

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**OBOR IMUNOLOGIE**

**IMUNOLOGICKÁ A EPIGENETICKÁ MODULACE GENOVÉ  
EXPRESE LEUKEMICKÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ**

**Mgr. Klára Elknerová**

Školitel: Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze

**Praha 2011**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20. 3. 2011

Identifikační záznam:

ELKNEROVÁ, Klára. *Imunologická a epigenetická modulace genové exprese leukemických buněčných linií. [Immunologic and epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines]*. Praha, 2011. 169 s., 3 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Vedoucí závěrečné práce Stöckbauer Petr.

Pokládám za milou povinnost poděkovat

ředitelům Ústavu hematologie a krevní transfuze Prof. MUDr. Pavlu Klenerovi, Dr.Sc, a Prof. MUDr. Marku Trněnému, CSc. za umožnění vypracování této disertační práce. Dále bych ráda poděkovala především svému školiteli Doc. RNDr. Petru Stöckbauerovi, CSc. za vedení a podporu během celého postgraduálního studia a při přípravě práce. Rovněž bych velmi ráda poděkovala za cenné připomínky a rady vedoucí oddělení buněčné biochemie RNDr. Kateřině Kuželové, Ph.D. Můj dík patří také MUDr. Iuri Marinovovi CSc., Gabriele Lindnerové a Jitce Němcové. Dále bych ráda poděkovala svým kolegyním Denise Myslivcové, Zuzaně Lacinové a Lence Uherkové za zájem a vytvoření přátelského a tvůrčího prostředí. V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala své rodině, především svému manželovi a mamince, za porozumění, trpělivost a pomoc a také své dcerce Emičce, která všechno urychlila.

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3. TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK .....</b>	<b>11</b>
3.1 STRUKTURA PROTILÁTEK (SEKRETOVANÝCH IMUNOGLOBULINŮ) .....	11
3.2 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY .....	13
3.2.1 <i>Mechanizmy účinku monoklonálních protilátek.....</i>	<i>16</i>
3.2.2 <i>Hybridomová technologie přípravy monoklonálních protilátek.....</i>	<i>19</i>
3.2.3 <i>Humanizace monoklonálních protilátek .....</i>	<i>21</i>
3.2.4 <i>Monoklonální protilátky nové generace.....</i>	<i>23</i>
3.2.4.1 <i>Fragmenty protilátek .....</i>	<i>23</i>
3.2.4.2 <i>Bispecifické protilátky.....</i>	<i>25</i>
3.2.5 <i>Přehled používaných monoklonálních protilátek v léčbě nádorových onemocnění.....</i>	<i>26</i>
3.2.5.1 <i>Nekonjugované monoklonální protilátky .....</i>	<i>26</i>
3.2.5.1.1 <i>Monoklonální protilátky proti membránovým molekulám leukocytů .....</i>	<i>27</i>
3.2.5.1.2 <i>Monoklonální protilátky blokující navázání ligandu a aktivaci příslušné signální dráhy ..</i>	<i>28</i>
3.2.5.1.3 <i>Monoklonální protilátky s antiangiogenním účinkem.....</i>	<i>29</i>
3.2.5.2. <i>Konjugované monoklonální protilátky .....</i>	<i>30</i>
3.2.5.3. <i>Monoklonální protilátky cílící leukemické kmenové buňky .....</i>	<i>31</i>
<b>4. CD34 .....</b>	<b>33</b>
4.1 STRUKTURA PROTEINU .....	33
4.2 GEN <i>CD34</i> .....	34
4.3 FUNKCE MOLEKULY CD34 .....	35
4.4 EXPRESE CD34 NA JINÝCH TKÁNÍCH A NÁDORECH .....	36
<b>5. LÉČBA POMOCÍ INHIBITORŮ DEACETYLÁZ HISTONŮ .....</b>	<b>38</b>
5.1 EPIGENETICKÝ APARÁT BUŇKY .....	39
5.2 DEACETYLÁZY HISTONŮ.....	40
5.3 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ (HDACI).....	44
5.4 APOPTÓZA, SENESCENCE A JEJICH OVLIVNĚNÍ HDACI .....	50
5.4.1 <i>Apoptóza .....</i>	<i>50</i>
5.4.1.1 <i>Vnější (receptorová) dráha .....</i>	<i>51</i>
5.4.1.2 <i>Vnitřní (mitochondriální) dráha.....</i>	<i>52</i>
5.4.2 <i>Senescence.....</i>	<i>55</i>
5.4.2.1 <i>Replikativní senescence-závislá na telomerách .....</i>	<i>58</i>
5.4.2.2 <i>Senescence nezávislá na telomerách .....</i>	<i>59</i>
5.4.2.2.1 <i>Senescence vyvolaná poškozením DNA .....</i>	<i>59</i>
5.4.2.2.2 <i>Senescence indukovaná změnou na chromatinu .....</i>	<i>60</i>

5.4.2.2.3 Senescence indukovaná onkogeny (OIS).....	60
5.4.2.2.4 Stres a jiné induktory senescence .....	62
5.4.2.3 Senescenční signální dráhy.....	62
5.4.2.3.1 p53 signální dráha .....	63
5.4.2.3.2 p16/pRB signální dráha .....	64
5.4.2.4 Sekreční fenotyp spojený se senescencí - dvojitý efekt senescence .....	65
<b>6. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>67</b>
6.1 CHEMIKÁLIE .....	67
6.2 ROZTOKY:.....	69
6.3 KULTIVACE BUNĚK .....	70
6.4 DETEKCE ŽIVOTNOSTI BUNĚK A ZÁSTAVY BUNĚČNÉHO RŮSTU .....	71
6.4.1 Detekce životnosti buněk pomocí trypanové modři .....	71
6.4.2 Detekce buněčného růstu (proliferace) - značení buněk <sup>3</sup> H-thymidinem.....	71
6.5 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU .....	72
6.6 SLEDOVÁNÍ APOPTÓZY POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE TESTEM TUNEL.....	74
6.7 IMUNOFENOTYPIZACE .....	75
6.8 DETEKCE SENESCENCE (SENESCENTNÍCH BUNĚK).....	76
6.9 MORFOLOGICKÁ ANALÝZA.....	77
<b>7. VÝSLEDKY.....</b>	<b>78</b>
7.1 TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK.....	78
7.1.1 Antiproliferativní účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 klonu 4H11 na leukemické buněčné linie .....	78
7.1.2 Účinek monoklonální protilátky proti molekule CD34 na životnost CD34+ a CD34- leukemických buněčných linií .....	80
7.1.3 Indukce apoptózy CD34+ a CD34- leukemických buněčných linií působením monoklonální protilátky anti-CD34 .....	81
7.1.4 Ovlivnění buněčného cyklu u leukemických buněčných linií CD34+ a CD34- působením protilátky proti molekule CD34 .....	84
7.1.5 Účinek interferonů IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ a monoklonální protilátky proti molekule CD34 na proliferaci buněk leukemické linie MOLM-9 .....	86
7.1.6 Účinek cytokinů a protilátky anti-CD34 na buněčný růst a diferenciaci buněk leukemické linie MOLM-9 .....	88
7.2 LÉČBA POMOCÍ INHIBITORŮ DEACETYLÁZ HISTONŮ .....	91
7.2.1 SAHA i VPA inhibují proliferaci leukemických buněčných linií.....	91
7.2.1.1 Inhibice proliferace leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC .....	91
7.2.1.2 Účinek inhibitorů HDAC na životnost leukemických buněčných linií .....	93
7.2.2 Indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC.....	95
7.2.3 Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC.....	98

7.2.4 Indukce senescence leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC .....	102
<b>8. DISKUZE .....</b>	<b>107</b>
8.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34 .....	107
8.2 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ, SAHA A VPA.....	111
<b>9. ZÁVĚR.....</b>	<b>114</b>
9.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA PROTI MOLEKULE CD34 (KLON 4H11) .....	114
9.2 EPIGENETICKÉ INHIBITORY HDAC - SAHA A VPA .....	115
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>116</b>
<b>11. POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>134</b>
<b>12. SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>137</b>
12.1 PŘÍLOHA A.....	138
12.1 PŘÍLOHA B.....	148
12.1 PŘÍLOHA C .....	158

# 1. ÚVOD

Tato práce se zabývá studiem antiproliferativního, proapoptického a diferenciacního 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 pupečnickové 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 diferenciaci, apoptózy nebo senescence těchto buněk. Sledovala jsem účinek dvou inhibitorů HDAC: suberoylanilidu hydroxamové kyseliny (SAHA) v koncentracích 0,5-10  $\mu\text{M}$  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. TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK

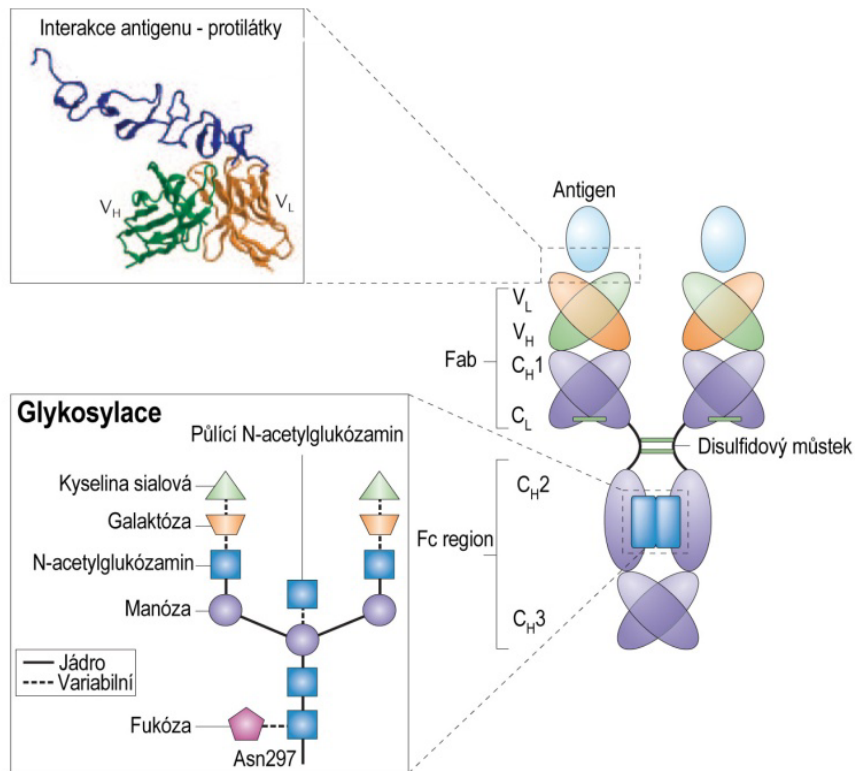
### 3.1 STRUKTURA PROTILÁTEK

#### (SEKRETOVANÝCH IMUNOGLOBULINŮ)

V roce 1972 byla Rodneymu R. Porterovi a Geraldovi M. Edelmanovi udělena Nobelova cena za objasnění struktury imunoglobulinů. Protilátky (sekretované imunoglobuliny) jsou bílkovinné molekuly náležející do rozsáhlé rodiny imunoglobulinů (IgSF), které jsou charakteristické přítomností několika úseků na bílkovinném řetězci, nazývaných imunoglobulinové domény. Do této rodiny jsou také zahrnuty např. receptory pro antigen na T lymfocytech, složky komplexu CD3 T lymfocytů, molekuly HLA I. i II. třídy a některé adhezivní molekuly (např. ICAM-1) (Williams et al., 1988; Harpaz et al., 1994; Torres et al., 2008). Z imunochemického hlediska patří protilátky na základě své elektroforetické pohyblivosti do  $\gamma$  frakce krevních bílkovin, a proto také byly nazývány gammaglobuliny. Tvar molekuly protilátek můžeme schématicky znázornit písmenem Y (obr.1). Jejich základní struktura je tvořena čtyřmi polypeptidickými řetězci, uspořádanými do dvou zrcadlově identických párů **lehkých (L, Light chain)** a **těžkých řetězců (H, Heavy chain)**. Dva těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidovými (cystinovými) můstky a ke každému těžkému řetězci je připojen cystinovým můstkem jeden lehký řetězec typu  $\kappa$ , nebo  $\lambda$ . Na základě rozdílů ve struktuře těžkých řetězců rozlišujeme pět základních typů těžkých řetězců, označovaných malými písmeny řecké abecedy –  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , čímž je v podstatě determinována příslušnost protilátky k jednotlivým třídám a podtřídám imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE). Každý řetězec obsahuje jednu N-terminální imunoglobulinovou doménu neboli variabilní doménu (označují se  $V_H$  a  $V_L$ ), charakterizovanou rozmanitým složením aminokyselin. Každá V-doména se skládá ze tří hypervariabilních úseků tzv. CDR úseků (complementarity determining regions) určujících antigenní specifitu protilátek. Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí vazebné místo pro antigen. Každý řetězec obsahuje jednu nebo více C-terminálních imunoglobulinových domén, označovaných také jako konstantní domény (C), shodné u řetězců téhož typu. Označujeme je  $C_L$  u lehkého

řetězce a C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 popřípadě C<sub>H</sub>4 u těžkého řetězce; číslování jde od N-konce k C-konci. Konstantní domény odpovídají za efektorové funkce protilátek, např. za vazbu komplementu, za interakci s Fc receptorem (Normansell, 1985). Domény C<sub>H</sub>1 a C<sub>H</sub>2 jsou mezi sebou spojeny pantovým (hinge) úsekem, tvořeným disulfidickými vazbami a prostřednictvím tohoto úseku se může přizpůsobit tvar vazebného místa na protilátce konkrétní antigenní struktuře (Schroeder et al., 2010). Těžké řetězce jsou v Fc části glykosylovány, což přispívá ke stabilitě imunoglobulinové molekuly (Arnold et al., 2007). Protilátky třídy IgM a IgA vytvářejí polymerní struktury. Skládají se z několika základních podjednotek, které jsou spojeny strukturně odlišným polypeptidovým řetězcem označovaným jako J-řetězec (joining chain). Každá V nebo C doména obsahuje přibližně 110 - 130 aminokyselin. Oba imunoglobulinové L řetězce obsahují jednu konstantní (C) doménu, zatímco H řetězce obsahují 3 nebo 4 C domény. Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými spojovacími úseky polypeptidového řetězce. Přibližná molekulová hmotnost L řetězce je 25 kDa a H řetězce je 50 – 75 kDa (podle konkrétní třídy řetězce) (Schroeder et al., 2010).

Působením proteolytických enzymů na molekulu imunoglobulinů lze získat charakteristické fragmenty. Papain štěpí protilátku na dva identické **Fab** (Fragment antigen binding) fragmenty, z nichž každý obsahuje jedno vazebné místo pro antigen, a jeden fragment **Fc** (Fragment crystalizable). Fab se skládá z celého lehkého řetězce a z variabilní a C<sub>H</sub>1 části H řetězce. Fab fragment lze ještě štěpit na další dva fragmenty: Fv (variable fragment), skládající se z V<sub>H</sub> a V<sub>L</sub> domén, a konstantní fragment složený z C<sub>L</sub> a C<sub>H</sub>1 domény. Působením pepsinu na protilátku, můžeme získat jeden dimerický F(ab')<sub>2</sub> fragment a Fc' fragment (Smith et al., 2004).



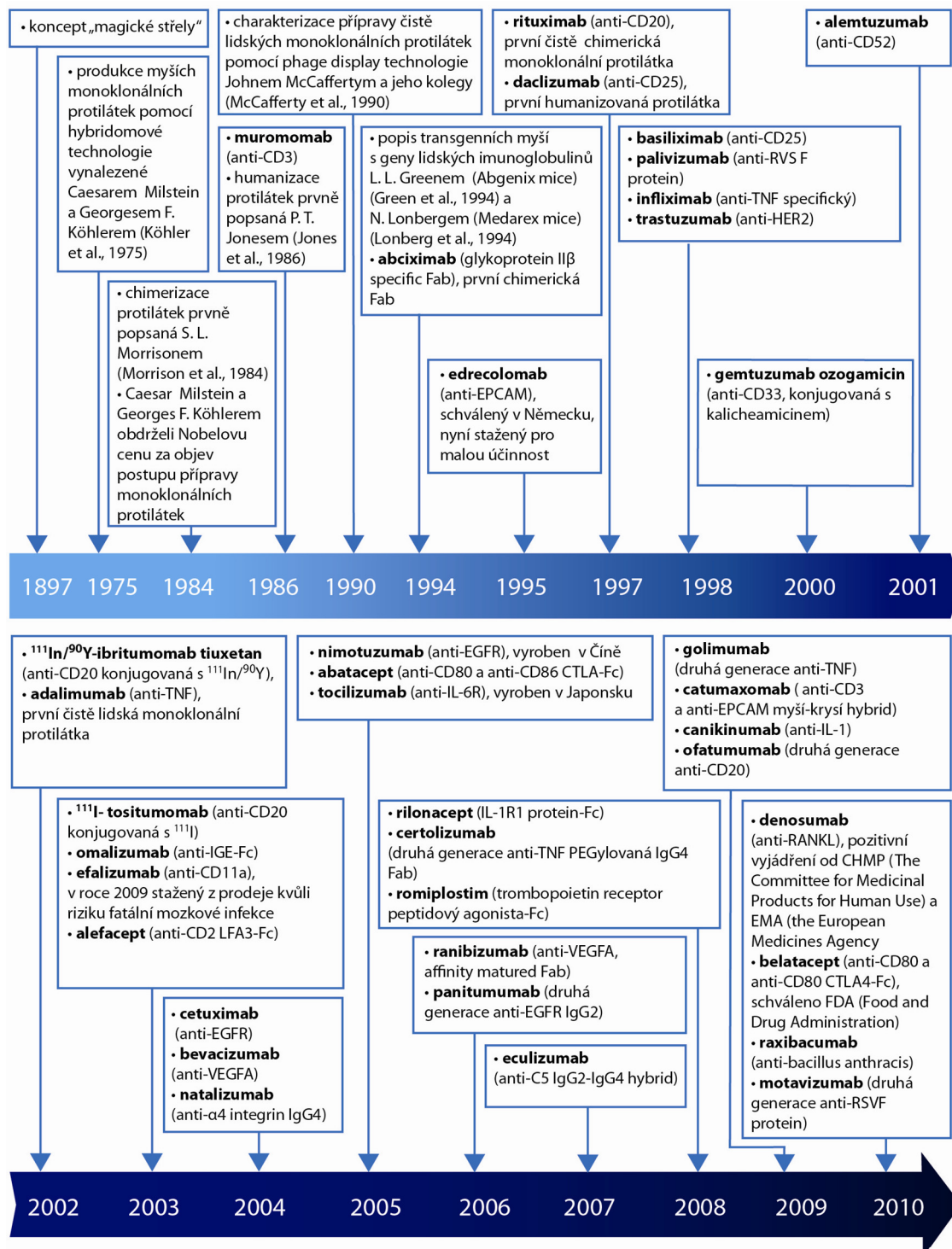
Obr. 1: Struktura protilátek (imunoglobulinů). Převzato a upraveno z Cartera et al., 2006.

### 3.2 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Imunitní systém představuje jeden ze základních homeostatických systémů organismu. Je zcela unikátní a nezastupitelný svou schopností rozpoznávat a eliminovat buňky napadené virem nebo bakteriemi nebo nádorově transformované buňky od buněk vlastních a zdravých. Důležitou vlastností specifické imunity je schopnost organismu rozpoznat cizorodý antigen a iniciovat tvorbu molekul imunoglobulinů (monoklonálních protilátek) s vysokou specificitou a aviditou k rozpoznávanému antigenu. Prvním z řady vědců, kteří přispěli k pochopení mechanismů specifické imunity, byl počátkem 20. století německý chemik a mikrobiolog Paul Ehrlich. Do lékařské praxe zavedl pojem imunoterapie. Jeho idea „otrávených šípů či magických střel“ coby substancí schopných neutralizovat toxiny a bakterie byla vizionářská a pozoruhodně blízko skutečné podstatě protilátek (Adam et al., 2005; Ehrlich, 1906). Nicméně trvalo dalších 100 let, než

se podařilo zavést některé imunoterapeutické postupy do klinické praxe. Důležitým milníkem v imunoterapii byl rok 1975, kdy Caesar Milstein a Georges F. Köhler publikovali postup přípravy monoklonálních protilátek (jsou produkovány jedním klonem B-buněk, mají přesně definované vlastnosti a jsou namířeny jen proti stejným epitopům), pomocí tzv. hybridomů (fúzní produkty myší nesmrtelné myelomové buňky a imunizovaného B lymfocytu tvořícího protilátky) (popis metody na str. 19) (Köhler, Milstein et al., 1975). Za tento objev pak byli oba vědci v roce 1984 odměněni Nobelovou cenou. Avšak Milsteinův a Köhlerův postup dovozoval získat jen myší monoklonální protilátky. Do 2 – 3 týdnů po prvním terapeutickém podání pacientovi vyvolávaly tyto myší protilátky tvorbu lidských neutralizačních protilátek označovaných jako **HAMA** (human anti-mouse antibodies), které inhibovaly biologickou účinnost podané monoklonální protilátky. Nejenže znemožňovaly navázání monoklonální protilátky na cílový antigen, ale také mohly způsobit sérovou nemoc nebo anafylaxi. Z těchto důvodů se usilovalo o vývoj technologie přípravy lidských monoklonálních protilátek a chimerických humánních/myších (humanizovaných) protilátek (obsahující část lidských a část myších sekvencí aminokyselin). Původ protilátky poznáme podle generického názvu - čistě myší (označují se koncovkou *-momab* např. muromomab), chimerické (označují se koncovkou *-ximab*, např. rituximab), humanizované (se zakončením *-zumab*, např. alemtuzumab), nebo čistě lidské (označují se koncovkou *-mumab*, např. ofatumumab) (obr. 5 ). Monoklonální protilátky se dlouhou dobu používaly převážně k diagnostickým účelům. Teprve v roce 1997 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration), schválil použití první monoklonální protilátky (anti-CD20, rituximab, Mabthera) pro klinické využití v terapii chronické lymfatické leukemie a nehodgkinských lymfomů (Belada, 2008; Weiner et al., 2010).

Výzkum a vývoj terapeutických monoklonálních protilátek je velmi rychle se rozvíjejícím odvětvím. V posledních 25 letech bylo více než 30 imunoglobulinů (IgG) a jejich derivátů schváleno k užití pro léčbu různých onemocnění (viz. obr. 2) (Reichert, 2010). Monoklonální protilátky se ukázaly být efektivními terapeutickými prostředky v léčbě celé řady onemocnění, včetně vzrůstajícího počtu lidských malignit, ale také se široce uplatňují v diagnostice.



