyklu, což dokládá zvyšující se počet buněk akumulovaných v subG1 fázi buněčného cyklu během 72-hodinového ošetření inhibitory HDAC. Na rozdíl od buněk MOLM-7, buňky JURL-MK1 i HL-60 vstupují do apoptózy pomaleji, což dokazuje i nižší počet TUNEL-pozitivních buněk. Pravděpodobně se u nich však spouští i jiné formy buněčné smrti (nekróza, autofágie), což můžeme pozorovat z vyšší frakce Trypan-blue pozitivních buněk během 72-hodinového ošetření SAHA i VPA. Stejně jako u inhibice proliferace je i indukce apoptózy závislá na koncentraci a době působení inhibitorů HDAC. Nejsilnější indukce apoptózy bylo dosaženo po 72 hodinách u všech testovaných leukemických linií a nejsilnější proapoptotický účinek vykazovaly dávky 5 a 10μM pro SAHA a 5 a 10mM pro VPA.

Také byla testována aktivita β-galaktozidázy spojené se senescencí (SA-β-gal), která odlišuje senescentní buňky od ostatních živých i mrtvých buněk. Ustanovení senescenčního fenotypu trvá několik dní (3-7 dnů) na rozdíl od apoptózy, u které dochází k velmi rychlé aktivaci apoptických procesů a destrukci buňky během 24 hodin (Campisi et al., 2007; Chang et al., 1999; Schwarze et al., 2005). To potvrdily i naše výsledky, kdy k indukci senescence došlo až po 5 dnech působení inhibitorů HDAC u buněčných linií MOLM-7, JURL-MK1 a HL-60, na rozdíl od apoptózy, která byla patrná již po 48 hodinách působení inhibitorů deacetyláz histonů. Zda se buňka rozhodne spustit apoptotický program buněčné smrti nebo senescenční zástavu růstu závisí z části na velikosti stresu, jemuž byla buňka vystavena (Chang et al., 1999). Nižší stupeň poškození spouští antiproliferativní odpověď spojenou se senescencí bez aktivace kaskády kaspáz a spuštění

apoptického procesu. Naopak vyšší dávky léčiv způsobující vetší poškození DNA vyvolávají apoptotickou odpověď (Schwaze et al., 2005). To je v souladu i s našimi výsledky, ze kterých vyplynulo, že vyšší dávky SAHA i VPA indukují více apoptózu a naopak nižší dávky indukují senescenci. Toto zjištění by mohlo v podstatě přispět ke zlepšení protinádorové strategie a redukovat nežádoucí vedlejší efekty u mnoha léčebných protokolů a procedur (Schmitt, 2007).

Výsledky této studie byly publikovány v roce 2011 v časopise Neoplasma:

Elknerová K, Myslivcová D, Lacinová Z, Marinov I, Uherková L, Stöckbauer P. Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines - induction of cell death and senescence. Neoplasma. 2011. 58: 35-44.

6. ZÁVĚR

6.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34 (klon 4H11)

- inhibuje proliferaci a zastavuje buněčný cyklus v G1/G0 fázi u CD34+ buněčných linií
- indukuje apoptózu u CD34+ buněčných linií
- v koncentraci vyšší než 32 μg/ml však vykazuje nespecifický antiproliferativní a proapoptický efekt také u CD34- leukemické buněčné linie PS-1.
- potencuje antiproliferativní účinek interferonů a směsi rekombinantních cytokinů
- neindukuje myeloidní diferenciaci CD34+ leukemické linie MOLM-9 odvozené od nemocného s chronickou myeloidní leukemií v blastickém zvratu
- kombinované ošetření s INF-γ nebo směsí několika rekombinantních cytokinů neindukuje diferenciaci buněčné linie MOLM-9

6.2 EPIGENETICKÉ INHIBITORY HDAC - SAHA a VPA

- mechanizmus působení inhibitorů SAHA a VPA je komplexní a výsledný účinek závisí na individuálním buněčném kontextu (typu buňky), koncentraci a době působení HDACi
- inhibitory HDAC indukují mnohem silněji a rychleji apoptózu než senescenci
- pro indukci senescence je potřeba delší doby působení (5 dnů) a nižších koncentrací inhibitorů HDAC, než pro indukci apoptózy, která je patrná po 48 hodinovém ošetření vyššími dávkami inhibitorů HDAC