Obr. 2: Historie a časová linie schválených IgG monoklonálních protilátek v posledních 24 letech; koncovka v názvu protilátky označuje její původ: **-omab** (myší IgG2), **-ximab** (myší-lidská chimerická IgG1), **-zumab** (humanizovaná IgG1), **-umab** (lidská monoklonální protilátka získaná

phage display technologií nebo z transgenních myší), **-cept** (Fc-fúzní protein), **-stim** (Fc-fúzní peptid), **-axomab** (trifunkční, bispecifická myší-kryší hybrid). C5 (protein komplementu C5), CTLA (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), EGFR (epidermal growth factor receptor), EPCAM (epithelial cell adhesion molecule), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), I (jódi), IL-6R (interleukin-6 receptor), In (indium), LFA3 (lymphocyte function-associated antigen 3), TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2), RVS (respiratory syncytial virus), Y (yttrium), VEGFA (vascular endothelial growth factor A). Převzato a upraveno z Beck et al., 2010.

### 3.2.1 Mechanizmy účinku monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky jsou schopny reagovat s konkrétním antigenem, proti kterému jsou namířeny. Tato reakce může vést k celé řadě dalších dějů, jež mohou být terapeuticky využity (Sobotková et al., 2008). Jak již bylo řečeno dříve, antigenní komplementarita protilátky je vázána na variabilní úseky Fab fragmentů, zatímco Fc úsek zprostředkovává efektorové funkce protilátky. Mezi efektorové mechanismy účinku monoklonálních protilátek, kterými dochází k likvidaci nádorových buněk, patří fagocytóza, na protilátkách závislá cytotoxická reakce (ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity) nebo aktivace klasické dráhy komplementu (CDC, complement-dependent cytotoxicity).

- **CDC, aktivace klasické dráhy komplementu**

Velmi silnými aktivátory klasické dráhy komplementu jsou podtřídy IgG, zejména IgG1 a IgG3. Po vazbě dvou nebo více příslušných protilátek na bakteriální, eukaryotickou nebo transformovanou nádorovou buňku dojde k vazbě proteinu C1 (C1, složka komplementu, skládá se z C1q, C1r a C1s podjednotek). Tato vazba je zprostředkována vysoce afinitní podjednotkou C1q proteinu C1, která se váže na Fc doménu protilátky. Tím se aktivuje enzymatická aktivita C1r podjednotky proteinu C1 a C1 nabude proteolytické aktivity. Poté dochází ke kaskádové aktivaci ostatních složek komplementu. Výsledkem této kaskády je tvorba MAC komplexu (MAC-membrane attack complex) ze složek C5b-C9 komplementu na povrchu buňky a současně se uvolňují chemotaktické fragmenty C3a a C5a. MAC proniká do membrány buňky a působí její lýzi, čímž ji usmrtí. Uvolněné chemoatraktanty vedou ke kumulaci leukocytů (makrofágů, bazofilů,



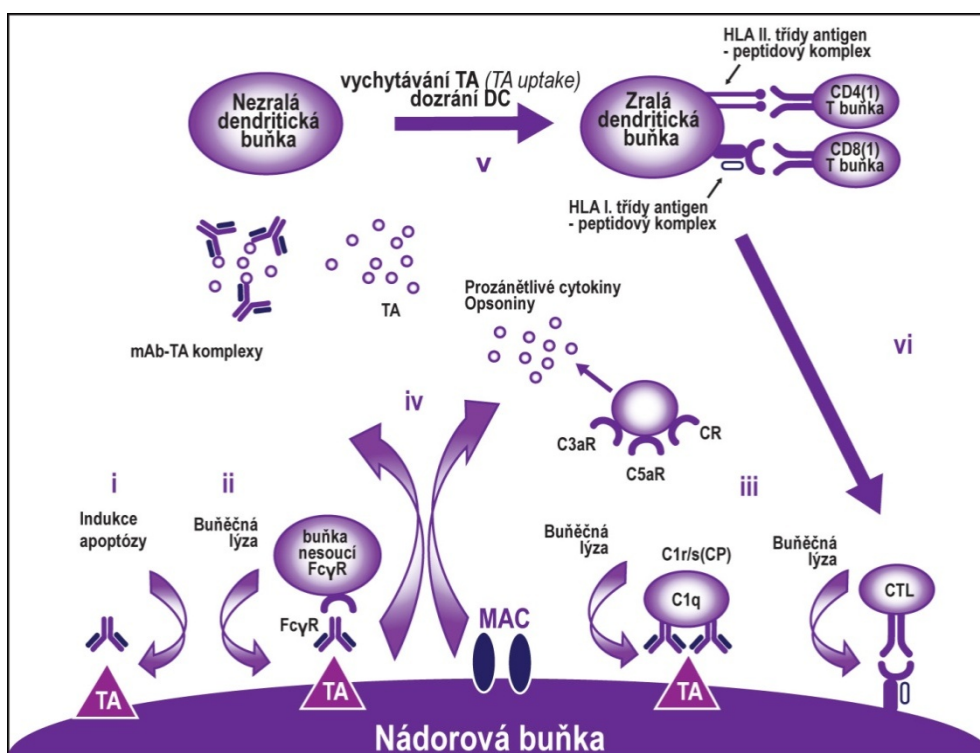
eosinofilů, neutrofilů, žírných buněk) a k iniciaci zánětlivé imunitní odpovědi (Dunkelberger et al., 2010; Zipfel et al., 2009; Cwiertka et al., 2004).

- **ADCC, na protilátkách závislá cytotoxicita**

Některé populace leukocytů (neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, NK buňky a zejména makrofágy) exprimují na svém povrchu Fc receptory a prostřednictvím Fc konce protilátky navázané např. na povrchu nádorové buňky rozpoznávají a následně fagocytují tyto buňky. Nejvíce studovanými Fc receptory jsou receptory vázající IgG tzv. Fc $\gamma$ R, které náležejí do superrodiny imunoglobulinů. U lidí byly identifikovány 3 třídy Fc $\gamma$ R: I, II a III. Fc $\gamma$ RII a Fc $\gamma$ RIII mají ještě dvě isoformy A a B. Fc $\gamma$ R jsou v různých stupních exprimovány na mnoha hematopoetických buňkách, ale také i na jiných buňkách, jako např. na endoteliálních buňkách. Fc $\gamma$ R vážou s různou afinitou IgG, např. Fc $\gamma$ RI vykazuje nejvyšší vazebnou afinitu k IgG, zatímco Fc $\gamma$ RII a Fc $\gamma$ RIII vážou IgG s nižší afinitou. Z tohoto důvodu Fc $\gamma$ RI váže monomerní molekulu IgG, kdežto Fc $\gamma$ RII a Fc $\gamma$ RIII vážou pouze agregované IgG nebo imunokomplexy (Schroeder et al., 2010). Fc $\gamma$ R se také odlišují přenosem signálu (signalizačními cestami). Po navázání IgG na Fc $\gamma$ R, jejichž cytoplazmatická strana obsahuje tzv. ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) motivy nebo ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) motivy, se přenášejí buď aktivační, nebo inhibiční signály. Výsledek interakce protilátky vázané na antigen s buňkou nesoucí Fc $\gamma$ R závisí na poměru mezi inhibičními a stimulačními signály, na konkrétní podtřídě IgG, konkrétním typu receptoru (Nimmerjahn et al., 2007). Hlavním inhibičním receptorem Fc $\gamma$ R je Fc $\gamma$ RIIB (CD32), zatímco stimulační (aktivační) signály jsou přenášeny skrze Fc $\gamma$ RIIA (CD32A), Fc $\gamma$ RI (CD64) a Fc $\gamma$ RIIIA (CD16A). Fc $\gamma$ RI a Fc $\gamma$ RIIIA neobsahují ITAM a k přenosu signálu potřebují přidružený adaptorový protein (tzv.  $\gamma$ -řetězec) s ITAM motivem (Hamers-Casterman et al., 1993). Navázání IgG protilátek na nádorové buňky, umožní jejich rozpoznání efektorovými imunitními buňkami exprimujícími Fc $\gamma$ R receptory (makrofágy, DC, neutrofilů, NK buňky). Propojení Fc $\gamma$ R receptorů na těchto buňkách indukuje ADCC a tím destrukci nádorové buňky (obr. 3). Po destrukci (lýzi) nádorové buňky pohltí zbytky lyzovaných buněk fagocytující buňky (antigen-prezentující buňky, dendritické buňky), které tyto zbytky zpracují a vystaví na svém povrchu komplexy MHC molekul II. třídy s

antigeny (peptidy) nádorové buňky a podpoří tak CD4+ T buněčnou odpověď (aktivaci). Zároveň mohou být nádorové peptidy prezentovány MHC molekulami I. třídy (cross-presentation), což vyústí v aktivaci CD8+ cytotoxických T buněk (obr. 3) (Weiner et al., 2010).

- Dalším zvažovaným cytotoxickým mechanismem, který může monoklonální protilátka navodit, je rozvoj vlastní imunitní reakce tvorbou antiidiotypových protilátek (Fischer et al., 2007; Jerne, 1974; Spendlove et al., 2000) nebo indukce apoptózy (Adams et al., 2005). Terapeutický účinek monoklonálních protilátek může také spočívat v blokádě vazby ligandu na specifický receptor buď neutralizací ligandu, nebo vazbou na extracelulární doménu receptoru, kdy monoklonální protilátka blokuje aktivaci příslušných signálních dráh (Klener et al., 2010).



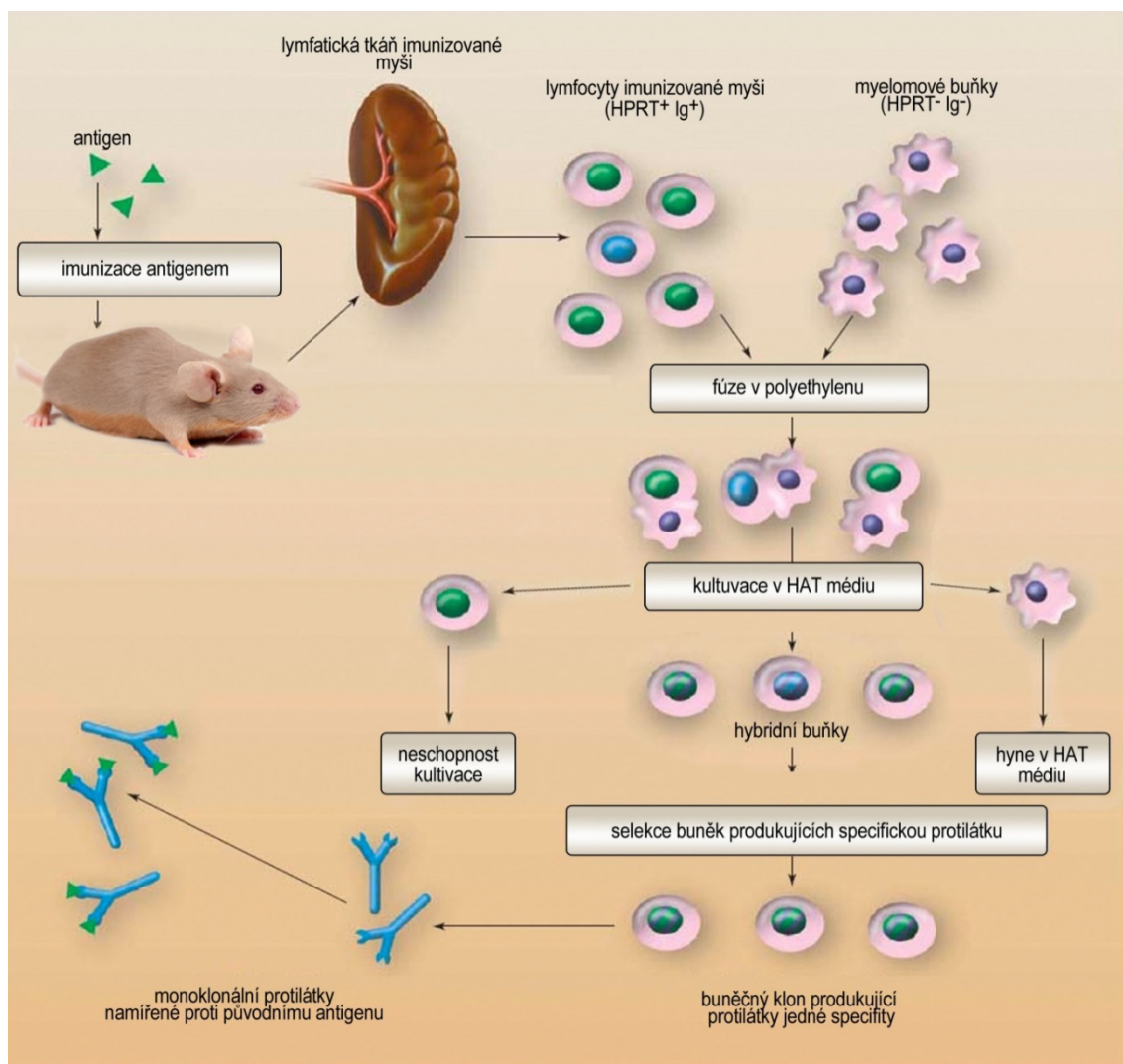
Obr. 3: Mechanismus účinku monoklonálních protilátek (mAb). Monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům mohou i) indukovat buněčnou smrt nebo aktivovat ii) ADCC a iii) CDC-formace MAC komplexu, tvorbu opsoninů C3b a uvolnění chemoatraktivních složek komplementu C3a a C5a. Kulminace těchto událostí vede k uvolnění Th1 specifických cytokinů, iv) formaci komplexů monoklonální protilátka-nádorový antigen (TA, tumor antigen) a v) vychytávání TA a komplexů mAb-TA antigen prezentujícími buňkami (APC). Nakonec zralé dendritické buňky (DC) zpracují TA a vystaví je na svém povrchu v komplexu s HLA I. nebo II. třídy CD4+ a CD8+

T lymfocytům a podpoří tvorbu TA-specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL). Převzato a upraveno z Campoli et al., 2010.

### 3.2.2 Hybridomová technologie přípravy monoklonálních protilátek

Hybridomová technologie přípravy monoklonálních protilátek byla prvně popsána v roce 1975 Caesarem Milsteinem a Georgem F. Köhlerem (Köhler and Milstein, 1975). Její podstatou je spojení (fúze) nádorových (myelomových) buněk s B lymfocyty získanými ze sleziny myši, které byly imunizované požadovaným antigenem. Důvodem této fúze byla krátká životnost zralých diferencovaných B lymfocytů, které jsou potenciálním zdrojem protilátek. Naproti tomu, myelomové buňky jsou nádorové buňky, vzniklé maligní transformací plazmatické buňky, mají nekonečný proliferativní potenciál a nemusí tvořit protilátky. Po *in vitro* fúzi vznikají hybridní buňky tvořící hybrid-myelom. Takto vzniklé hybridní buňky se nazývají **hybridomy**. Jsou schopny produkovat protilátky specifické pro použitý antigen a zároveň získaly nesmrtelnost myelomových buněk. Proces hybridizace se skládá z několika kroků (obr. 4). Nejprve je experimentální zvíře (myš) imunizováno specifickým antigenem. Z jeho sleziny (nebo jiné tkáně) je získána směs lymfocytů, z nichž některé tvoří protilátku proti podanému antigenu. Tyto lymfocyty jsou poté fúzovány s myelomovými buňkami v roztoku polyethylenglykolu (používá se k urychlení spojení buněk). Po fúzi zůstávají v médiu nefúzované lymfocyty, myelomové buňky a hybridní buňky. Proto je nutno po fúzi aplikovat selekční systém, který umožní eliminaci obou rodičovských buněk a v médiu zůstanou jen hybridní buňky. Pro selekci hybridních buněk se používá tzv. HAT (hypoxanthin-aminopterin-thymidin) médium, které obsahuje aminopterin (blokuje *de novo* syntézu purinových a pyrimidinových bazí), hypoxantin a thymidin. Selektce vychází ze skutečnosti, že lymfocyty odumírají (postrádají schopnost růstu *in vitro*) a nefúzované myelomové buňky jsou eliminovány působením HAT média, jelikož jsou deficientní v enzymu hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferázy (HGPRT) potřebného pro tvorbu purinových nukleotidů. Myelomové buňky postrádající (deficientní) HGPRT nejsou schopny zpracovávat hypoxantin, jediný dostupný zdroj purinových bazí vzhledem k přítomnosti inhibitoru aminopterinu a proto v HAT médiu nepřežívají. Jedině hybridní buňky přežívají a jsou schopny množit se v selekčním médiu, protože mají *hgprt* gen pocházející od B lymfocytů a od

myelomových buněk získávají schopnost neomezeně proliferovat. Hybridní buňky velmi rychle rostou a produkují protilátky. V dalších krocích se hybridní buňky selektují a klonují, tak aby se získala hybridní linie produkující monoklonální protilátku proti požadovanému antigenu. Vyselektované varianty se analyzují a potřebné klony se rozmnoží. Dalším náročným krokem hybridomové technologie, vedle selekce a identifikace klonů hybridomů produkujících protilátku požadované specifity, je přesná charakterizace získaných protilátek. Musí se identifikovat všechny možné křížové reakce, zjistit použitelnost ve funkčních testech i stabilita a způsoby čištění a uchovávání. Buňky hybridomu se uchovávají v kapalném dusíku a monoklonální protilátky se produkují *in vitro* kultivací hybridomových buněk v médiu nebo v peritoneu syngenních myší jako ascitické tekutiny. Monoklonální protilátky se z ascitické tekutiny purifikují chromatografií (obr. 4) (Shirahata et al., 1998; Kovář, 1999; Pirofski et al., 1990)



Obr. 4: Hybridomová technologie přípravy monoklonálních protilátek. Převzato a upraveno ze Sobotková et al., 2008

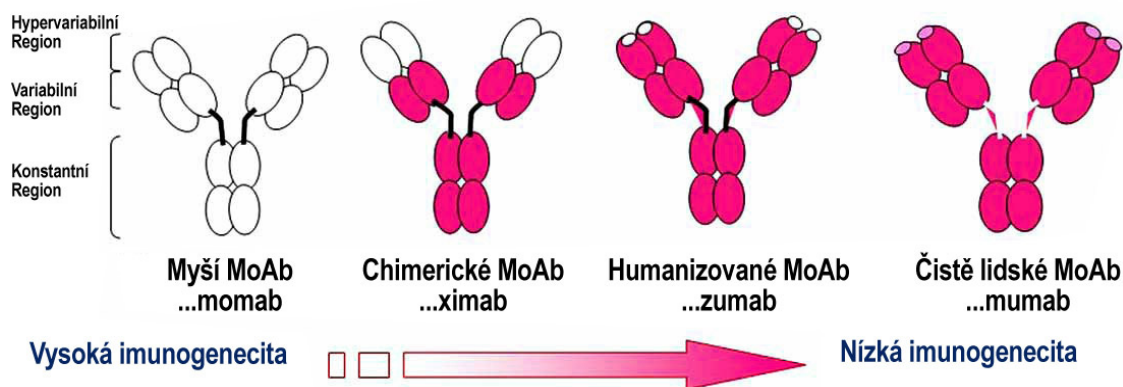
### 3.2.3 Humanizace monoklonálních protilátek

Jak již bylo řečeno dříve, první monoklonální protilátky připravené hybridomovou technologií byly myšičího původu. Terapeutická použitelnost těchto protilátek byla velmi limitovaná, jelikož po podání pacientům byly rozpoznávány imunitním systémem pacienta jako cizí, což vedlo k jejich rychlé eliminaci způsobené tvorbou lidských anti-myšičích protilátek (HAMA). Vzhledem k jejich myšičímu původu, tyto protilátky také neinteragovaly řádně s komponentami lidského imunitního systému a jejich biologická účinnost byla velmi omezena. K překonání těchto nevýhod bylo věnováno značné úsilí rozvoji technologií přípravy chimerických a humanizovaných monoklonálních protilátek (Yamashita et al., 2007; Chames et al., 2009).

Chimerické monoklonální protilátky jsou vytvořeny spojením myšičí variabilní domény, odpovědné za vazbu k antigenu s konstantní částí lidské protilátky (Neuberger et al., 1985). Jsou ze 70 % lidské a obsahují celou lidskou Fc část, odpovědnou za interakci s lidskými efektorovými buňkami imunitního systému a komplementovou kaskádou (Chames et al., 2009). První chimerickou protilátkou schválenou k léčbě v roce 1997 byl rituximab (anti-CD20) (Beck et al., 2010). Přesto však její variabilní oblast odvozená od myšičí protilátky vyvolává tvorbu anti-chimerických protilátek (HACA) (Matsuda et al., 1996). S rozvojem technik přípravy monoklonálních protilátek se protilátky dále „humanizovaly“. Humanizované monoklonální protilátky jsou už z 90 % lidské a myšičího původu jsou jen CDR oblasti (complementarity determining region), které reagují s antigenními epitopy. Jejich příprava spočívá v propojení hybridomové a DNA rekombinantní technologie. Nejprve se pomocí hybridomové technologie získá myšičí monoklonální protilátka proti požadovanému antigenu a následně se z hybridomu produkující požadovanou protilátku připraví mRNA a z ní reverzní transkripcí cDNA. Potom se polymerázovou řetězovou reakcí amplifikují úseky genů kódující hypervariabilní domény CDR myšičího imunoglobulinu a touto částí genetické informace se nahradí CDR lidského imunoglobulinu. Geny kódující humanizovanou monoklonální protilátku jsou po té vloženy do vhodné savčí

buňky, ve které jsou velkokapacitně syntetizovány (Cwiertka et al, 2004). První používanou humanizovanou monoklonální protilátkou byl daclizumab (anti-CD25). Je používán v transplantologii jako ochrana před akutní rejekcí u nemocných po transplantaci ledviny (Vincenti, 2005). Nicméně i proti těmto protilátkám je organizmus schopen tvořit protilátky HAHA (human anti-human antibodies). Pro zamezení imunogenicity chimerických a humanizovaných protilátek došlo v dalších letech k vývoji metod přípravy čistě lidských monoklonálních protilátek (Yamashita et al., 2007). Jednou z nich je metoda „phage display“ vyvinutá Johnem McCaffertym a jeho kolegy v roce 1990. Principem této metody je fúze genových segmentů kódujících variabilní domény protilátek s geny kódujícími povrchovou bílkovinu bakteriofága. Buňky *E. coli* jsou infikovány bakteriofágy, do jejichž DNA byl vpraven úsek cizorodé DNA (genový segment variabilní části těžkého a lehkého řetězce protilátky). Exprimované peptidové sekvence jsou exponovány na povrchu fága. Pro selekci interakčních partnerů jsou fágové částice aplikovány na kolonu s imobilizovaným cílovým proteinem. Fágy s exponovaným peptidem vykazujícím nejvyšší afinitu k imobilizovanému proteinu, jsou na koloně zadrženy, zatímco ostatní fágy jsou promýváním uvolněny. Fágy zachycenými na koloně jsou infikovány bakterie, z nichž je následně izolována DNA, kódující příslušný peptid, který je sekvenován. Při selekci fága se jako vzor k získání humánní variabilní oblasti z fágové knihovny proteinů použije variabilní část myší protilátky. Tím se získá plně humanizovaná protilátka, jejíž sekvence je identická se strukturou lidského imunoglobulinu (Mayer, 2007; Wildová et al., 2008; Tomimatsu et al., 2009). První zavedenou plně humánní protilátkou byl v roce 2002 adalimumab (anti-TNF), používaný pro léčbu Crohnovy choroby (Beck et al., 2010). Další metodou přípravy plně humánních protilátek je využití transgenních myší (Abgenix mice, Medarex mice), jejichž geny pro Ig-těžké a Igκ lehké řetězce jsou nahrazeny geny pro produkci protilátek člověka (Lonberg, 2005). Příkladem monoklonální protilátky získané technologií z transgenní myši (XenoMouse) je panitumumab (anti-EGFR) užívaný pro léčbu kolorektálního karcinomu (Chames et al., 2009). Struktura a vývoj monoklonálních protilátek od myších k čistě lidským je zobrazen na obr. 5.

## Struktura monoklonálních protilátek (MoAb)



Obr. 5: Struktura a vývoj monoklonálních protilátek od myších k čistě lidským. Převzato a upraveno z Dalle et al., 2008.

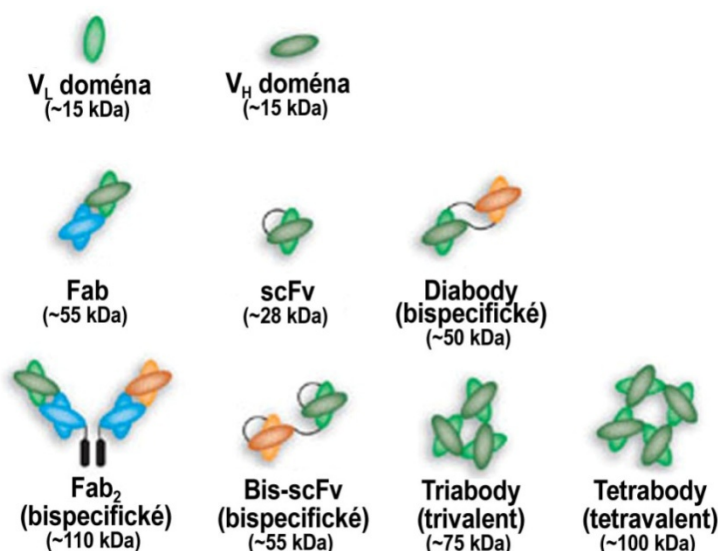
### 3.2.4 Monoklonální protilátky nové generace

#### 3.2.4.1 Fragmenty protilátek

Terapeutické monoklonální protilátky jsou velké monospecifické makromolekuly, jejichž velký rozměr omezuje jejich průnik do nádoru, čímž je limitována jejich terapeutická účinnost. Mají dlouhý poločas života (serum half-life), což omezuje jejich použití v radioimunoterapii nebo v radiodiagnostice. Také jejich výroba je velmi složitá a velmi drahá (Chames et al., 2009; Enever et al., 2009). Z těchto důvodů začal v posledních letech také vývoj a konstrukce derivátů protilátek tzv. **fragmentů protilátek**. Oproti celým imunoglobulinům jsou rychleji odstraněny z krevního oběhu, lépe pronikají do tkání a jejich krátký poločas života umožňuje jejich využití v imunoradioterapii, v radiodiagnostice, nebo při podávání léčiv vázaných na protilátkách (Chang et al., 2002; Colcher et al., 1998). Jelikož neobsahují Fc fragment postrádají efektorové funkce, jako spuštění ADCC nebo CDC (Nieri et al., 2009). Příklady fragmentů protilátek jsou uvedeny na obr. 6.

- **Fab (fragment antigen binding) fragmenty** jsou monovalentní, přibližně třikrát menší než celá protilátka. Jsou složeny z  $V_H+C_{H1}$  a  $V_L+C_L$  domén spojených disulfidovým můstkem na C-terminálním konci konstantních domén ( $C_{H1}$  a  $C_L$ ). Příkladem Fab fragmentu používaného v klinické praxi je např. Lucentis (VEGF-A-binding Fab) užívaný pro léčbu mokré makulární degenerace (Gaudreault et al., 2005).

- **scFv (single chain fragment variable) fragmenty** jsou složeny z těžkého a lehkého řetězce variabilní domény, spojených flexibilním polypeptidovým řetězcem. Spojením dvou scFv fragmentů se stejnou specifitou vznikají *bivalentní monospecifické diabodies* a spojením dvou scFv fragmentů s odlišnou specifitou vznikají *bivalentní bispecifické diabodies (Db)* (Chames et al., 2009, Klener et al., 2010). Díky jejich velmi rychlému vychytávání nádorem, ale i rychlému odstranění z krevního oběhu se diabodies konjugované např. s pozitronovými emitory jako  $^{64}\text{Cu}$  nebo  $^{124}\text{I}$  používají pro velmi rychlou vizualizaci cizích štěpů – xenograftů pozitronovou emisní tomografií (Robinson et al., 2008). Rekombinantním spojením více scFv mohou vznikat i multivalentní nebo multispecifické protilátky tzv. *triabodies*, *tetrabodies*. V současnosti je v klinickém zkoušení u nehodgkinských lymfomů linatumomab, bispecifická scDb anti-CD19/anti-CD3 (Klener et al., 2010).

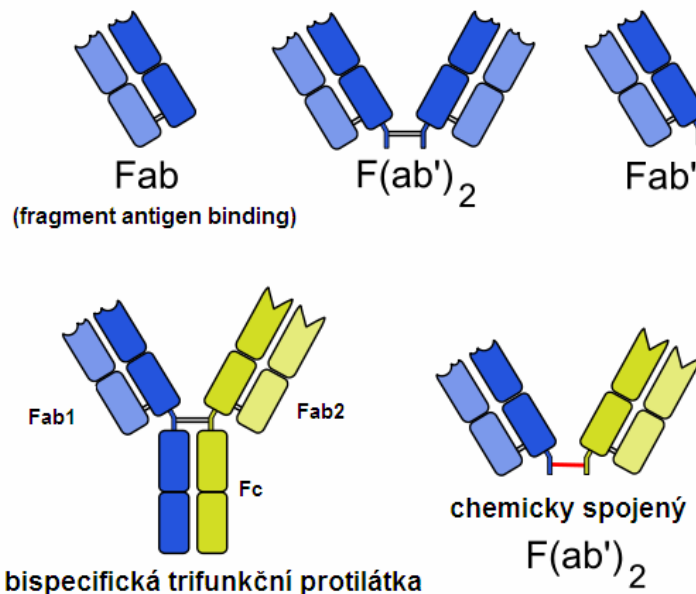


Obr. 6: Příklady a struktura fragmentů protilátek. Převzato a upraveno z Holliger et al., 2005.

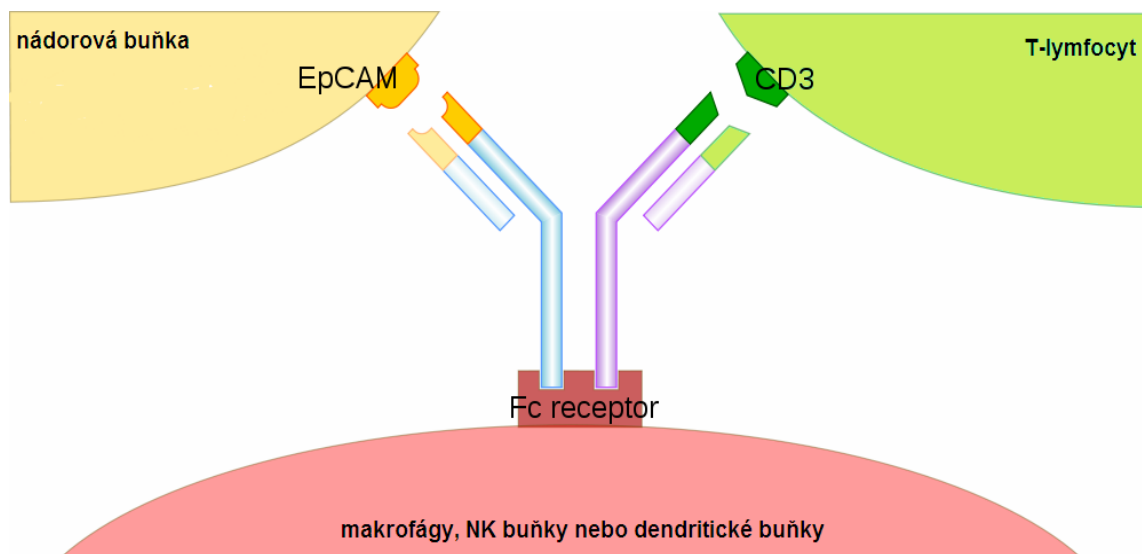


### 3.2.4.2 Bispecifické protilátky

Bispecifické monoklonální protilátky obsahují dva různé Fab fragmenty a jsou schopny vázat dva různé antigeny (obr. 7). Jedna jejich antigenní specifita je namířena proti nádorovému antigenu a druhá proti vhodnému markeru imunokompetentních buněk (např. CD3 na povrchu T-lymfocytů). Mohou být připraveny klasickou hybridomovou technikou, čímž vznikají tzv. **trifunkční protilátky**. Obsahují dva odlišné Fab fragmenty a Fc fragment (Cwierтка et al, 2004; Klener et al., 2010). První schválenou trifunkční monoklonální protilátkou byl v roce 2009 catumaxomab (anti-EPCAM, anti-CD3), užívaný pro léčbu maligních ascitů. Jeden její Fab fragment je schopen vázat EPCAM (epithelial cell adhesion molecule) na povrchu nádorových buněk a druhý Fab fragment váže CD3 na povrchu T-lymfocytů, čímž je přitahuje do místa nádoru. Pomocí Fc fragmentu je navíc schopna aktivovat pomocné efektorové buňky (makrofágy, NK buňky, dendritické buňky) a indukovat ADCC (obr. 8) (Linke et al., 2010).



Obr. 7: Struktura bispecifických monoklonálních protilátek. Zdroj wikipedia ([http://en.wikipedia.org/wiki/Bispecific\\_monoclonal\\_antibody](http://en.wikipedia.org/wiki/Bispecific_monoclonal_antibody))



Obr. 8: Mechanismus účinku trifunkční bispecifické monoklonální protilátky. Zdroj wikipedie ([http://en.wikipedia.org/wiki/Bispecific\\_monoclonal\\_antibody](http://en.wikipedia.org/wiki/Bispecific_monoclonal_antibody))

Dalšími příklady protilátek nové generace jsou např. **imunocytokiny** (fúzní proteiny scFv fragmentů monoklonálních protilátek s cytokiny, např. s IL-2, IL-15, IFN- $\gamma$ ) (Ebbinghaus et al., 2005; Kaspar et al., 2007), **peptibodies** (fúzní proteiny Fc fragmentů IgG s polypeptidy vykazujícími vazebnou afinitu vůči specifickým molekulám, např. ligandům, receptorům) (Klener et al., 2010) a **intrabodies**, tzv. neutralizační intracelulární protilátky namířené proti různým antigenům přítomným např. v cytosolu, v jádře, v endoplazmatickém retikulu, v mitochondriích nebo na plazmatické membráně (Lo et al., 2008).

### 3.2.5 Přehled používaných monoklonálních protilátek v léčbě nádorových onemocnění

#### 3.2.5.1 Nekonjugované monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky mohou být použity buď samostatně nebo konjugovány s radionuklidy, cytostatiky, toxiny či enzymy. Mohou být směřovány proti epitopům konkrétních nádorových antigenů nebo solubilních proteinů.

Mezi jejich nejčastější cílové antigeny patří membránové proteiny (např. CD20, CD33, CD52 aj.), růstové faktory (např. VEGF), receptory (EGFR/ERBB/HER, VEGFR), adhezivní molekuly (např. EPCAM) a další. Účinky nekonjugovaných monoklonálních protilátek závisí na míře jejich kumulace v nádoru a schopnosti navodit některý z biologických účinků, jako např. ADCC, aktivace klasické dráhy komplementu (CDC), indukce apoptózy, indukce tvorby antiidiotypových protilátek (viz kapitola 1.2.1.) (Cwiertka et al., 2004; Klener et al., 2010).

### 3.2.5.1.1 Monoklonální protilátky proti membránovým molekulám leukocytů

Monoklonální protilátky proti membránovým molekulám leukocytů patřily mezi nejdříve používané protilátky v klinické praxi. Používají se zejména k léčbě hematologických malignit. Vazbou protilátky na příslušný antigen na povrchu nádorových resp. leukemických-lymfomových buněk se indukují imunologické protinádorové mechanismy (např. ADCC, aktivace komplementu) (Klener, 2007).

- **Rituximab** (Mabthera), anti-CD20 chimerická IgG1 monoklonální protilátka. Molekula CD20 je exprimována na zralých B-lymfocytech a je přítomna na více než 90 % B buněk NHL (ne-hodgkinských lymfomů B typu) (Dalle et al., 2008). Mechanismus účinku rituximabu zahrnuje ADCC, cytotoxicitu závislou na komplementu (CDC) a indukci apoptózy (Dalle et al., 2008; Harjunpaa et al., 2000). Rituximab byl v roce 1997 první monoklonální protilátkou schválenou FDA k terapii hematologických malignit (B-NHL). Je indikován v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií k léčbě indolentních B-NHL, v kombinaci s chemoterapií u folikulárního lymfomu a u difuzního velkobuněčného lymfomu z B buněk (Klener, 2007). Léčbou chronické lymfatické leukémie (CLL) a malobuněčného B-lymfomu vysokými dávkami rituximabu nebo v kombinaci s chemoterapií u pacientů s relabující CLL bylo dosaženo dobrých výsledků (Wierda et al., 2005; O'Brien et al., 2001; Byrd et al., 2001). Kromě toho má rituximab uplatnění v léčbě Waldenströmovy makroglobulinemie a některých autoimunitních chorob (Klener, 2007).

- **Ofatumumab** (Arzerra), čistě lidská anti-CD20 monoklonální protilátka. Váže se na odlišný epitop než rituximab. Nedávno byl schválen FDA pro terapii pacientů s CLL, kteří neodpovídají na léčbu fludarabinem a alemtuzumabem (Horák, 2010).

- **Alemtuzumab** (Campath), anti-CD52 humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka. CD52 je exprimován na povrchu normálních T a B lymfocytů a na maligních lymfocytech, ale není exprimován na erytrocytech nebo na destičkách. Anti-CD52 protilátka indukuje ADCC, CDC a apoptózu (Rowan et al., 1998; Crowe et al., 1992). Je indikována k léčbě pacientů s B-CLL, pro něž není vhodná chemoterapie fludarabinem. Alemtuzumab je také účinný pro léčbu B-CLL s nejhorší prognózou (formy s delecí 17p-) (Keating et al., 2002; Lundin et al., 2002; Klener et al., 2010).

### 3.3.5.1.2 Monoklonální protilátky blokující navázání ligandu a aktivaci příslušné signální dráhy

Členové rodiny epidermálních receptorů růstových faktorů (EGFR), jako EGFR (znám také jako ErbB-1 nebo HER1), HER2/Neu (ErbB-2), ErbB-3/HER3 a ErbB-4/HER4 hrají významnou roli v homeostáze normálních tkání a fetálního vývoje u různých druhů organismů včetně člověka. Jejich zvýšená exprese je často nalézána u řady karcinomů, proto je jejich ovlivnění žádoucí u mnoha nádorových onemocnění (proto jsou cílem terapie pomocí monoklonálních protilátek) (Adam et al., 2005, Weiner et al., 2010).

- **Cetuximab** (Erbix), chimerická anti-EGFR IgG1 monoklonální protilátka, vázající se specificky na extracelulární doménu EGFR, zabraňuje navázání aktivačních ligandů (působí jako kompetitivní inhibitor EGFR přirozených ligandů: EGF a TGF- $\alpha$ ) a tím inhibuje dimerizaci receptoru a aktivaci EGFR-zprostředkované signalizační kaskády (Sunada et al., 1986; Li et al, 2005).

- **Panitumumab** (Vectibix), čistě lidská anti-EGFR IgG2 monoklonální protilátka, účinkuje podobným mechanismem jako cetuximab, ale nepodporuje

ADCC. Panitumumab a cetuximab jsou užívány k léčbě metastatického kolorektálního karcinomu (Kim et al., 2009).

- **Transtuzumab** (Herceptin), anti-HER-2/neu humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka, používaná pro léčbu invazivní rakoviny prsu, u které je nalezena zvýšená exprese a genová amplifikace HER2/neu (Vogel et al., 2002). Zvýšená exprese HER2/neu se nachází přibližně u 30 % pacientek s rakovinou prsu, byla však také prokázána u karcinomu ovaria, prostaty a gastrointestinálního traktu. Na rozdíl od EGFR nemá HER2/neu známý ligand. Monoklonální protilátky proti tomuto receptoru neblokují navázání ligandu, ale vazbou na něj brání tvorbě homodimerů nebo heterodimerů s ostatními receptory z rodiny EGFR nebo jeho internalizaci. To má za následek blokádu aberantně aktivovaných MAPK a PI3K-AKT kaskád, které u nádorových buněk stimulují proliferaci, invazivitu a inhibují apoptózu (Chen et al., 2003; Klener et al., 2010). Kromě toho transtuzumab také indukuje endocytickou destrukci receptoru a má imunomodulační účinky (stimuluje ADCC) (Hudis, 2007).
- **Pertuzumab** (Omnitarg), další anti-HER-2/neu humanizovaná monoklonální protilátka, se váže na odlišné místo než transtuzumab a inhibuje dimerizaci receptoru (Franklin et al., 2004).

### 3.3.5.1.3 Monoklonální protilátky s antiangiogenním účinkem

V preklinických a klinických zkouškách se ukázaly být velmi přínosné strategie zaměřující se na zásadní události v mikroprostředí nádoru. Např. mnoho solidních nádorů exprimuje vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), který vazbou na svůj receptor VEGFR1 a VEGFR2 na povrchu endotelových cévních buněk stimuluje angiogenezi, jež má zásadní význam pro nádorové bujení. Angiogeneze je proces tvorby nových krevních kapilár, pomocí nichž může nádor stimulovat okolní tkáň k růstu cév, umožňujících jeho samostatný metabolismus (dodávání živin, odstraňování odpadních metabolických produktů) (Weiner et al., 2010; Vegh et al., 2009).

- **Bevacizumab (Avastin)**, anti-VEGFA humanizovaná monoklonální protilátka. Blokuje navázání VEGF na jeho receptory a používá se pro léčbu karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu v kombinaci s cytotoxickou chemoterapií (Ellis et al., 2008).

### 3.3.5.2. Konjugované monoklonální protilátky

V klinické praxi se používají protilátky konjugované s cytostatikem nebo s radionuklidem.

- **Gemtuzumab ozogamicin (GO)** (Mylotarg), anti-CD33 humanizovaná monoklonální protilátka konjugovaná s protinádorovým antibiotikem kalicheamycinem, izolovaným z *Micromonospora calichensis*. CD33 je exprimován na progenitorových buňkách megakaryocytární, myelomonocytární a erytroidní linie. Je také exprimován na leukemických buňkách u většiny pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) a myelodysplastickým syndromem (Bernstein, 2002). Po navázání GO na CD33 se komplex antigen-protilátka internalizuje do leukemické buňky, kde se kalicheamycin proteolyticky uvolní a indukuje apoptózu (Brenstein, 2002; Bernstein, 2000). GO je v USA registrován u pacientů s AML v 1. relapsu. Avšak v EU v září 2007 Výbor pro humánní léčivé přípravky CHMP vydal zamítavé stanovisko k návrhu na registraci GO pro evropský trh z důvodu nedostatku důkazů k prokázání jeho účinnosti u léčby akutní myeloidní leukémie a také pro jeho vedlejší účinky (např. závažné a dlouhotrvající potlačení tvorby krvinek kostní dřeně způsobující nízké hodnoty bílých krvinek a destiček). Výbor CHMP uvedl, že přínosy GO nepřevyšují jeho rizika a proto doporučil registraci Mylotargu zamítnout (European Medicines Agency, 2008; Klener et al., 2010).

- **Ibritumomab tiuxetan** (Zevalin), anti-CD20 myší IgG1 monoklonální protilátka konjugovaná s radionuklidem <sup>90</sup>Y (Yttrium), který je k protilátce vázán pomocí chelatačního činidla tiuxetanu. <sup>90</sup>Y je beta zářič s poločasem rozpadu 64 hodin (Weigert et al., 2006; Wagner et al., 2002; Wiseman et al., 2002). Ibritumomab tiuxetan je indikován k léčbě pacientů s CD20+ folikulárním lymfomem (FL) relabujícím po předchozí léčbě rituximabem a chemoterapií nebo u

pacientů refrakterních, a to i včetně forem transformujících se do difúzního B-velkobuněčného lymfomu (DLBCL) (Wiseman et al., 2002; Witzig et al., 2002; Adam et al., 2005).

### **3.3.5.3. Monoklonální protilátky cílící leukemické kmenové buňky**

I když je všeobecně známo, že příčinou většiny leukémií, lymfomů a myelomů je deregulovaná proliferace leukemických nebo nádorových buněk, bylo v nedávné době prokázáno, že leukemické a nádorové buňky vykazují podobnou hierarchii sebeobnovy a diferenciací jako normální kmenové a progenitorové buňky tkáně včetně tkáně krve (Jordan et al., 2006). Lapidot a spol. (1994), Bonnet a Dick (1997), Bhatia a spol. (1997) a další autoři prokázali, že za přenos akutní myeloidní leukémie do imunodeficientních NOD/SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency) myší, je zodpovědná pouze minoritní populace původních leukemických buněk nemocného tzv. leukemických kmenových buněk (LSC, leukemic stem cells). Tato skutečnost byla později potvrzena i u ostatních maligních nádorů a vznikla tak teorie kmenových buněk nádorů, nazvaná také teorií buněk iniciujících nádory (tumor initiating cells, TIC, cancer stem cells-CSC). Nádorové kmenové buňky mají mitotický potenciál a schopnost asymetrického dělení, jsou schopny diferenciovat (aberrantně), aktivují anti-apoptické dráhy, mají vypuzovací transportérovou aktivitu vůči toxickým látkám (rezistence ke konvenční chemoterapii) a jsou schopny migrovat a tvořit metastázy (ten Cate et al., 2010; Masopust, 2008).