7. LITERATURA

- Adams GP, Weiner LM, Nature Biotechnol. 2005. 23: 1147-157.
- Ahn MY, Jung JH, Na YJ, Kim HS. Gynecol Oncol. 2008. 108: 27-33.
- Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. Lancet. 1995. 345: 1392-397.
- Bedi A. Sharkis SJ. Curr Opin Hematol. 1995. 2: 12-21
- Benjamin R, Khwaja A, Singh N, McIntosh J, Meager A, Wadhwa M, Streck C, Ng C, Davidoff AM, Nathwani AC. Blood. 2007. 109: 1244-7.
- Borden EC. J Interferon Cytokine Res. 2005, 25: 511-527
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007. 8: 729-40.
- Campisi. J. Cell. 2005. 120: 513-22.
- Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. Biochem J. 2003. 375: 263-74.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995. 92:9363-367.
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. J Natl Cancer Inst. 2010. 102: 1536-546.Fackle et al., 1995
- Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rassool FV. Mol Cancer Res. 2006. 4: 563-73.
- Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. Blood. 1995. 85: 3040-47.
- Chan WI, Huntly BJ. Semin Oncol. 2008. 35: 326-35.
- Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB. Cancer Res. 1999. 59: 3761-67.
- Jahagindar BN, Miller JS, Shet A, Vertaille CM. Exp Hematol. 2001. 29: 543-56.
- Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Nat Med. 2006. 12:1167-174.
- Kouraklis G, Theocharis S. Oncol Rep. 2006. 15: 489-94.
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Aging Cell. 2006. 5: 187-95.
- Leung KN, Mak NK, Fung MC. Crit Rev Clin Lab Sci. 2005. 42: 473-514.
- Li LC, Carroll PR, Dahiya R. J Natl Cancer Inst. 2005. 97: 103-15.
- Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK. Exp Cell Res. 2004. 295: 525-38.
- Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH. Mol Cell Biol. 1996. 16: 5210-218.
- Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Oncogene. 2003. 22: 2805-811.
- Sachs L. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 93: 4742-749.

- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. Cell. 2002. 109: 335-46.
- Schmitt CA. Biochim Biophys Acta. 2007. 1775: 5-20.
- Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF. Neoplasia. 2005. 7: 816-23.
- Stöckbauer P, Hradcová M, Novák JT, Němcová J, Leukocyte typing VII. New York: Oxford University Press. 2002: 63-68
- Stöckbauer P. Časopis lékařů českých. 2002. 141: 13-17
- Stöckbauer P. Kandidátská disertační práce. 1987
- Te Poele RH, Okorokov AL. Cancer Res. 2002. 62: 1876-83.
- ten Cate B, de Bruyn M, Wei Y, Bremer E, Helfrich W. Curr Drug Targets. 2010. 11:95-110.
- Tsuji-Takayama K. Hum Cell 1994. 7: 167-171
- Ward CJ, Crocker J, Chan SJ, Stockley RA, Burnett D. Biochem Biophys Res Commun. 1990. 167: 659-64.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Nature. 2007. 445: 656-60.
- Zada AA, Singh SM, Reddy VA, Elsässer A, Meisel A, Haferlach T, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. Oncogene. 2003. 22: 2296-308.

Seznam publikací

1. **publikace *in extenso,* které jsou podkladem disertace**

- Elknerová K., Lacinová Z., Souček J., Marinov I., Stöckbauer P. Growth inhibitory effect of the antibody to hematopoietic stem cell antigen CD34 in leukemic cell lines. Neoplasma. 2007. 54: 311-20. IF: 1,247
- Elknerová K, Myslivcová D, Lacinová Z, Marinov I, Uherková L, Stöckbauer P. Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines - induction of cell death and senescence. Neoplasma. 2011. 58: 35-44. IF: 1,247

2. **publikace *in extenso* ve volném vztahu k tématu disertace**

- Kuželová K, Pluskalová M, Brodská B, Otevřelová P, Elknerová K, Grebeňová D, Hrkal Z. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at subtoxic concentrations increases the adhesivity of human leukemic cells to fibronectin. J Cell Biochem. 2010. 109:184-95. IF: 3,285