Na leukémie je možno nahlížet jako na normální hematopoetickou tkáň, která vznikla z malého počtu, nebo i jediné leukemické kmenové buňky. Takto vytvořená hematopoetická tkáň prochází deregulovanou nebo nedostatečně regulovanou organogenezí, která si však v mnoha směrech zachovává rysy analogické normálním buňkám (Misaghian et al., 2009). Leukemické kmenové buňky u akutní i chronické myeloidní leukémie vznikají transformační poruchou v normální hematopoetické buňce, případně progenitorové buňce (u AML) (Cozzio et al., 2003). Poruch vedoucích k deregulaci hematopoetických buněk je známo velké množství a stále jsou objevovány další. Jsou to především poruchy exprese genů kódujících transkripční faktory regulující hematopoezu a buněčnou

diferenciaci nebo poruchy v aktivaci různých hematopietických růstových faktorů a cytokinů vyvolávajících signální kaskádu podílející se na regulaci sebeobnovy a diferenciace hematopietických kmenových buněk (dráhy Hedgehog, Wnt/ $\beta$ -katetin, Notch, KIT nebo FLT3) (Bjerkvig et al., 2005; Mimeault et al., 2007; Masopust, 2008). Leukemické kmenové buňky u AML i CML mají podobný imuno-fenotyp jako hematopietické kmenové buňky (HSC, hematopietic stem cells) jsou CD34+ a CD38- nebo i CD34+ a CD38+ (Chan et al., 2008). Bylo publikováno mnoho prací pokoušejících se nalézt povrchové znaky a molekuly specifické pro LSC. Někteří autoři poukazují na expresi molekuly CD96 (Hosen et al., 2007), jiní na deregulovanou expresi receptoru pro GM-CSF nebo IL-3 alfa (CD123) nebo CD44, CD13, CD43, CD47, CD90 a dalších molekul (Krause et al., 2006; Jin et al., 2006; Passegue et al., 2003).

Jedním z možných přístupů k cílené terapii leukémií a nádorů jsou monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám převážně exprimovaným na leukemických a nádorových kmenových buňkách. V současnosti je již několik takových protilátek v preklinických studiích. Jako příklad je možné uvést protilátku 7G3 cílenou proti molekule CD123, která v preklinických studiích inhibuje a specificky eliminuje leukemické kmenové buňky u AML (Lin et al., 2009). V úvahu přichází také protilátka proti CD44. Molekula CD44 patří do rodiny buněčných povrchových receptorů pro kyselinu hyaluronovou a hraje roli při buněčné adhezi. Monoklonální protilátka proti molekule CD44 částečně eliminuje leukemické kmenové buňky u akutní myeloidní leukemie, ale také i chronické myeloidní leukemie. Zabraňuje homingu cirkulujících leukemických kmenových buněk k „útluku“ (niche) kmenových buněk, podporuje terminální diferenciaci AML blastů a indukuje apoptózu (Charrad et al., 1999; Gadhoun et al., 2004). Dosud používaná protilátka proti molekule CD33 značená calicheamicinem (gemtuzumab ozogamicin) je sice účinná v léčbě AML, ale nemusí eliminovat všechny leukemické kmenové buňky, které po léčbě opět mohou nastartovat rozvoj relapsu leukemie. Vývoj monoklonálních protilátek cílících nádorové kmenové buňky se potýká s několika problémy. Jedním z problémů je, že markery CSC jsou společné i s normálními kmenovými buňkami a dalším problémem je velmi malý počet CSC v nádoru. Z tohoto důvodu je identifikace a validace antigenů nádorových kmenových buněk stále ještě na začátku (Yang et al., 2008).



## 4. CD34

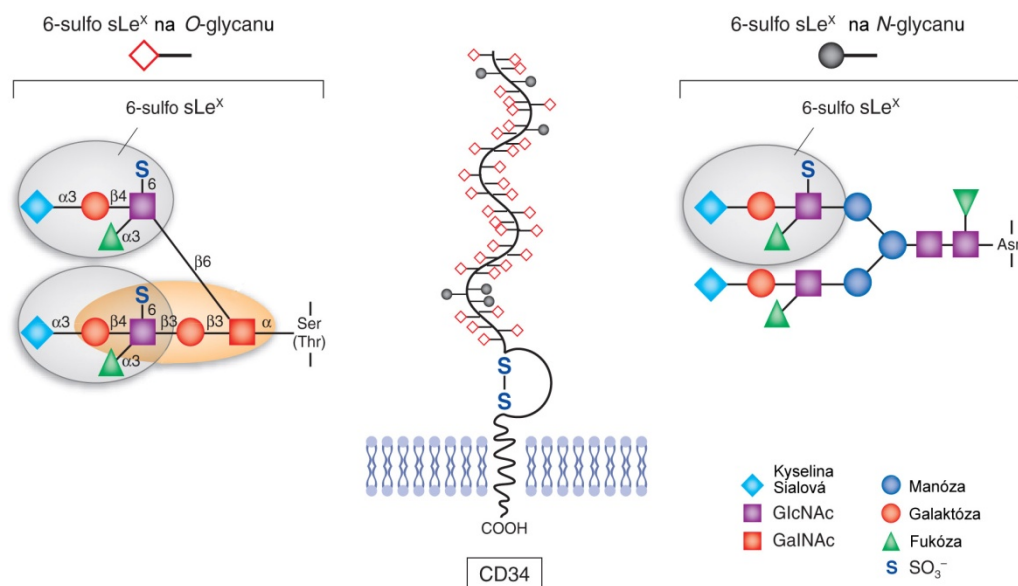
CD34 je vysoce glykosylovaný transmembránový protein typu I o molekulové hmotnosti 105-120 kDa. Velikost této molekuly je závislá na buněčném zdroji, ze kterého je získána (Fina et al., 1990; Sutherland et al., 1988). CD34 náleží do rodiny sialomucinů. Tato monomerní molekula je exprimována především na hematopoetických kmenových (progenitorových) buňkách (HSC, hematopoietic stem cells) a tak slouží jako selektivní marker pro identifikaci a izolaci hematopoetických kmenových buněk (Katz et al., 1985).

### 4.1 STRUKTURA PROTEINU

Molekula CD34 se skládá z velké extracelulární domény (278 aminokyselinových zbytků), transmembránové domény (22 hydrofobních aminokyselin) a cytoplazmatické domény (73 aminokyselin). Velké množství cukrů (glykanů) připojených v extracelulární doméně N- nebo O-vazbou jsou nezbytné pro stabilitu, specifickou antigenitu a interakci CD34 s ligandy (obr. 9). Ačkoli cytoplazmatická část proteinu nemá enzymatickou katalytickou doménu, obsahuje jedno místo pro působení tyrozinové kinázy a dvě potenciální místa pro PKC (proteinkinázu C), konkrétně Thr356, Ser362 a Tyr318. Stechiometrická fosforylace cytoplazmatického konce CD34 proteinkinázou C v těchto místech koreluje se zvýšenou expresí CD34 na povrchu buňky (Civin et al., 1984; Lanza, 2001).

Jak již bylo řečeno, molekula CD34 obsahuje komplex sialovaných glykanů připojených N-vazbou a/nebo O-vazbou. Oba typy glykanů tvoří různé motivy, tzv. antigenní determinanty neboli epitopy, které jsou zodpovědné za specifitu k různým (určitým) protilátkám. Epitopy jsou děleny do tří tříd (epitop I, epitop II, epitop III) dle citlivosti ke štěpícím enzymům, konkrétně k neuraminidáze (sialidáze) pocházející z *Vibrio cholerae* (Watt et al., 1987; Greaves et al., 1992) a O-sialoglykoprotein endopeptidáze (OSGE, „glykopeptidáza“) pocházející z

*Pasterella haemolytica* (Otulakowski et al., 1991). Epitopy I. třídy jsou citlivé jak k neuraminidáze, tak ke „glykopeptidáze“, epitopy II. třídy jsou citlivé pouze ke „glykopeptidáze“ a epitopy III. třídy nejsou citlivé ani k jednomu z těchto enzymů (Sutherland et al., 1992a; Sutherland et al., 1992b).



Obr. 9: Struktura molekuly CD34 náležící do rodiny sialomucinů. Molekulu CD34 „zdobí“ O-glykany a N-glykany obsahující terminální 6-sulfo sialyl Lewis<sup>x</sup> (Alon et al., 2007).

## 4.2 GEN *cd34*

Lidský gen pro CD34 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 (1q32) (Molgaard et al., 1989; Tenen et al., 1990). V této oblasti se nacházejí i geny kódující regulační molekuly, které jsou zahrnuty v hematopoetické signalizaci (např. geny pro adhezní matrix, molekuly komplementové kaskády jako je L-selektin/P-selektin a E-selektin, laminin B2 a genový klastr pro RNA). Kolokalizace genu *cd34* s geny pro adhezní molekuly naznačuje potenciální koordinovanou regulaci exprese.

Velmi zajímavé je zjištění, že lidský i myší gen jsou podobně uspořádány do 8 exonů a jejich cDNA je vysoce homologní kromě N-terminálního konce (Brown

et al., 1991; Satterthwaite et al., 1992). Cytoplazmatické domény jsou identické ve více než 90 % aminokyselinových zbytků, transmembránové a proximální extracelulární domény jsou také velmi podobné (více než 70 %). Terminální doména na N konci je identická jen ve 45 % (Brown et al., 1991; Satterthwaite et al., 1992). Hladiny serinových a treoninových zbytků v této doméně jsou podobně vysoké a konzervované mezi jednotlivými živočišnými druhy. Tato pozorování podporují předpoklad, že cukry připojené O-vazbou a obzvláště zbytky kyseliny sialové mohou být důležité v modulaci funkčních charakteristik různě glykosylovaných forem CD34 antigenu (Greaves et al., 1992; Sutherland et al., 1992a).

#### **4.3 FUNKCE MOLEKULY CD34**

Od objevení antigenu CD34 se tato molekula stala nejvíce rozšířeným markerem lidských hematopoetických kmenových buněk. Navzdory jeho důležitosti, zůstává funkce proteinu CD34 stále nejasná (Krause et al., 1996; Nielsen et al., 2009). Molekula CD34 hraje roli v mezibuněčné adhezi. CD34 exprimovaná na endoteliálních buňkách anglicky nazývaných „high endothelial venules“ (HEV) interaguje s L-selektinem na naivních lymfocytech a tím napomáhá jejich zachytávání a usnadňuje „homing“ (usídlování) lymfocytů do lymfatických uzlin (Baumhueter et al., 1993; Rosen et al., 1997). Rovněž se podílí na zachytávání leukocytů na povrchu endotelií zanícených tkání. Tato nízkoafinitní vazba mezi CD34 a L-selektinem na leukocytech (tzv. rolling, kutálení) zpomalí jejich pohyb a usnadní průnik leukocytů mezi endoteliálními buňkami do tkáně (Butcher et al., 1996; Lasky, 1992). Avšak Nielsen et al. (2009) zjistili, že molekula CD34 má rovněž antiadhezivní vlastnosti. CD34 exprimovaná na apikální straně cévních endoteliálních buněk inhibuje nescifickou adhezi cirkulujících hematopoetických buněk a zabraňuje interakci adhezivních molekul na protilehlých stranách cév, čímž zamezuje jejich kolapsu. Cheng et al. (1996) zjistili, že u myši s nefunkčním proteinem CD34 se neprojeví žádné výrazné změny. Myši byly životaschopné, normálně vyvinuté s typickým hematopoetickým profilem krvetvorby dospělého jedince. Avšak vyskytly se i lehké abnormality

v hematopoéze. Hematopoetický vývoj v embryích těchto myší je zpožděn a to především v erytroidní a myeloidní diferenciaci. Hematopoetické progenitory ze žlutkového vaku, fetálních jater a kostní dřeně dospělého jedince jsou u myší CD34<sup>-/-</sup> menší a působením hematopoetických růstových faktorů nedochází ke zvětšení těchto buněk v tekuté kultuře. Tyto výsledky naznačují, že antigen CD34 se podílí na regulaci proliferace a/nebo udržování progenitorových buněk během embryonální hematopoézy i hematopoézy u dospělého jedince (Cheng et al., 1996). Salati a kol. zjistili pomocí siRNA CD34 významné zvýšení procentuálního zastoupení kolonií granulocytů a megakaryocytů společně s poklesem erytroidních kolonií. Tyto výsledky značně podporují názor, že antigen CD34 by mohl být zahrnut v regulaci diferenciaci hematopoetických kmenových buněk (Salati et al., 2008).

#### **4.4 EXPRESE CD34 NA JINÝCH TKÁNÍCH A NÁDORECH**

Antigen CD34 je exprimován i na endoteliálních buňkách krevních vlásečnic (Watt et al., 1987; Fina et al., 1990) a na buňkách nádorů odvozených od endotelu (Sankley et al., 1990; Schlingemann et al., 1990). Dále je protein CD34 exprimován na fibroblastech, stromálních progenitorech kostní dřeně, některých buňkách nervové tkáně plodu a dospělých, intersticiálních a rozptýlených dermálních dendritických buňkách podobných fibroblastům, areolární tkáni a tukové, somatické a viscerální kolagenní pojivové tkáni (Fina et al., 1990; Lin et al., 1995). CD34 je též exprimována na hematopoetických progenitorech odvozených od žlutkového vaku plodu, embryonálních jater a extrahepatické embryonální tkáně, dále byla exprese CD34 zjištěna u 5 týdnů starého embrya v hematopoietických progenitorech asociovaných s aortou (Tavian et al., 1996; Silverman et al., 1997). U nádorů je exprimován u některých myxoidních, fibrovaskulárních a fibrohistiocytických mezenchymálních nádorů, nádorů tukové tkáně odvozených od primitivních dendritických buněk podobných fibroblastům (Huyhn et al., 1995). U hematologických malignit je CD 34 exprimována u 40 % buněk akutní myeloidní leukémie (AML) a 65 % buněk B prekurzorové akutní lymfocytární leukémie (pre-B ALL), zatímco je pouze u 1-5 % buněk

T- lymfocytární akutní leukémie (T-ALL). CD34 je často exprimován na blastech pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastické krizi, zatímco buňky chronické fáze, jiné chronické leukemie a lymfomy jsou uniformně negativní (Civin et al., 1984; Tindle et al., 1985; Katz et al., 1985; Carlo Stella et al., 1995; Lanza et al., 1994; Watt et al., 1987).

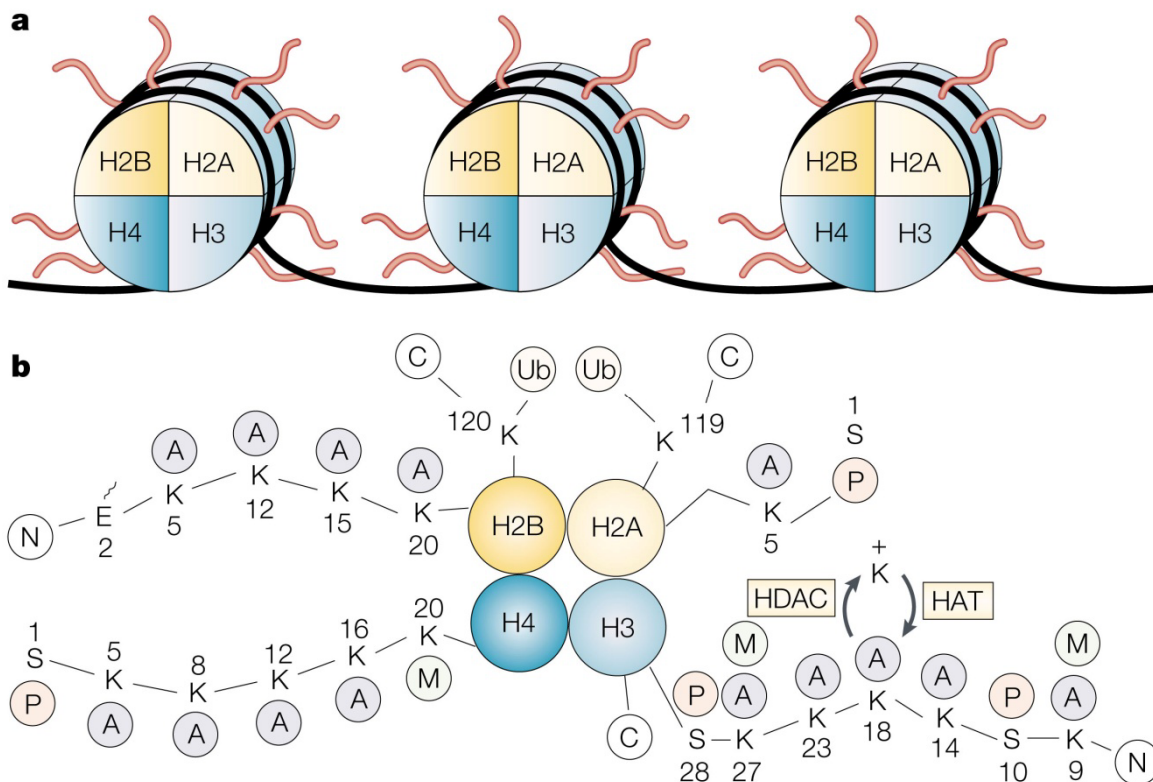
## 5. LÉČBA POMOCÍ INHIBITORŮ DEACETYLÁZ HISTONŮ

Epigenetika se zabývá přenosem a podstatou dědičné informace, která není určena pořadím nukleotidů. Epigenetická informace je přenášena z jedné generace na druhou, jak na úrovni buňky, tak i na úrovni organismu a ovlivňuje frekvenci přepisu genů. Epigenetické děje se podílejí na diferenciaci buněk, morfogenezi, proměnlivosti a adaptabilitě organismu, ale neovlivňují totipotenci buněk. Mezi epigenetické mechanismy patří metylace DNA, modifikace histonů (např. acetylace/deacetylace) a remodelace chromatinu (SWI/SNF [switch/sucrose non-fermentable] chromatin remodelační komplexy) (Yoo et al., 2006; Klener, 2010).

Nádorová onemocnění jsou charakterizována změnou jak genetické, tak i epigenetické struktury genomu. Epigenetická terapie je zaměřena zejména na aktivaci genů, které jsou u nádorů utlumeny. Jedním z mechanismů, který mění regulaci genové exprese je změna v metylaci DNA. Nejprve dochází ke globální hypometylaci, která je charakteristická pro tumorogenezi, a poté k selektivní hypermetylaci promotorových oblastí genů, včetně tumor-supresorových genů (Shen et al., 2002; Agrawal et al., 2007). Dalším mechanismem je deacetylace lyzinových zbytků histonů, která je katalyzována histonovými deacetylázami. Deacetylace histonů způsobí prostorové zhuštění chromatinu přilehlých genů, což brání navázání transkripčních faktorů k DNA vazebným místům a následné transkripci. Výsledkem je utlumení (tzv. utišení) genů (gene silencing) (Ma et al.; 2009). Patologicky snížená exprese řady genů (následkem hypermetylace či deacetylace DNA) je průvodním znakem většiny nádorových onemocnění. DNMTi (inhibitory DNA metyltransferáz) blokují patologicky zvýšenou metylaci DNA, dochází k demetylaci promotorů a k obnovení exprese celé řady patologicky reprimovaných genů (např. tumor supresorových proteinů). Podobně HDACi blokují aberantní deacetylaci histonů některých genů, výsledkem je hyperacetylace a opět možnost aktivní transkripce dříve nepřístupných genů (Klener, 2010).

## 5.1 EPIGENETICKÝ APARÁT BUŇKY

Strukturu chromatinu tvoří genomická DNA, histony a ne-histonové proteiny. DNA eukaryotického jádra je kondenzována do vysoce organizovaného chromatinu. Základní strukturní jednotkou chromatinu je nukleozóm, kulovitá částice o průměru 10nm. Jádro nukleozómu má strukturu oktameru, který obsahuje vždy po dvou kopiích ze čtyř různých typů jaderných bílkovin - histonů (H4, H3, H2a a H2b) a kolem něj je obtočena DNA o délce přibližně 146 párů bazí (vytváří 1,75 levotočivých nadšroubovicových závitů kolem jádra nukleozómu) (obr. 10a). Histon H1 je též vázán na DNA, není však součástí nukleozómu, ale spojuje sousední nukleozómy u sebe v pravidelně se opakujícím uspořádání. Histon H1 podporuje kompaktnost a vyšší organizaci chromatinu. Nukleozómy se dále skládají do vyšších struktur chromatinu, které jsou poměrně dynamické. Procházejí značnými změnami, které vedou k aktivaci nebo represi transkripce. N-terminální konce histonů tvořících histonový oktamer směřují ven z centra oktameru a C-terminální konec směřuje dovnitř oktameru. Vnitřek oktameru je hydrofobní. N-terminální konce histonů (lysin, arginin, serin) jsou zodpovědné za konformační změny DNA (Spotswood et al., 2002; Luger et al., 1997; Jenuwein et al., 2001). Histony jsou posttranslačně modifikovány (obr. 10b), což pozměňuje jejich interakce s DNA a jadernými proteiny. Kombinace modifikací utváří kód, tzv. „histonový kód“ nebo „epigenetický kód“, tj. soubor minimálně osmi možných specifických kovalentních modifikací na histonových koncích, a metylací DNA. Modifikace N-terminálních histonových konců zahrnují metylaci, acetylaci, fosforylaci, ubikvitinylaci, sumoylaci, citrulinaci a ADP ribozylaci (acetylace lysinů, methylace lysinů a argininů, fosforylace serinů, ubiquitinace lysinů) (Gregory et al., 2001; Davie, 1998; Wolffe et al., 1999).



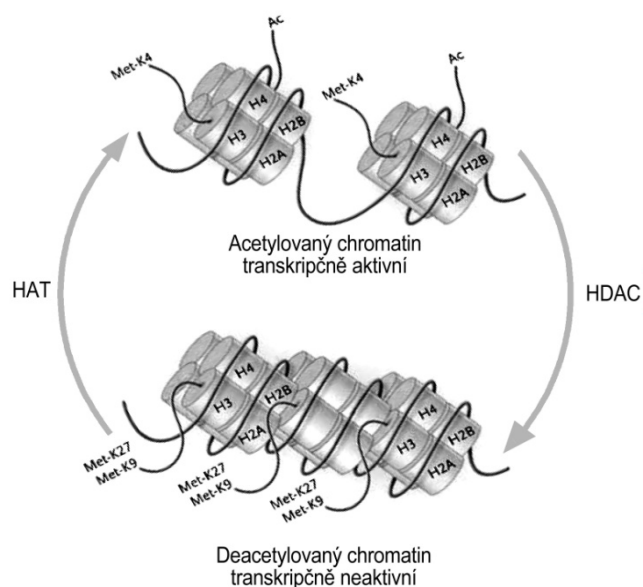
Obr. 10: Uspořádání histonů v nukleozómu. a) Jádru nukleozómu má tvar oktameru, skládá se z párů stejných molekul čtyř různých typů jaderných bílkovin - histonů (H4, H3, H2a a H2b) a kolem něj je obtočena DNA o délce přibližně 146 párů bazí. b) Amino-terminální konce histonů. Lysiny (K) na amino-terminálních koncích histonů H2a, H2b. H3 a H4 jsou potenciálními místy pro acetylaci/deacetylaci pomocí HAT a HDAC. A, acetyl; C, karboxylový konec; E, kyselina glutamová; M, metyl; N, amino-terminální konec; P, fosfát; S, serin; Ub, ubiquitin (převzato z Marks et al., 2001).

## 5.2 DEACETYLÁZY HISTONŮ

Epigenetický aparát řídí strukturu chromatinu bez změny sekvence DNA, a tím ovlivňuje expresi genů, zejména těch, které hrají důležitou roli při transkripci, replikaci a opravě DNA (Bird, 2002; Muthná et al., 2009). Nejvíce studované posttranslační modifikace histonů jsou acetylace a deacetylace lysinových skupin. Acetylace lysinových konců zvláště na histonu H3 a H4 je spojena s rozvolněním struktury chromatinu (dochází k neutralizaci kladného náboje bazických lysinů a tím se snižuje afinita jednotlivých histonů k DNA) a aktivaci transkripce (Cheung et



al., 2000). Naopak, hypoacetylace histonů je spojena s kondenzací chromatinu a represí transkripce. Acetylace histonů je řízena dvěma rodinami enzymů: acetylázami histonů (HAT) a deacetylázami histonů (HDAC). HAT katalyzují přenos acetylové skupiny z acetyl-koenzymu A na lysinové konce histonů a dalších jiných proteinů (obr. 11).



Obr. 11: Regulace struktury chromatinu a transkripce pomocí aktivity deacetyláz histonů (HDAC) a acetyltransferáz histonů (HAT) .

Aktivita HAT je vyvažována aktivitou HDAC, které katalyzují odejmutí acetylové skupiny z lysinových zbytků histonů a jiných nehistonových proteinů (Roth et al., 2001). HAT i HDAC jsou součástí multiproteinových komplexů, které mohou obsahovat více než jednu HAT nebo HDAC. Neváží se přímo na DNA, ale s DNA interagují přes multiproteinové komplexy zahrnující korepresory a koaktivátory (Deckert et al., 2001; Yang et al., 1996). Mezi proteiny, které jsou modulovány aktivitou HDAC nepatří jen histony, ale také i transkripční faktory, transkripční regulátory, signální transdukční mediátory, DNA opravné enzymy, chaperonové proteiny, zánětlivé mediátory, strukturální proteiny, virové proteiny, např. p53, STAT3, Yin Yang transkripční faktor, GATA1, E2F, nukleární faktor- $\kappa$ B, Hsp 90 a jiné (viz tab. 1) (Marks et al., 2004; Drummond et al., 2005; Lin et al., 2006). Tyto substráty jsou přímo nebo nepřímo zahrnuty v mnoha důležitých buněčných dějích zahrnujících kontrolu genové exprese, regulaci proliferace, diferenciaci, migraci a buněčnou smrt (Marks et al., 2009).

BUNĚČNÝ DĚJ	PROTEIN
buněčná pohyblivost	$\alpha$ -Tubulin,
chaperony	HSP90, HSP70
transkripční faktory a koregulátory	p53, p73, GATA-1, 2 a 3, MyoD, E2F1, 2 a 3, PLAG-1 a PLAGL-2, c-myc, BCL-2, Rb, PGC-1 $\alpha$
struktura chromatinu	HMG-A1, B1, B2, N1 a N2, SRY
jaderné receptory (DNA)	androgenní receptor, glukokortikoidní receptor, receptor pro estrogen
signální (signalizační) mediátory	SAT3, Smad7, $\beta$ -Catenin
oprava DNA	Ku70, WRN
jaderný import	Importin- $\alpha$ 7
zánětlivé mediátory	HMGB1
virové proteiny	E1A, L-HDAg, S-HDAg

Tab 1.: Substráty HDAC (Marks et al., 2009).

V současné době je známo 18 deacetyláz histonů, které rozdělujeme do 3 skupin na základě jejich homologie s proteiny kvasinek (Dokmanovic et al., 2005). Skupinu **HDAC I** tvoří především jaderné proteiny homologní s proteinem kvasinek Rpd3 a zahrnují HDAC 1, 2, 3 a 8 o molekulové hmotnosti 22-55 kDa. Skupina **HDAC II** je homologní s HDAC 1 v kvasinkách a zahrnuje HDAC 4, 5, 6, 7, 9 a 10 o molekulové hmotnosti 120-135 kDa. Podle struktury deacetylační domény rozdělujeme tuto skupinu na 2 podtřídy IIa a IIb (podtřída IIa zahrnuje HDAC s jednou hlavní deacetylační doménou, HDAC podtřídy IIb mají dvě domény s různou afinitou k substrátům (Drummond et al., 2005). HDAC skupiny I jsou primárně lokalizovány v jádře, zatímco skupina HDAC II putuje mezi jádrem a

cytoplazmou (Gray et al., 2001). HDAC I a II skupiny obsahují vysoce konzervovanou katalytickou doménu, která obsahuje zinkovou kapsu, důležitou pro návazání některých inhibitorů HDAC (Miller et al., 2003). Skupina **HDAC III** je homologní s proteinem kvasinek SIR2 (silent information regulator), tyto enzymy jsou zcela závislé na  $\text{NAD}^+$  (Drummond et al., 2005). Enzymy skupiny HDAC III jsou rezistentní vůči inhibici trichostatinem A (TSA), suberoylanilidem hydroxamové kyseliny (SAHA) a kyselinou valproovou (VPA), naopak třídy I a II HDAC, obsahující v katalytické doméně  $\text{Zn}^{2+}$ , jsou vůči jmenovaným látkám citlivé. Je to dáno schopností těchto sloučenin zapadnout do enzymové kapsy HDAC třídy I a II a vytvořit komplexy s  $\text{Zn}^{2+}$  ionty (obr. 13) (Achyra et al., 2005). Samostatnou skupinu vytváří **HDAC 11 (skupina IV)**, která má v katalytickém centru znaky jak třídy I, tak třídy II HDAC (Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

Rovnováha mezi acetylací a deacetylací je důležitým faktorem v regulaci genové exprese a je spojena s kontrolou osudu buňky. V normální buňce jsou oba pochody v rovnováze, ale narušení rovnováhy mezi HDAC-HAT může vést k rozvoji rakoviny, způsobené buď zvýšenou aktivitou HDAC nebo sníženou aktivitou HAT. Narušení aktivity HAT nebo HDAC je asociováno s nádorovým vývojem (Timmermann et al., 2001). Mutace ve struktuře HDAC spojené s rakovinou jsou vzácné, zato jsou u nádorů častěji nalézány poruchy v expresi, aktivitě a navázání HDAC a HAT do místa promotorů cílových genů (Mehnert et al., 2007). Abnormální aktivita HDAC může ústít v transkripční represi specifických tumor-supresorových genů, což může přispívat k tvorbě nádorů stejně jako inaktivace HAT. Zvýšení exprese různých typů deacetyláz histonů je charakteristické v odlišných nádorech. Zvýšená exprese HDAC1, HDAC3, HDAC6 a SIRT7 byla nalezena např. u rakoviny prsu, prostaty, štítné žlázy, žaludku (Lafon-Hughes et al., 2008; Bolden et al., 2006). Změna v expresi HDAC byla nalazena také u hematologických malignit (Dokmanovic et al., 2007). Ukázalo se, že inhibice aktivity HDAC má vliv na buněčný cyklus, buněčný růst, dekondenzaci chromatinu, diferenciaci, apoptózu a angiogenezi u různých typů nádorových buněk (Paris et al., 2008). Z tohoto důvodu se v poslední době věnuje velká pozornost inhibitorům HDAC a jejich vývoji pro terapeutické účely.

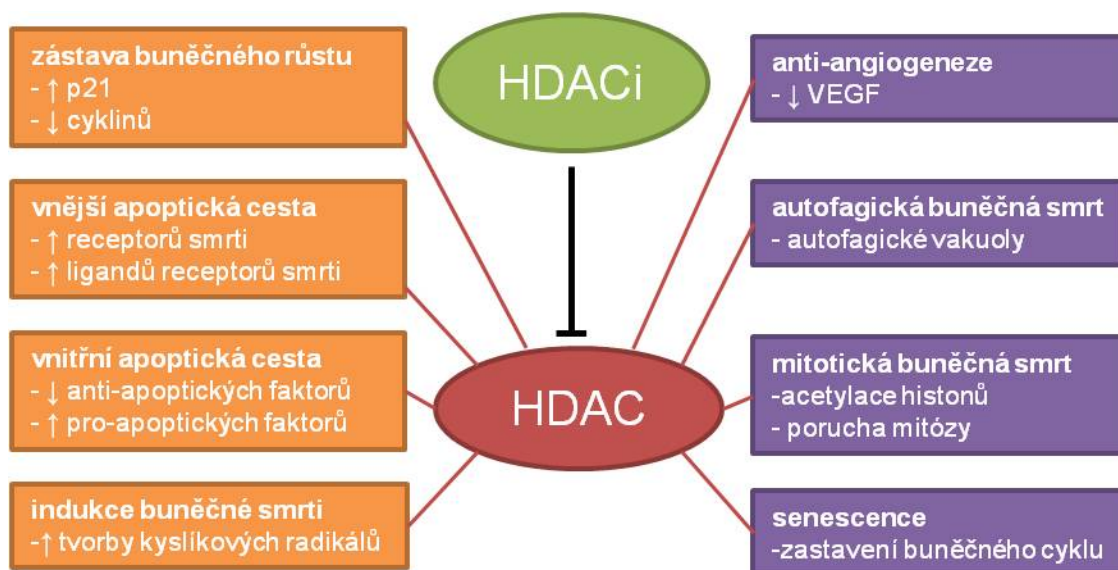
### 5.3 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ (HDACi)

V poslední době bylo vyvinuto množství syntetických i přírodních inhibitorů deacetyláz histonů (HDACi) jako nových protinádorových léčiv (Minucci et al., 2006; Kelly et al., 2005). Inhibitory HDAC tvoří skupinu různorodých sloučenin, které se liší svou afinitou vůči jednotlivým podtypům HDAC. Na základě chemické struktury rozdělujeme inhibitory deacetyláz histonů do 4 základních skupin:

- mastné kyseliny s krátkým řetězcem (butyrát, fenylobutyryát, fenylacetát, kyselina valproová)
- syntetické deriváty benzamidu (MS-275, CI-994, N-acetyldinalin)
- cyklické tetrapeptidy (trapoxin, apicidin),
- deriváty kyseliny hydroxamové (trichostatin A, SAHA, panobinostat, belinostat)

Inhibitory HDAC interagují s katalytickou doménou HDAC a tak blokují rozpoznání a navázání jejich substrátů, čímž způsobují rozvolnění terciární struktury chromatinu a umožňují přístup transkripčních faktorů vyúsťující v obnovu příslušné genové exprese (Finnin et al., 2001). Avšak jejich protinádorová aktivita nevychází pouze ze schopnosti HDACi regulovat acetylaci histonů, ale zahrnuje i jiné funkce včetně acetylace nehistonových proteinů, jako jsou p21, p53, E2F, Rb (retinoblastoma) protein, Fas, FasL a další. Do dnešní doby bylo identifikováno více než 50 nehistonových proteinů, které jsou substráty pro HDAC (Dokmanovic et al., 2005). Studie sledující procento genů, které jsou ovlivněny působením inhibitorů HDAC pomocí expresního profilování genů, se výrazně liší v eukaryotickém organismu. Udávají se hodnoty >5–20 % (Starková et al., 2008; Peart et al., 2005). Mezi hlavní biologické funkce HDACi patří zástava buněčného růstu, indukce diference, podpora apoptózy (Mai et al., 2005) nebo senescence (Xu et al., 2005) v různých typech maligních buněk (obr.12). HDACi mohou reaktivovat tumor-supresorové geny, jejichž aktivita byla v průběhu neoplastických transformací utlumena, např. gen CDKN1A, který kóduje CDK inhibitor p21 (Rosato et al., 2003). HDACi mohou aktivovat jak vnější (přes receptor smrti), tak i vnitřní (mitochondriální) apoptickou signální cestu. V mnoha nádorových buňkách, HDACi indukují aktivaci transkripce receptorů smrti, jako Fas, DR5 a

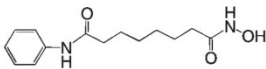
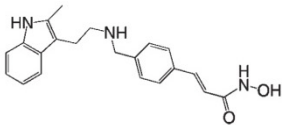
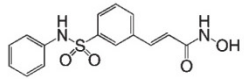
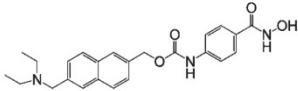
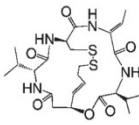
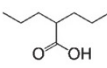
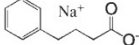
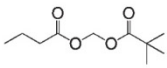
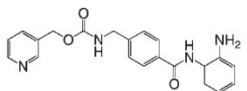
jejich ligandů (TRAIL-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand a Fas ligand) (Insinga et al., 2005). To vede k aktivaci kaspázy 8 a kaspázy 10 a iniciaci vnější apoptotické signalizační cesty. Inhibitory deacetyláz histonů indukují buněčnou smrt i aktivaci vnitřní (mitochondriální) cesty a to inaktivací anti-apoptotických (např. Bcl-2, Bcl-xL) a aktivací proapoptotických (Bik, Bim, Bmf, Noxa) proteinů rodiny Bcl-2 (Xu et al., 2007). Např. panobinostat (LBH 589) snižuje expresi anti-apoptotických proteinů Bcl-2, Bcl-xL a Mcl-1 u nádorových buněčných linií odvozených od rakoviny plic (Edwards et al., 2007). Mnoho studií ukazuje, že téměř všechny HDAC inhibitory zastavují buněčný cyklus v G0/G1 nebo G2/M fázi v závislosti na buněčném typu a dávce HDACi. HDACi dokáží indukovat expresi proteinu p21 i cestou nezávislou na p53, přičemž právě mutace proteinu p53 je jednou z nejběžnějších změn pozorovaných u nádorů. Také byla detekována defosforylace pRb u lidských leukemických linií po působení LAQ 824, HDAC inhibitoru (Rosato et al., 2006). Působení HDACi indukuje hyperacetylaci a destabilizaci chaperonového proteinu Hsp90. V nádorových buňkách Hsp90 asociuje s řadou mutovaných, chimerních nebo nadměrně exprimovaných signálních proteinů (např. mutovaný p53, Bcr-Abl, Raf-1, Akt), čímž napomáhá k udržení jejich stability a funkce (Whitesell et al., 2005). Hyperacetylaci Hsp90 způsobí narušení jeho funkce a cílové proteiny tohoto chaperonu jsou degradovány v proteazomu (Yu et al., 2002). Inhibice HDAC též zvyšuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species). Zvýšení hladiny ROS po léčbě s HDACi bylo detekováno pouze u nádorových buněk, ale ne u buněk normálních (Ungerstedt et al., 2005). Dále, HDACi zvyšují citlivost k chemoterapii nádorů a inhibují angiogenezi (Geng et al., 2006). Všechny tyto účinky vykázané na nádorových buňkách jsou minimální u normálních buněk (Ma et al., 2009).



Obr. 12: Indukce zástavy buněčného růstu nebo smrti pomocí inhibitorů histondeacetyláz. VEGF (vascular endothelial growth factor). Převzato a upraveno podle Marks et al., 2009.

V současnosti je v klinických zkouškách několik HDAC inhibitorů jako potenciálních protinádorových léčiv, protože vykazují inhibiční aktivitu proti nádorům ve velmi dobře tolerovaných dávkách (některé z nich jsou uvedeny v tab. 2) (Sandor et al., 2002; Ma et al., 2009). Některé z nich mají však krátký poločas života a závažné vedlejší toxické efekty *in vivo* (Marks et al., 2001). Transformované buňky jsou citlivější k účinku HDACi než buňky normální. Odpověď nádorových buněk závisí na typu rakoviny, struktuře, koncentraci a také na době působení HDACi (Ma et al., 2009). Protinádorová účinnost HDAC inhibitorů je již velmi dobře prokázána jak *in vitro* (linie nádorových buněk), tak i *in vivo* (zvířecí modely). Prvním z objevených HDACi byl butyrát sodný a první přírodní HDCA inhibitor byl Trichostatin A, identifikovaný v roce 1990 (Yang et al., 2007). V současné době jediným v klinické praxi používaným HDACi je vorinostat (Zolinza) neboli suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA), který americký Úřad pro kontrolu léčiv a potravin (Food and Drug Administration, FDA) schválil v roce 2006 pro terapii kožního T-buněčného lymfomu. Vorinostat je také v I. a II. fázi klinického testování u jiných hematologických malignit a solidních nádorů (Garcia-Manero et al., 2008; Vansteenkiste et al., 2008; Galanis et al., 2009). SAHA náleží do skupiny derivátů kyseliny hydroxamové. Zvyšuje acetylaci histonů H2, H3 a H4 a také zvyšuje expresi proteinů p21 a Bax, současně snižuje expresi STAT6 a

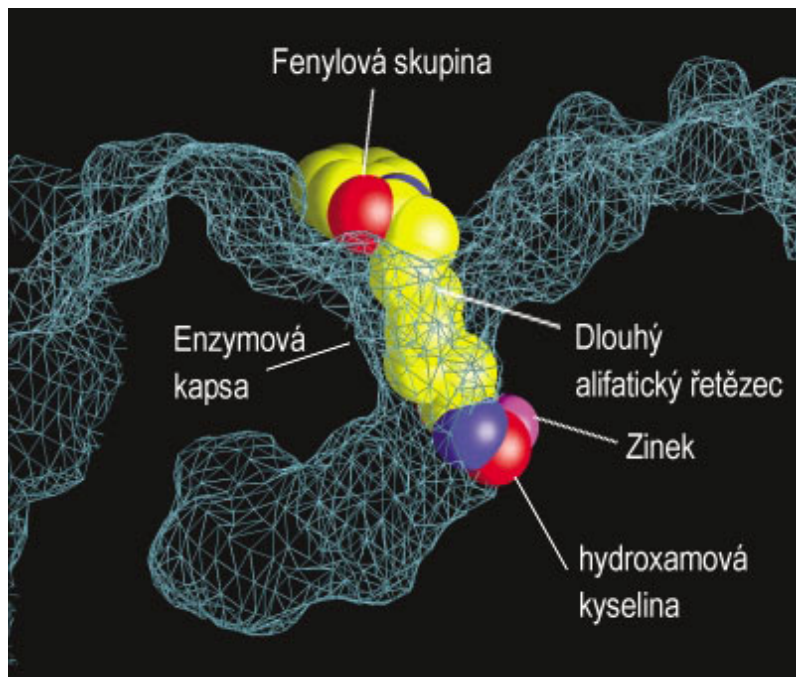
fosforylaci STAT6. Všechny tyto účinky vedou k indukci apoptózy a i jiných forem buněčné smrti (Piekarz et al., 2004). Dalším nově zaváděným HDACi je panobinostat (LBH 589) (Faridak), testuje se u pacientů s refrakterním Hodgkinovým lymfomem a CML (Klener 2010). Kyselina valproová patří do skupiny mastných kyselin s krátkým řetězcem a je již 30 let používána v klinické praxi jako antiepileptikum. Je testována pro možné využití v léčbě akutní promyelocytární leukémie a myelodysplastického syndromu, a to jak samostatně, tak v kombinaci např. s kyselinou retinovou (ATRA) (all-trans-retinoic acid) nebo demetylačními látkami (Karagiannis et al., 2006). Ovlivňuje růst a diferenciaci některých buněčných typů, indukuje diferenciaci buněk neuroblastomu, inhibuje jejich růst (Cinatl et al., 1997) a také indukuje apoptózu u hematologických malignit a solidních nádorů (Olsen et al., 2004; Tang et al., 2004).

Název léčiva	Struktura	Koncentrace *	Klinické zkoušky (k 2009)
Vorinosat (SAHA, Zolinza)		μmol/L	FDA approved – CTCL, PhII-III (p.o.)
Panobinostat (LBH589)		nmol/L	PhI-II (p.o.), PhII (i.v.)
Belinostat (PXD101)		μmol/L	PhII (i.v.), PhI (p.o.)
ITF-2357		nmol/L	PhI-II (p.o.)
Romidepsin (Depsipeptide, FK228)		nmol/L	PhI-II (i.v.)
Valproic acid		mmol/L	PhII-III (p.o.), PhII (top.)
Phenylbutyrate (VP-101, EL-532)		mmol/L	PhII (p.o.)
Pivanex (AN-9)		mmol/L	PhI-II (i.v.)
Entinostat (MS-275, SNDX-275)		μmol/L	PhI-II (p.o.)

Tab. 2: Vybrané inhibitory HDAC v klinických zkouškách, jejich struktura a účinnost *in vitro* (Marks et al., 2009). \* Rozsah koncentrace HDACi inhibující deacetylázy histonů *in vitro*.

Na základě výsledků z preklinických a klinických studií se HDAC inhibitory dají úspěšně kombinovat, jak mezi sebou, tak spolu s konvenčními cytostatiky, anti-angiogenními látkami, radiační terapií, monoklonálními protilátkami nebo hormonální terapií (Bolden et al., 2006; Minucci et al., 2006; Glozak et al., 2007). Inhibitory deacetyláz histonů se zdají být vhodnými kandidáty zejména pro terapii leukemických onemocnění. U těchto onemocnění dochází ke vzniku specifických onkogenních fúzních proteinů, které umožňují vazbu histondeacetylázových komplexů na promotory cílových genů. Tato vazba může ve výsledku způsobit transkripční represi genů esenciálních pro hematopoietickou diferenciaci. Tyto události mohou tvořit hlavní krok v rozvoji leukémií. Např. PML-RARa proteinový produkt translokace t(15;17) u akutní promyelocytární leukémie, stejně jako AML1-ETO a CBF-MYH11 (core binding factor leukemia gene products), tvoří s HDAC korepresorové komplexy a působí jako transkripční represori mechanismem jejich navazání do místa promotorů cílových genů (Lane et al., 2009). Klinické zkoušky s několika HDACi zahrnují pacienty s širokým spektrem hematologických a solidních malignit, zahrnujících chronickou lymfocytární leukémii, Hodgkinův lymfom, myeloproliferativní choroby, B-buněčný lymfom, akutní myeloidní leukémii, mnohočetný myelom, rakovinu krku, mozkové nádory, melanom, rakovinu ledvin, rakovinu vaječnicků, pankreatický adenokarcinom (více na [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) (Marks et al., 2009).





Obr. 13: Schématické znázornění krystalové struktury deacetylázy histonů se suberoylanilidem hydroxamové kyseliny (SAHA), který se váže do zinkové kapsy katalytické domény enzymu (Kelly et al., 2005).

## 5.4 APOPTÓZA, SENESCENCE A JEJICH OVLIVNĚNÍ HDACI

Indukce buněčné smrti nebo zástavy buněčného růstu při léčbě protinádorovými látkami souvisí s odpovědí nádoru („tumor response“). Naproti tomu, neúspěch v protinádorové léčbě je způsoben rezistencí nádorových buněk na tyto látky (Menhert, 2007). Patrně nejčastější a nejlépe prozkoumanou formou buněčné smrti je apoptóza, ovšem řada nedávných studií ukazuje, že u buněk, kde byla blokována apoptóza, je aktivována ne-apoptotická buněčná smrt nebo ireverzibilní zástava buněčného růstu neboli senescence. Ta je označována jako další z možných tumor-supresorových mechanismů (Minucci 2006).

### 5.4.1 Apoptóza

Apoptóza je evolučně velmi starý proces programované buněčné smrti, který vede k řízené eliminaci přestárých, nefunkčních, mutovaných, infikovaných nebo jinak transformovaných buněk. Je to aktivní děj vyžadující energii ve formě ATP. Normální fungování apoptózy je nezbytné pro správný průběh embryogeneze a pro udržení tkáňové homeostázy (Fadeel, 2003). Deregulace apoptózy vede k celé řadě patologických stavů a je průvodním znakem většiny nádorových onemocnění. V buňkách realizujících apoptózu se vyskytují charakteristické morfologické a biochemické změny, rozdílné od změn při jiných typech buněčné smrti. Dochází ke kondenzaci chromatinu, který se shlukuje na periferii jádra. Specifické endonukleázy postupně štěpí DNA nejprve na fragmenty dlouhé 30-50 kbp a posléze na fragmenty tvořené pouze 180-200 bp. Mění se také struktura jádra. Jádro rozpadá do mnoha částí, působením proteolytických enzymů, které štěpí proteiny zajišťující integritu jádra a jaderného obalu. V dalším průběhu apoptózy dochází i ke změnám mitochondrií a narušení cytoskeletu. Buňka se smršťuje a řízeně rozpadá, formují se tzv. apoptotická tělíska, která jsou díky zvýšené expresi fosfatidylserinu na vnějším listu buněčné membrány rozpoznávána a fagocytována makrofágy nebo sousedními buňkami bez

významnějšího rozvoje zánětlivé reakce (Lauber et al., 2001; Vanlangenakker et al., 2008; Savill et al., 2000).

Centrální složkou tohoto procesu je proteolytický systém zahrnující rodinu proteáz, nazývanou kaspázy (cysteinové proteázy), které zahajují a vykonávají apoptózu. Kaspázy jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy a samy mohou být aktivovány proteolytickým štěpením na specifických aspartátových zbytcích. Dělíme je na iniciátorové (např. kaspáza 8, 9, 10) a efektorové (např. kaspáza 3, 6, 7) kaspázy (Lamkanfi et al., 2007, Kang et al., 2002). Iniciátorové kaspázy mohou být aktivovány pomocí dvou odlišných cest - tzv. **vnější** (receptorová) a **vnitřní** (mitochondriální) apoptotická dráha. Iniciátorové kaspázy aktivují efektorové kaspázy, které štěpí intracelulární substráty. Následně dochází k ireverzibilním strukturálním změnám buněčných složek (štěpení aktinu, DNA atd.) vedoucích k řízené buněčné smrti-tvorbě apoptotických tělísek (Burz et al., 2009).

#### **5.4.1.1 Vnější (receptorová) dráha**

Vnější receptorová dráha je iniciována navázáním ligandů na jejich transmembránové receptory, tzv. receptory smrti (death receptors), jako je např. Fas receptor (nazývaný také Apo-1, CD95 receptor). Fas patří do TNF receptorové superrodiny. Dalšími členy jsou TNF receptor 1 (TNF-R1, nazývaný též DR1, p55, p60, nebo CD120a), DR3 (znám jako Apo-3, LARD, TRAMP nebo WSL1), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, také znám jako DR4 nebo Apo-2), TRAIL-R2 (DR5, KILLER, nebo TRICK2), a DR6 (Suliman et al., 2001). Tyto receptory mají extracelulární doménu, která obsahuje 1–5 konzervativních motivů CRDs („cysteine rich domains“, domén bohatých na cystein), intracelulární doménu (DD=death domain) a centrální apoptózové regulátory (Burz et al., 2009). Navázáním specifického ligandu na receptor smrti (FasR/FasL, TNFR1/TNF $\alpha$ , DR-4/TRAIL, DR-5/TRAIL, DR3/Apo-3L/TWEAK), dojde ke konformačním změnám C-konců receptorových molekul, to vede k oligomerizaci a vzniku makromolekulárních komplexů. Na intracelulární části aktivovaných receptorů smrti se váží adaptorové proteiny FADD (Fas-associated death domain) nebo TRADD (TNFR1-associated death domain protein) za vzniku

multiproteinového efektorového komplexu zvaného DISC (death inducing signaling complex). V DISC dochází k aktivaci iniciátorových kaspáz (CASP8 a CASP10), které následně štěpí efektorové kaspázy (CASP3, CASP7) a k zahájení štěpení mnoha intracelulárních proteinů, což vede k biochemickým i morfologickým známkám apoptózy (Burz et al., 2009).

Receptorová dráha může být regulována na více úrovních: všechny tyto regulační mechanismy mohou být narušeny u nádorových buněk.

- zvýšenou expresí tzv. „decoy“ receptorů (DcR3, TRAIL R-3/DcR1 a TRAIL R-4/DcR2), které váží s vysokou afinitou ligandy smrti, ale nejsou schopny přenášet signál na cytoplazmatické adaptorové proteiny. DcR3 je zvýšeně exprimován u různých druhů rakoviny, jako např. plic, žaludku (Wu et al., 2008)
- sníženou expresí receptorů smrti (exprese receptorů smrti se liší mezi různými buňkami). Např. snížená exprese Fas receptoru je nalézána u buněk hepatocelulárního karcinomu (Nagao et al., 1999).
- zvýšenou expresí IAP (inhibitor of apoptosis) molekul, které inhibují aktivitu kaspázy 3 a 7.
- zvýšenou expresí FLIP (FLICE-like inhibitory protein) molekul, které inhibují domény smrti FADD a tak zabraňují aktivaci kaspázy 8. FLIP je exprimován například při aktivaci T-lymfocytů. Přestane-li být exprimován, buňky se stávají náchylnými k apoptóze zprostředkované Fas receptorem (Ashkenazi et al., 1999; Falschlehner et al., 2007)

#### **5.4.1.2 Vnitřní (mitochondriální) dráha**

Vnitřní dráha, bývá zpravidla aktivována signály, jako jsou poškození DNA, poškození mikrotubulů, deprivace růstových faktorů, oxidativní stres, hypoxie nebo chemoterapeutika. Nejčastějším iniciátorem je ovšem poškození DNA a následná aktivace proteinu p53.

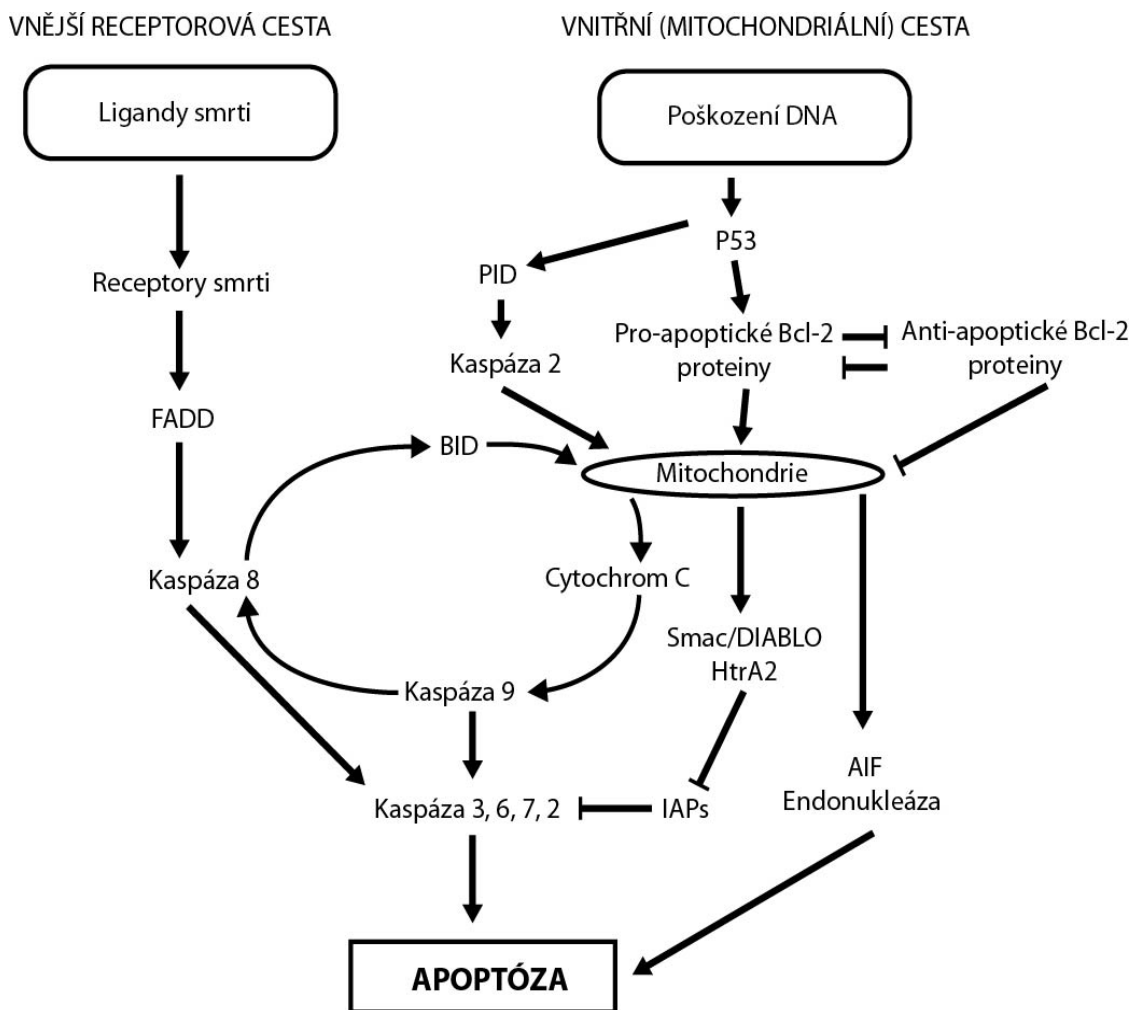
Vnitřní dráha souvisí s mitochondriemi, což jsou vysoce specializované orgány s vysokým obsahem pro-apoptotických molekul (např. cytochrom c, AIF-apoptosis inducing factor, endonukleáza G, Smac/DIABLO). Za normálních okolností jsou tyto pro-apoptotické molekuly „uzavřeny“ v intermembránovém prostoru mitochondrie. Všechny stimuly, jež způsobují změny vnitřní mitochondriální membrány, zapříčiní otevření mitochondriálních pórů (the mitochondrial permeability transition pore), ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu a uvolnění pro-apoptotických proteinů z mezimembránového prostoru do cytosolu. Po uvolnění do cytoplazmy, cytochrom c stimuluje formaci multiproteinového komplexu zvaného apoptosom, který obsahuje Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), dATP, cytochrome c a kaspázu 9. Dochází k autoaktivaci kaspázy 9 a k následné aktivaci efektorových kaspáz (CASP3, CASP7), které štěpí své substráty, což vede k apoptotické smrti, stejně jako při využití vnější apoptotické cesty. Katalytická aktivita cytochromu c je modulována proteiny z rodiny IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), které jsou kontrolovány jinými dvěma proteiny, Smac/Diablo a HtrA2/Omi. Ty potlačují schopnost IAPs inhibovat kaspázy. Proteiny IAP jsou zvýšeně exprimovány u mnoha nádorů (Cory et al., 2002).

Vnitřní dráha je kontrolována interakcemi mezi pro-apoptotickými (Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bik, Bid, Bim, Hrk) a anti-apoptotickými členy (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1) patřící do Bcl-2 proteinové rodiny. Všechny tyto proteiny jsou charakterizovány přítomností konzervovaných sekvencí zvaných Bcl-2 homologní (BH) domény (BH1-BH4), přitom každá z těchto BH domén má odlišnou funkci. Anti-apoptotické proteiny mají čtyři domény, zatímco pro-apoptotické proteiny buď tři nebo pouze jednu. Anti-apoptotické a pro-apoptotické proteiny vzájemně antagonistují své působení tím, že tvoří heterodimery a výsledný efekt je více závislý na rovnováze mezi nimi, než na jejich samotném množství. Změny v jejich expresi jsou nalézány u mnoha nádorů. Např. zvýšená exprese Bcl-2 proteinu je běžně přítomna u hematopoietických malignit, jako akutní lymfoblastická leukémie nebo chronická lymfatická leukémie (Pepper et al., 1996).

- **Pro-apoptické Bcl-2 proteiny:** Bax, Bak, Bok and Bcl-xs, obsahují BH domény 1-3. Bax a Bak mají schopnost vytvářet póry ve vnější mitochondriální membráně, čímž dochází k uvolnění proapoptotických

molekul do cytosolu a spuštění apoptózy. Jejich účinek je inhibován vazbou anti-apoptotických Bcl-2 proteinů.

- **Anti-apoptické Bcl-2 proteiny:** Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-xL, obsahují všechny čtyři BH domény. Blokují proapoptické proteiny Bax a Bak tím, že se na ně váží (Scorrano et al., 2003; Hossini et al., 2006; Klener, 2010).
- **BH3-only Bcl-2 proteiny:** Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Noxa, Puma a Hrk, působí jako senzory stresových signálů z vnějšího prostředí a jsou přímými antagonisty Bcl-2 proteinů. Váží se na anti-apoptické Bcl-2 proteiny, čímž dojde k uvolnění pro-apoptických proteinů Bax a Bak. Jsou považovány za spojovatele signálů smrti a exekuční části apoptotických drah.



Obr. 14: Apoptotické signalizační dráhy. Dvě hlavní dráhy vedoucí k apoptóze buňky: vnější receptorová dráha řízena prostřednictvím receptorů smrti a jejich ligandů a vnitřní mitochondriální dráha kontrolována rodinou Bcl-2 proteinů (Chiantore et al., 2009).

## 5.4.2 Senescence

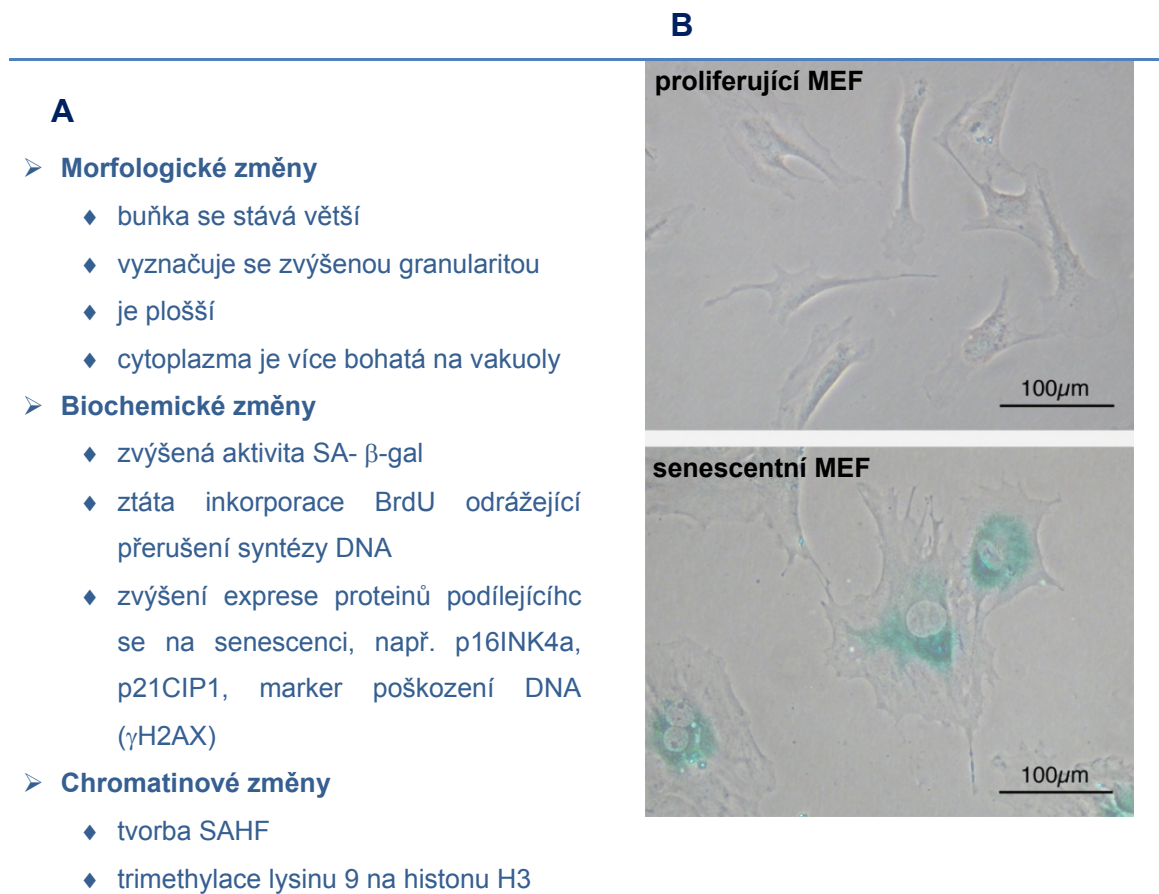
Buněčná senescence byla poprvé popsána před více než 40 lety Hayflickem a Moorheadem (Hayflick et al., 1961). Tito vědci objevili, že normální lidské fibroblasty se po sérii pasáží *in vitro* (asi 50) přestaly dělit a poté vstoupily do ireverzibilní zástavy buněčného cyklu, způsobené vyčerpáním jejich replikativního potenciálu, která je označována jako replikativní senescence (Hayflick et al., 1961; Hayflick, 1965). Avšak senescence může být v buňkách spuštěna také za jiných podmínek, než je kritické zkrácení telomer. Jedná se o nejrůznější druhy stresů a změn ve struktuře DNA (viz str. 58-61).

Hlavním znakem buněčné senescence je trvalá zástava proliferace-neschopnost senescentní buňky vstupovat do buněčného cyklu (Di Leonardo et al., 1994; Herbig et al., 2004; Ogryzko et al., 1996). Senescentní buňky se vyznačují řadou morfologických změn, které můžeme pozorovat světelným mikroskopem. Senescentní buňka je oproti normální proliferující buňce větší, má větší jádro, je plošší a její cytoplazma obsahuje více vakuol (obr. 15). Senescentní buňky nejsou schopny replikovat DNA navzdory adekvátním růstovým podmínkám, to je způsobeno expresí dominantních buněčných inhibitorů a tvorbou tzv. SAHF (senescence-associated heterochromatin foci)- kondenzované oblasti heterchromatinu, které přibývají během senescence (Campisi et al., 2007). Na rozdíl od buněk v klidové (G0) fázi je senescentní zástava buněčného růstu trvalá, jelikož senescentní buňky nelze stimulovat k další proliferaci žádnými známými fyziologickými stimuly (Campisi et al., 2007). K zástavě buněčného cyklu dochází zejména v G1 fázi, ale také i v G2/M fázi (Stein et al., 1995; Campisi et al., 2007). Buňky též často bývají rezistentní k apoptóze (Hampel et al., 2005).

Senescentní buňky mají odlišnou expresi genů, včetně změn v genové expresi inhibitorů nebo aktivátorů buněčného cyklu (Yoon et al., 2004). Mezi inhibitory buněčného cyklu často exprimovanými senescentními buňkami patří inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi) **p21** (také nazýván CDKN1a,

p21CIP1, Waf1 nebo SDI1) a **p16** (také nazýván CDKN2a nebo p16INK4a) (Campisi, 2001; Braig et al., 2006). Tyto CDKi jsou součástí tumor-supresorových cest, které jsou řízeny proteinem p53 a retinoblastomovým proteinem (pRB). p53 a pRB jsou transkripčními regulátory a cesty, které tyto proteiny řídí, jsou často narušeny u rakoviny (Sherr et al., 2002). p21CIP1 a p16<sup>INK4a</sup> udržují pRB v jeho hypofosforylované formě. Hypofosforylovaný pRB dále udržuje inaktivní transkripční faktor E2F, který je důležitý pro aktivaci exprese genů řídících postup skrze buněčný cyklus. V senescentních buňkách dochází také ke změnám ve struktuře heterochromatinu. Tvoří se tzv. SAHF, jejichž tvorbu iniciuje aktivní nefosforylovaná forma pRb (Collado et al., 2006, Schulz et al., 2005). Chromatin v těchto doménách je kompaktnější než chromatin v normálních interfázních rostoucích buňkách. SAHF obsahují několik běžných markerů typických pro heterochromatin: hypoacetylované histony, metylovaný lysin na histonu H3 (H3K9Me) a navázané HP1 proteiny (heterochromatin protein 1), avšak neobsahují jiné znaky kondenzovaného chromatinu nalézané v mitotických buňkách. Jejich dalším znakem je úbytek spojovacího histonu H1 a zvýšené množství macroH2A (transkripčně represivní varianta H2A) a HMGA proteinů. V SAHF jsou zahrnuty geny podporující proliferaci (proliferation-promotion genes), např. cyklin A, cyklin E, E2F, čímž dochází k jejich „umlčení“ a zastavení proliferace. Jakmile dojde k vytvoření SAHF, není už potřeba dalšího poškození DNA nebo inhibitorů buněčného cyklu k nastolení senescentního buněčného stavu (Bakkenist, et al., 2004). V senescentních buňkách je také potlačena exprese genů kódující proteiny, které stimulují nebo usnadňují progresi buněčným cyklem, např. replikačně-dependentní histony, c-FOS, cyklin A, cyklin B, a PCNA (proliferační buněčný nukleární antigen) (Narita et al., 2003). Ne všechny změny v genové expresi v senescentních buňkách souvisí se zástavou buněčného cyklu, jde např. o zvýšení exprese různých cytokinů spojených se zánětlivou odpovědí (Yoon et al., 2004). Dalším neméně směrodatným biomarkerem senescentních buněk je vysoká aktivita lyzozomální  $\beta$ -galaktozidázy (SA- $\beta$ -gal, senescence-associated  $\beta$ -galaktosidase), která odráží zvýšenou biosyntézu lyzozomů (Campisi, 2005; Goldstein, 1990; Dimri et al., 1995).





Obr. 15: Znaky buněčné senescence. Přehled morfologických změn a typických biochemických markerů senescentních buněk (A). Ukázka proliferujících MEF buněk (primární myší embryonální fibroblasty) a MEF buněk, u kterých byla indukována replikativní senescence. Senescentní MEF jsou oproti proliferujícím MEF větší, zpolštělé a vykazují zvýšenou aktivitu SA-  $\beta$ -gal (modré zbarvení), marker senescence. Převzato a upraveno z Schmitt, 2007 (A) a zdroj wikipedia: ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:SABG\\_MEFs.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:SABG_MEFs.jpg)) (B).

Buněčná senescence hraje důležitou roli v nádorové supresi. Senescentní buňky jsou často detekovány v tkáních premaligních lézí, ale už ne v maligních lézích. Zvýšená exprese inhibitorů CDK a zvýšená aktivita lyzozomální  $\beta$ -galaktozidázy (SA-  $\beta$ -gal) byla objevena u adenomu plic, ale už ne u adenokarcinomu plic (Collado et al., 2005). Senescentní buňky byly též detekovány u prostatické intraepiteliální neoplazie a benigní prostatické

hyperplazie (Choi et al, 2000; Majumder et al., 2008). Z těchto dat vyplývá, že by senescence mohla sloužit jako endogenní bariéra před maligní transformací (Ewald et al., 2010). Senescentní buňky jsou také nalézány u starších tkání, kde jejich počet vzrůstá se stárnutím organismu. To vede ke zhoršení regenerativního potenciálu a funkce tkání (Campisi, 2005; Herbig et al., 2006). Senescence tedy na jednu stranu představuje protinádorový mechanismus chránící organismus před rakovinou, ale na druhou stranu přispívá i ke stárnutí organismu (antagonistická pleiotropie) (Saretzki, 2010).

#### **5.4.2.1 Replikativní senescence-závislá na telomerách**

Replikativní senescence je přirozený stav všech buněk, které vyčerpaly svůj proliferační potenciál. U naprosté většiny lidských somatických buněk je asociovaná s erozí telomer během buněčného dělení (Shay et al., 2005). Telomery jsou specializované nukleo-proteinové struktury na koncích lineárních chromozomů. Jsou tvořeny tandemovými repeticemi DNA, u obratlovců konzervovanými hexametrickými sekvencemi TTAGGG, na jejichž konce se vážou specifické proteiny a vytváří lasovitou strukturu nazývanou T-smyčka (T-loop) (De Lange, 2005). Tyto proteiny slouží k ochraně a regulaci telomer a dohromady tvoří ochrannou „čepičku“ na koncích chromozomů. Proto je jejich hlavní funkcí ochrana a stabilizace chromozomových konců, jež zamezuje nestabilitě chromozomů a aktivaci odpovědi buněk na poškození DNA (DNA-damage response, DDR) (Itahana et al., 2007). Standardní DNA polymerázy nemohou kompletně doreplikovat DNA do konce telomer, tento fenomén je anglicky nazván *end-replication problem*, a tak s rostoucím stářím buňky se telomery postupně zkracují. Při každém dělení ztratí buňka 50-200 párů bazí telomerické DNA (Harley et al., 1990). Pokud jsou telomery zkráceny až do určité tzv. kritické délky (u lidských buněk je to v rozsahu 10-15 kb pro zárodečné linie nebo 4-6 kb u ostatních typů buněk), buňka zastaví nevratně svůj růst (Hemann et al., 2001; Martens et al., 2000). Telomerické sekvence prodlužuje enzym telomeráza (reverzní transkriptáza) skládající se z templátové RNA komponenty zvané TERC (telomerase RNA component) a katalytické podjednotky TERT (telomerase reverse transcriptase). Enzym je zodpovědný za *de novo* syntézu telomerických opakujících se jednotek udržujících délku telomer (Greider et al., 1985). Avšak

s výjimkou buněk zárodečných linií, kmenových, progenitorových a rakovinných buněk, většina lidských somatických buněk telomerázu neprodukuje vůbec nebo ji produkuje jen v nepatném množství (Masutomi et al., 2003). Progresivní zkrácení telomer na koncích chromozomů je buňkou vnímáno jako DNA zlomy a je aktivována DDR (ATM/ATR-p53 cesta) vedoucí ke spuštění senescence. Biologické změny, které nastávají v kultivovaných lidských buňkách, během replikativní senescence korespondují se změnami spojenými se stárnutím celého organismu. To nasvědčuje poznatku, že replikativní senescence u buněk v kultuře rekapituluje proces stárnutí u lidí *in vivo* (Campisi, 2005).

#### **5.4.2.2 Senescence nezávislá na telomerách**

Buněčná senescence může být indukovaná širokou škálou různých stresových faktorů, zahrnujících UV záření, oxidační stres,  $\gamma$ -záření, zvýšenou expresi onkogenů, demetylaci DNA a některá chemoterapeutika (Shay et al., 2004; Wright et al., 2002). V těchto případech, kdy je senescence indukována vnějšími stresovými podněty bez měřitelného zkrácení délky telomer, mluvíme o tzv. stresem-indukované předčasné senescenci (SIPS) (Chiantore et al., 2009). SIPS můžeme rozdělit na: senescenci vyvolanou DNA poškozením, senescenci indukovanou onkogeny, senescenci způsobenou chromatinovými změnami či senescenci indukovanou stresem a jinými induktory.

##### **5.4.2.2.1 Senescence vyvolaná poškozením DNA**

Závažné poškození DNA, které nastalo kdekoliv na genomu-zejména poškození, kdy se utvořily dvouřetězcové DNA zlomy, indukuje u mnoha buněčných typů senescenci (Parrinello et al., 2003). Jak senescence vyvolaná poškozením DNA, tak i replikativní senescence jsou silně závislé na p53, a jsou obvykle doprovázeny zvýšenou expresí p21 (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004). Avšak u mnoha buněk DDR a dysfunkční telomery také indukují expresi p16, i když se zpožděnou kinetikou. p16 zde slouží jako druhá ochranná bariéra, aby buňka s poškozenou DNA či dysfunkčními telomery nepokračovala dále v růstu (Jacobs et al., 2004).

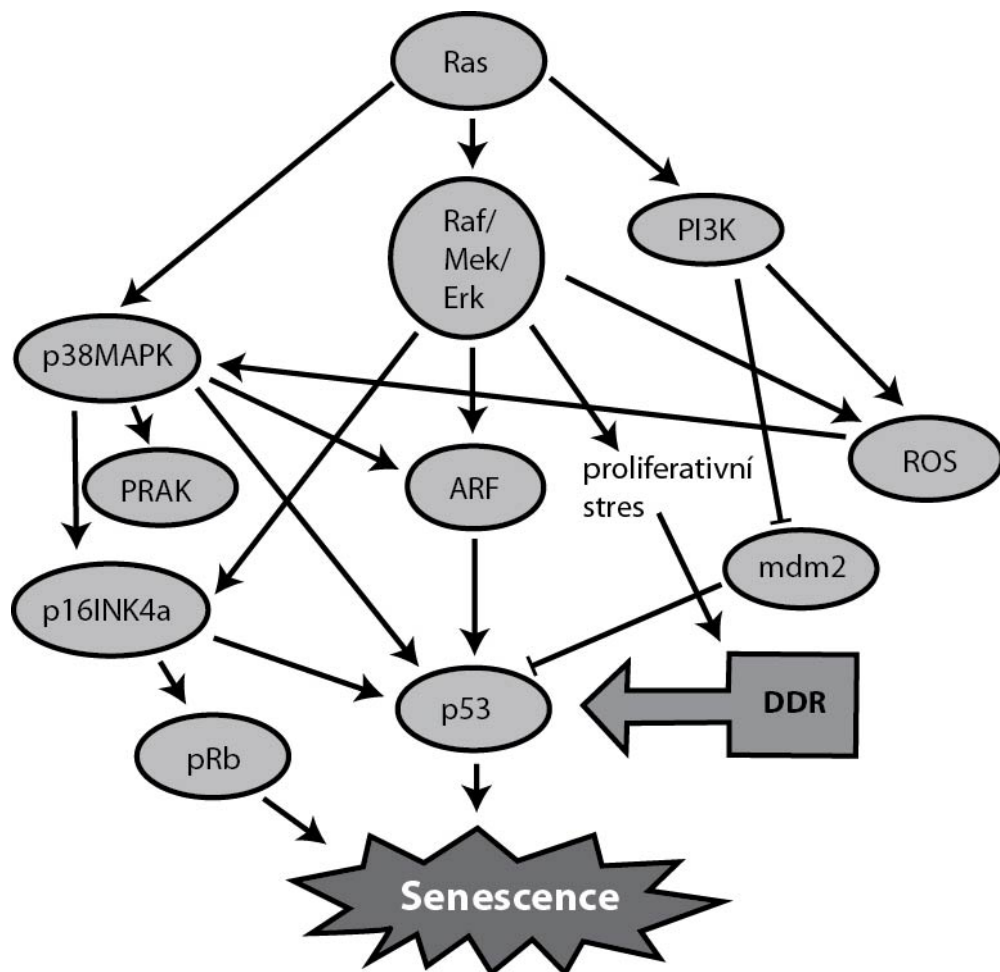
#### 5.4.2.2 Senescence indukovaná změnou na chromatinu

Struktura chromatinu převážně udává, jaké geny mají být v buňce reprimovány (heterochromatin) a jaké exprimovány (euchromatin) a závisí hlavně na modifikaci histonů (např. acetylaci, metylaci). Umělá inhibice deacetyláz histonů, která podporuje formaci euchromatinu, indukuje senescenci (Ogryzko et al., 1996; Munro et al., 2004). Např. u lidských fibroblastů inhibitory deacetyláz histonů (HDCAi) přímo indukují expresi p21CIP a p16<sup>INK4a</sup>, které brání fosforylaci a inaktivaci pRB, což vede k zástavě buněčného cyklu (Munro et al., 2004). Avšak zjištění, že HDCAi spouští senescenci, je v rozporu s rolí heterochromatinu a tvorbou SAHF při senescenční zástavě růstu (Narita et al., 2003). Senescence je tedy spouštěna jak rozpadem, tak i formací heterochromatinu. Pravděpodobně je to způsobeno značnými, ale neúplnými změnami v organizaci chromatinu, kde může dojít ke změně v expresi rozdílných genů a odpověď může být tedy buněčně specifická (Minucci et al., 2006).

#### 5.4.2.3 Senescence indukovaná onkogeny (OIS)

Onkogeny jsou mutantní varianty normálních genů (protoonkogenů) a jsou schopny transformovat buňky na neoplastické příslušnými mutacemi. Normální buňky odpovídají na působení onkogenů spuštěním senescence. Tento fenomén byl poprvé objeven, když onkogenní forma RAS (cytoplasmatický transduktor mitogenních signálů) byla exprimována u normálních lidských fibroblastů (Serrano et al., 1997). Indukce senescence následuje po aktivaci a/nebo zvýšené expresi několika onkogenů zahrnujících ras, komponenty ras signalizační cesty, E2F, myc a cyclin E. Toto bylo potvrzeno v *in vitro* a *in vivo* myších modelech a lidské kůži (Di Micco et al., 2007). Společným rysem zvýšené exprese onkogenů je počáteční „exploze“ buněčné hyperproliferační, která způsobuje změny v replikaci DNA (masivní zvýšení počtu replikačních počátků, akumulace jednořetězců DNA) a spouští aktivaci DDR a následně senescenční program (Di Micco et al., 2006). Onkogenní forma Ras může též aktivovat Raf/Mek/Erk dráhu, PIK3 (fosfatidylinositol-3 kináza) dráhu a p38MAPK, což vede k aktivaci p16INK4a/pRB a p53 dráhy a indukci senescence (obr. 16) (Bracken et al., 2007; Saab, 2010). Několik studií uvádí, že OIS nastává během počátečních stádií nádorového vývoje jak u myších modelů, tak i u lidí (Michaloglou et al., 2005; Braig et al., 2005; Chen

et al., 2005). OIS inhibuje onkogenní transformaci a je považována za tumor-supresorovou ochrannou odpověď proti onkogenní aktivaci (Lin et al., 1998), poskytující počáteční bariéru před tumorigenesí (Michaloglou et al., 2005; Sun et al., 2007).

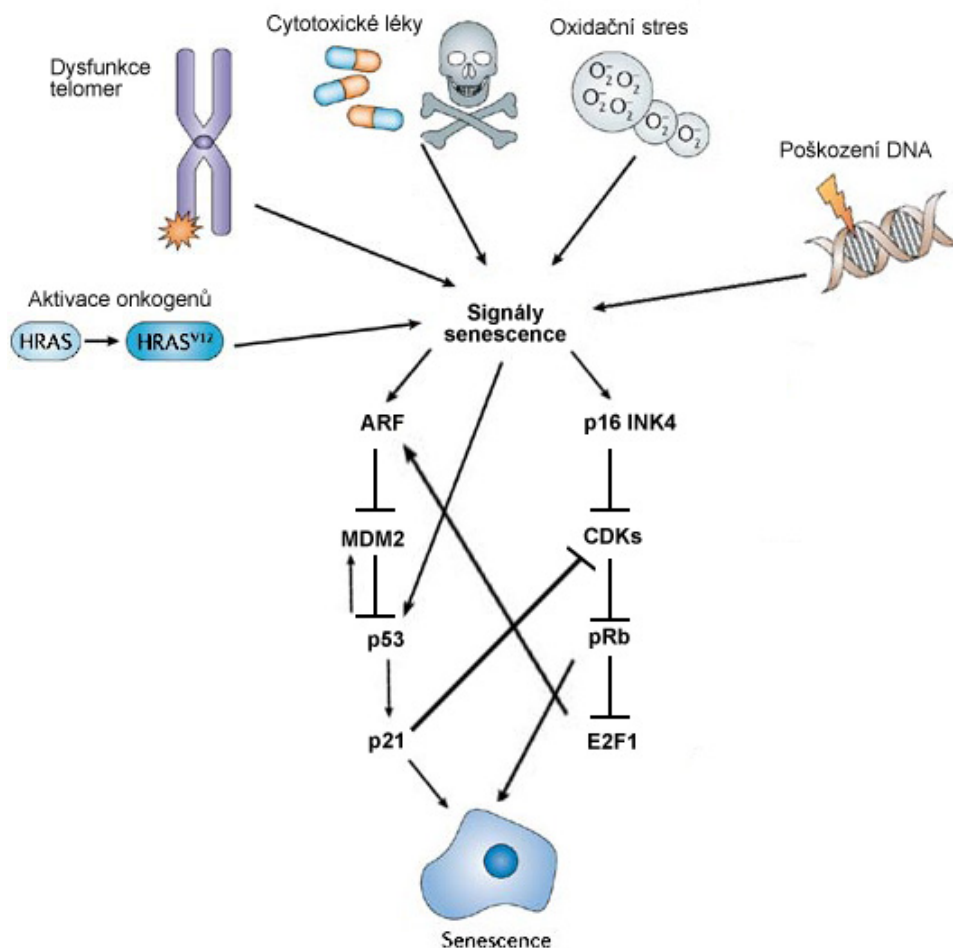


Obr. 16: Ras-indukovaná senescence. PRAK (p38-regulated/activated protein kinase), DDR (odpověď na poškození DNA), ROS (reaktivní kyslíkové radikály) (Saab, 2010).

#### 5.4.2.2.4 Stres a jiné induktory senescence

Stres a další jiné faktory (např. tvorba kyslíkových radikálů) mohou také za určitých podmínek v buňce navodit senescenční stav (Campisi et al., 2007).

#### 5.4.2.3 Senescenční signální dráhy



Obr. 17: Různé formy stresu nebo poškození indukující senescenci prostřednictvím signálních drah nádorových supresorů p53 a Rb. Převzato a upraveno z Vergel et al., 2010 a Collado et al., 2006.

#### 5.4.2.3.1 p53 signální dráha

p53 je velmi důležitým mediátorem odpovědi buňky na poškození DNA. Bývá také označován jako „strážce genomu“, jelikož na poškození DNA buňky reaguje aktivací exprese proteinů opravujících poškozenou DNA a pozdržením buněčného cyklu v G1 kontrolním bodě, dokud není DNA opravena. Anebo v případě, že jde o rozsáhlé poškození DNA a reparační mechanismy jsou neúspěšné, aktivuje ireverzibilní zástavu buněčného cyklu-senescenci nebo programovanou buněčnou smrt-apoptózu (Lowe et al., 2004; Vousden et al., 2009). Je kódovaný genem TP53 nacházejícím se u lidí na chromozomu 17.

Mechanismus aktivace p53 v senescentních buňkách není prozatím zcela objasněn. Funguje však na principu rozpoznání poškozené DNA v G1-kontrolním bodě nebo jako reakce na jiný stres, kde se hladina p53 radikálně zvedne a p53 se v buňkách akumuluje. Jednou z cest aktivace je zvýšení exprese ARF (p14ARF u lidí, P19ARF u myší), což je nádorový supresorový protein kódovaný INK4a-ARF lokusem. Promotor ARF je v nesenescentních buňkách reprimován TBX2 transkripčním faktorem. Aktivita TBX2 klesá vlivem poškození DNA či nadprodukcí E2F a tím dochází ke zvýšení exprese ARF. ARF stimuluje aktivitu p53 inhibicí HDM2 (MDM2 u myší), což je E3 ubiquitin-protein ligáza, která váže p53 a zprostředkovává jeho proteolytickou degradaci (Gil et al., 2006; Haupt, 2003). Dalším důležitým aktivátorem p53 je zvýšení exprese promyelocytárního leukemického proteinu (PML) jako odpověď na onkogenní RAS. PML interaguje s dvěma acetyltransferázami-CBP (CREB binding protein) a p300 (E1A binding protein p300) a acetylací stabilizují p53, jenž je tak ochráněn proti degradaci (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000).

Takto aktivovaný protein p53 spouští expresi genu pro protein p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. p21CIP1 (Cip1= cyklin-dependent kinase inhibitor protein 1) je inhibitorem cyklin-dependentních kináz a přímo inhibuje aktivitu cyclin E/CDK2 a cyclin D/CDK4 komplexů. p21CIP1 působí jako regulátor průběhu buněčného cyklu do S fáze. p21CIP1 se váže na komplex cyklin E/CDK2, mění tak jeho konformaci, což se ve výsledku projeví inhibicí aktivity tohoto komplexu a dojde k aktivaci pRB tumor supresorové cesty (Gartel et al., 2005).

#### 5.4.2.3.2 p16/pRB signální dráha

U vyšších eukaryot, tumor-supresorové proteiny pRb a p53 jsou rozhodujícími „strážci“ buněčné senescence (Shay et al., 1991). Aktivita pRb a p53 je přísně regulována různými posttranskripčními modifikacemi, jako je acetylace, fosforylace, ubiquitinace (Classon et al., 2002). Cyklin-dependentní kinázy (CDK) CDK2, CDK4 a CDK6 hrají důležitou roli ve fosforylaci pRb. Různé růstové faktory mají schopnost inaktivovat pRb tím, že aktivují signální dráhy, které vedou k jeho hyperfosforylaci a umožní tak buňkám zahájit replikaci DNA (S fázi) a přestup do G2 a M fáze (Trimarchi et al., 2002). Deregulace aktivity CDK4 a CDK6, je často nalézána u různých nádorových buněk, což svědčí o jejich důležitosti při kontrole buněčného cyklu (Ortega et al., 2002). Přechody mezi hyperfosforylovanou a hypofosforylovanou formou proteinu Rb ovlivňují CDK a jejich inhibitory, mezi nimi p16<sup>INK4a</sup> (cyklin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A; jehož gen leží na lokusu INK4 chromozomu 9), který inhibuje aktivitu komplexů cyklin D/CDK4/6. Normálně není exprimován v dospělých tkáních (Lowe et al., 2003), avšak různé stresové stimuly jako poškození DNA UV zářením (Pavey et al., 1999), kyslíkovými radikály (Ito et al., 2006), ionizujícím zářením (Meng et al., 2003), chemoterapeutiky (Robles et al., 1998), dysfunkcí telomer (Jacobs et al., 2004) nebo zvýšenou expresí RAS, MAP kináz nebo myc onkogenu zvyšují expresi p16<sup>INK4a</sup> (Serrano et al., 1997). Exprese p16<sup>INK4a</sup> je kontrolována transkripčním faktorem Ets1 (Avian erythroblastosis virus E26 (v-ets) oncogene homolog 1) jehož aktivita je negativně regulována Id1 proteinem (inhibitor of DNA binding 1) (Ohtani et al., 2001). V senescentních buňkách, však dochází k poklesu Id1, čímž se zvýší aktivita Ets1 a p16<sup>INK4a</sup> začne být ve větší míře exprimován. p16<sup>INK4a</sup> se váže na cyklin D/CDK4 a cyklinD/CDK6 komplex, inhibuje je a tím zamezuje fosforylaci Rb proteinu. Hypofosforylovaná forma pRb blokuje přestup buněk z G1 fáze do S fáze tím, že se váže v jádře na transkripční faktor E2F, nedochází k transkripci genů potřebných pro vstup do S fáze a buněčný cyklus je zastaven. Aktivní pRb dále reprimuje expresi několika dalších genů, jež jsou potřebné pro progresi buněčným cyklem, čímž zajišťuje senescentní zástavu růstu (Campisi, 2001). p16/pRB cesta je rozhodující pro formaci SAHF, které umlčují geny potřebné pro proliferaci a přispívají k ireverzibilnímu senescenčnímu fenotypu (Narita et al., 2003).

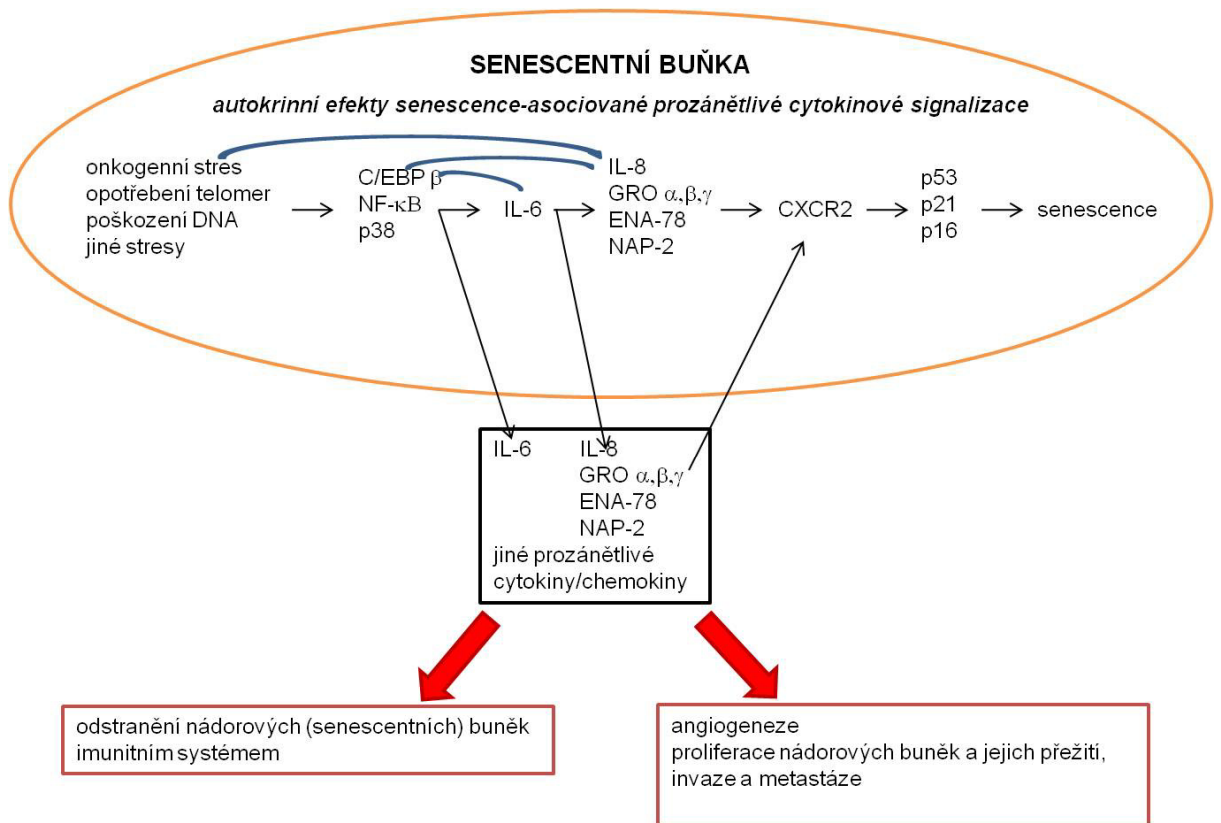


#### **5.4.2.4 Sekreční fenotyp spojený se senescencí - dvojitý efekt senescence**

Senescentní buňky v porovnání s normálními buňkami sekretují jinou směs faktorů do svého okolního prostředí (Campisi et al., 2007). Tvoří tzv. sekreční fenotyp spojený se senescencí (senescence-associated secretome phenotype, SASP), nebo též anglicky nazývaný senescence-messaging secretome (SMS). Sekretované faktory zahrnují komponenty Wnt signální kaskády, IGF1 (insulin-like growth factor 1), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), PAI1 (plasminogen activator inhibitor 1), interleukiny (např. IL-1, IL-6), chemokiny a jejich receptory, extracelulární proteázy, matrixové metaloproteinázy (Kuilman et al., 2009). Některé z těchto faktorů mají tumor-supresivní účinky (např. IGFBP7) (Wajapeyee et al., 2008), posilují senescenční fenotyp, avšak jiné mohou podporovat tumorogenesi v okolních nesenescenčních buňkách (Parrinello et al., 2005). Některé faktory jako IL-6 a IL-8 mohou mít oba účinky v závislosti na kontextu (buněčný typ, stádium nádoru, autokrinní, parakrinní signalizace) (Acosta et al., 2008; Ancrile et al., 2007). Např. IL-6 může působit jako autokrinní růstový faktor pro některé typy nádorových buněk (Hong et al., 2007; Kuilman et al., 2009).

Bylo zjištěno, že u senescentních buněk se výrazně liší genová exprese mezi fibroblasty, epiteliálními a nádorovými buňkami značící, že každý buněčný typ může produkovat specifické faktory s rozdílnými efekty na okolní buňky (Coppe et al., 2008; Ewald et al., 2008; Zhang et al., 2003). Ewald a kol. prováděli sérii pokusů s tkáňovou kulturou prostatických nádorových buněk, kterou ošetřovali doxorubicinem (protinádorové chemoterapeutikum). Zjistili, že růst nádoru nebyl ovlivněn zvýšeným počtem doxorubicinem-indukovaných senescentních buněk a proliferace sousedních nádorových buněk nebyla také zvýšena (Ewald et al., 2008).

Produkce různých faktorů (prozánětlivých cytokinů) senescentními buňkami napomáhá odstranění těchto buněk nespecifickým imunitním systémem, zejména NK buňkami (Soriani et al., 2009).



*parakrinní efekty senescence-asociované prozánětlivé cytokinové signalizace*

Obr. 18: Různé formy stresu nebo poškození mohou vyvolat buněčnou senescenci. Několik různých intracelulárních a extracelulárních mediátorů (na obrázku) indukuje vznik senescentního fenotypu, charakterizovaného neschopností dále proliferovat, změnami v chromatinu (tvorba SAHF) a v lyzozomech (vysoká aktivita lyzozomální  $\beta$ -galaktozidázy). Senescentní stav je také charakterizován velkými změnami v genové expresi. Výsledkem těchto změn je odstranění senescentních buněk imunitním systémem, ale pokud dále v organismu přetrvávají, může to podporovat procesy, které povzbuzují neplastickou proměnu nebo nádorovou progresi sousedních buněk (Hornsby, 2010).

## 6. MATERIÁL A METODY

### 6.1 CHEMIKÁLIE

- 7,5% NaHCO<sub>3</sub>, **Sevapharma (ČR)**
- Ethanol 100%, **Sevapharma (ČR)**
- Glutamin, **Sevapharma (ČR)**
- *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL technology), **Roche Diagnostics GmbH (Germany)**
- Suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA), **Alexis Corporation (USA)**
- Kyselina valproová (VPA), **Alexis Corporation (USA)**
- Kozí sekundární protilátka, **DAKO (Denmark):**
- (F(ab')<sub>2</sub> fragment konjugovaný s RPE) proti myším IgG
- Lidské rekombinantní cytokiny, **BioSource Europe, S.A (Belgie):**
  - interleukin-3 (IL-3)
  - interleukin-6 (IL-6)
  - faktor stimulující růst granulocytárních kolonií (G-CSF)
  - faktor stimulující růst granulocytárních a monocytárních kolonií (GM-CSF)
  - faktor kmenových buněk (stem cell factor, SCF)
- Lidské rekombinantní cytokiny, **Boehringer Ingelheim (Germany)::**
  - interferon-alfa-2c (IFN- $\alpha$ )
  - interferon-beta (IFN- $\beta$ )
  - interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )
- Myší monoklonální protilátky, **eBioscience, (USA):**

- anti-CD14 (61D3)
- anti-CD38 (HIT2)
- Myší monoklonální protilátka proti CD34 IgG1 byla připravena již dříve na našem pracovišti pomocí hybridomové technologie. BALB/c myši byly imunizovány buňkami MOLM-7 leukemické buněčné linie (ustavené od pacienta s CML v blastickém zvratu a CD34+) (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 hematopoietským 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).
- Myší monoklonální protilátka, **Wistar Institute (USA)**:
  - anti-HLA-DR (B33.1) (darována od Dr. Bice Perussia)
- NaCl, **Sigma-Aldrich (USA)**
- Paraformaldehyd, **Sigma-Aldrich (USA)**
- Penicilin, **Sevapharma (ČR)**
- Propidium jodid, **Sigma-Aldrich (USA)**
- Ribonukleáza-A, **Sigma-Aldrich (USA)**
- Senescence  $\beta$ -Galaktosidase Staining Kit, **Cell Signaling Technology (USA)**
- Streptomycin, **Sevapharma (ČR)**
- TritonX-100, **Sigma-Aldrich (USA)**

## 6.2 ROZTOKY:

- **PBS (pH 7,4)**

136mM NaCl

5mM KCl

13,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

2,6mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- **Vindelovův pufr s propidium jodidem**

10mM Tris pH 8,0

1mM NaCl

0,1% Triton X-100

20 µg/ml PI

10 K jednotek ribonukleázy A

## 6.3 KULTIVACE BUNĚK

V této práci byly použity tyto lidské 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 erytroleukémií Dr. P. Martinem, Seattle, USA
- **HL-60:** ustavená od pacienta s akutní promyelocytární leukémií Dr. R.C. Gallo v NCI, Bethesda, USA (CD34-)
- **PS-1:** ustavená od pacienta s akutní T-lymfoblastickou leukémií (CD34-) Dr. P. Stöckbauerem v Bethesde, USA v r. 1984

Lidské leukemické linie jsme získali: MOLM-7 a 9 od Dr. Y. Matsuo prostřednictvím Dr. P. Stöckbauera, JURL-MK1 z GCCM Braunschweig prostřednictvím Dr. Z. Hrkala, HEL, HL-60, PS-1 z depositu Dr. P. Stöckbauera v ÚHK T.

Buňky byly kultivovány v RPMI-1640 médiu (Sigma-Aldrich, USA), které bylo obohaceno 10% fetálním telecím sérem (FCS, Sigma-Aldrich, USA), antibiotiky penicilinem (50 000 U/ml) a streptomycinem (50 mg/ml), dále L-glutaminem (150 mg/l) a 0,18% NaHCO<sub>3</sub>. Buněčné kultury byly inkubovány při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Třikrát týdně se buněčné kultury pasážovaly na hustotu buněk 2- 4x10<sup>5</sup> buněk/ml.

V experimentech byly buňky promývány roztokem PBS. Buněčná suspenze byla centrifugována při pokojové teplotě 10 minut při 1200 x g. Buněčný sediment byl poté resuspendován v takovém objemu PBS, který odpovídal výchozímu objemu buněčné suspenze.

## **6.4 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  $^3\text{H}$ -thymidinu do DNA.

### **6.4.1 Detekce životnosti buněk pomocí trypanové modří**

Procenta životaschopných buněk byla zjišťována pomocí trypanové modří, která byla přidána k buněčné suspenzi jako 0,4% roztok v poměru 1:1. Buňky byly počítány v hemacytometru ve velkém čtverci o objemu 0,1  $\mu\text{l}$  v mikroskopu Meopta DN 816BI (Československo) při zvětšení 150 x. Průměrný počet buněk byl násoben číslem 0,1 a ředěním, čímž byla získána výsledná koncentrace buněk (počet buněk/ml).

### **6.4.2 Detekce buněčného růstu (proliferace) - značení buněk $^3\text{H}$ -thymidinem**

Množství dělicích se buněk bylo stanoveno pomocí radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu, který se během replikace inkorporuje do DNA. Tři replikáty od každého vzorku ošetřených nebo kontrolních buněk byly inkubovány s 24 kBq  $^3\text{H}$ -thymidinu ( $6\text{-}^3\text{H}$  thymidin, Ústav pro výzkum, výrobu a využití radioizotopů, Praha, ČR) o specifické aktivitě 980 GBq/mmol po dobu 4 hodin při 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ . Radioaktivita v nově syntetizované DNA byla měřena pulzně na beta scintilačním přístroji (Scatron) - počet pulzů za minutu (counts per minute, cpm).

## 6.5 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda, která umožňuje současné měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic v suspenzi během jejich průchodu laserovým paprskem. Důležitou vlastností průtokové cytometrie je skutečnost, že se každá buňka nebo částice měří zvlášť. To je umožněno tím, že analyzovaná buněčná suspenze je rozptýlená v laminárně proudící tekutině. Unášené buňky jsou následně vypuzovány z kalibrované trysky, která zajistí, že z otvoru vytékají vysokou rychlostí za sebou seřazené buněčné elementy unášené v tenkém proudu tekutiny. Unášené buňky procházejí jednotlivě přes laserový paprsek a u každé je změřena intenzita rozptýleného světla a intenzita fluorescence vybuze laserem. Každá z těchto veličin odpovídá specifickým parametrům buněk a je vyjádřena v podobě frekvenčního histogramu pro jednotlivé parametry nebo bodových grafů (dotblots) pro kombinaci dvou parametrů. Touto metodou lze získat několik charakteristik měřených buněk. Tzv. „forward scatter“ (FCS)- zpětný rozptyl úměrný velikosti buněk a rozptyl pod úhlem 90°, tzv. side scatter (SSC) je indikátorem buněčné granularity. Dalším parametrem je intenzita fluorescence, která odráží vlastní interakci buněk s fluorescenčním barvivem (fluorochromem) (Ormerod, 2008).

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  $1 \times 10^6$  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 °C a následně uchovány 5 – 7 dní při -20 °C. 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. Během apoptózy dochází k fragmentaci DNA a část nízkomolekulární DNA z buněk unikne při permeabilizaci a následném oplachování a barvení buněk. Tyto buňky se potom barví propidium jodidem méně než buňky v G1 fázi buněčného cyklu. Na histogramu pozorujeme tzv. subG1 peak.

## 6.6 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  $1 \times 10^6$  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  $\mu$ l permeabilizačního roztoku (0,1% TritonX-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  $\mu$ l reakční směsi TUNEL (značící roztok + enzymový roztok). Ke vzorku představujícímu negativní kontrolu bylo přidáno pouze 50  $\mu$ l značícího roztoku. Poté byly buňky 2x promyty v PBS, naředěny na konečný objem 500  $\mu$ l a pomocí průtokové cytometrie byla měřena intenzita zelené (FITC) fluorescence.

## 6.7 IMUNOFENOTYPIZACE

Metodou průtokové cytometrie při barvení buněk s fluorescenčním barvivem (fluorochromem), které je konjugováno se specifickými protilátkami, lze určit přítomnost povrchových znaků, tzv. diferenciačních znaků (clusters of differentiation - CD). V naší práci byla sledována exprese povrchových antigenů na leukemické buněčné linii MOLM-9, použitím panelu myších monoklonálních protilátek proti lidským antigenům: CD14 (61D3), CD34 (4H11), CD38 (HIT2), HLA-DR (B33.1).

## 6.8 DETEKCE SENESCENCE (SENECENTNÍCH BUNĚK)

Významným směrodatným biomarkerem senescentních buněk *in vitro* i *in vivo* je detekce aktivity lysozomální  $\beta$ -galaktozidázy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -gal, senescence-associated  $\beta$ -galaktosidase). V senescentních buňkách je aktivita SA- $\beta$ -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  $\beta$ -Galaktosidase Staining Kit od Cell Signaling Technology. Pomocí kitu se u buněk v kultuře detekuje  $\beta$ -galaktosidázová aktivita při pH 6, jež je typická pouze pro senescentní buňky a nebyla nalezena u presenescentních, klidových nebo immortalizovaných buněk. Buňky byly ošetřeny SAHA nebo VPA a po 24, 48, 72, 96 nebo 120 hodinách byly odebrány vzorky ( $1 \times 10^6$  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  $\beta$ -D-galactoside) (1 mg/ml), rozpuštěné v roztoku obsahujícím 40 mM kyselinu citrónovou pH 6,5; 5 mM hexakynoželezitan draselný; 5 mM hexakynoželeznatan 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.

## 6.9 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- $\gamma$  (0,125  $\mu$ g/ml) a to buď v kombinaci s monoklonální protilátkou proti CD34 (klon 4H11) nebo bez ní. Poté byly vytvořeny cytopspinové preparáty na cytocentrifuze Cytospin 2, firmy Shandon, Anglie, centrifugací suspence živých buněk na mikroskopická podložní skla 800 otáček/minutu (rpm) po dobu 10 minut.

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 TERAPIE POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK

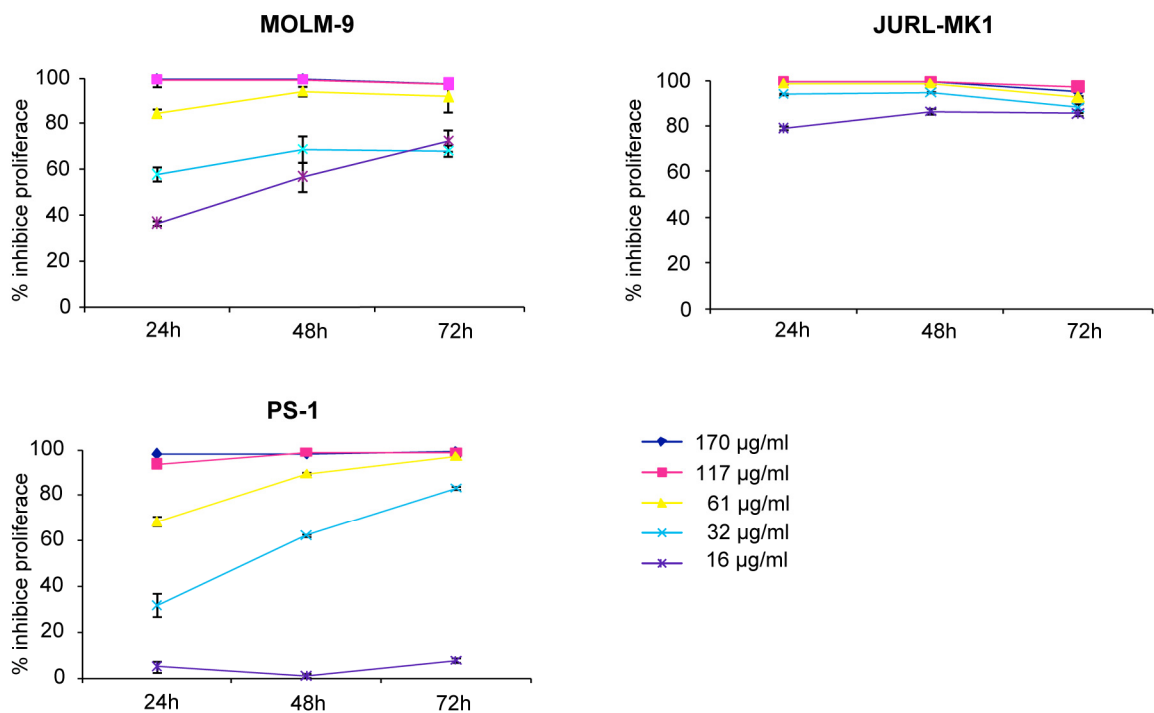
V první části předkládané práce jsem studovala antiproliferativní, proapoptický a diferenciací účinek monoklonální protilátky proti proteinovému epitopu molekuly CD34 na CD34+ a CD34- leukemických buněčných liniích.

#### 7.1.1 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 <sup>3</sup>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:

$$\text{Inhibice proliferace [\%]} = [\text{cpm (kontrolní)} - \text{cpm (ošetřené)}] / \text{cpm (kontrolní)}$$

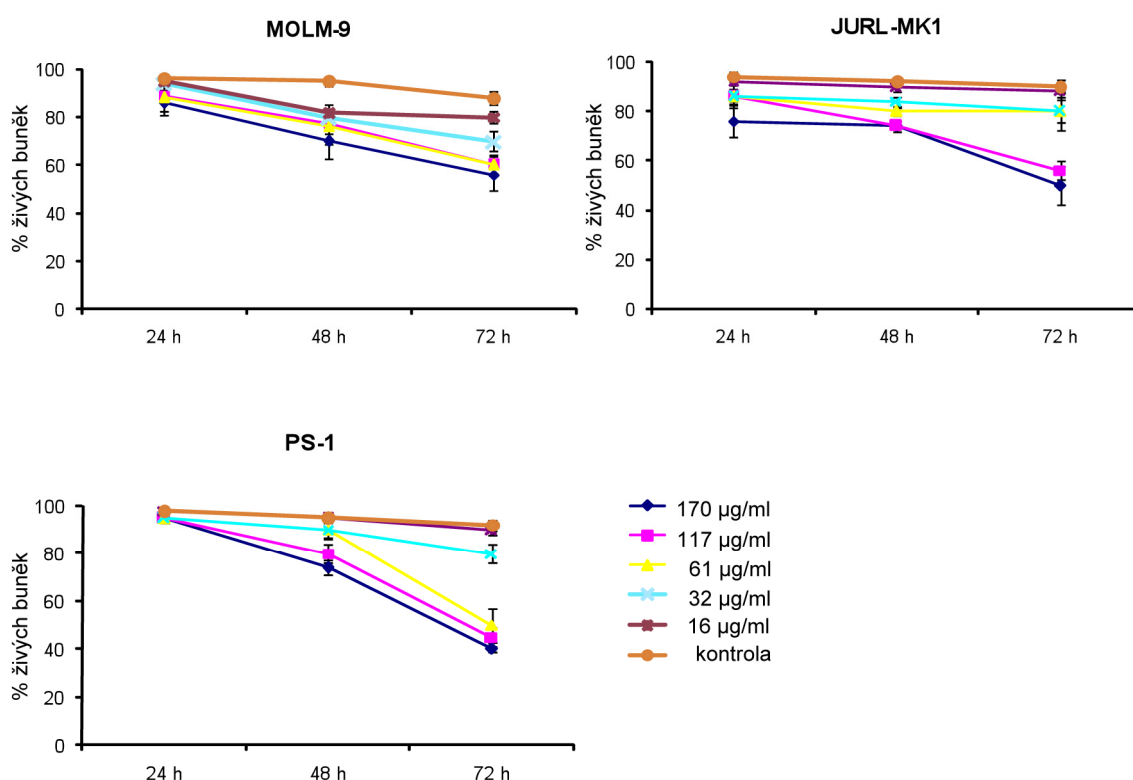
Koncentrace 16 µg/ml a vyšší významně inhibovala proliferaci CD34+ linií. V koncentracích vyšších než 32 µg/ml však také docházelo k nespecifické inhibici proliferace u buněčných linií CD34-. Antiproliferativní účinek protilátky závisel na dávce a době působení. Nejsilnější inhibiční efekt byl pozorován po 72 hodinách inkubace s purifikovanou protilátkou (obr. 19).



Obr. 19: Inhibice buněčného růstu působením monoklonální protilátky anti-CD34 (4H11) v koncentracích 16-170 µg/ml na leukemické buněčné linie CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1) od 24 do 72 hodin. Množství dělících se buněk bylo stanoveno měřením radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 4 hodin. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.

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

Linie byly inkubovány v přítomnosti 16-170  $\mu\text{g/ml}$  purifikované myší monoklonální protilátky (IgG1 třídy) proti glykoproteinovému epitopu molekuly CD34 produkované hybridomovým klonem 4H11. 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  $\mu\text{g/ml}$ ) byl počet obarvených buněk zanedbatelný (obr. 20).



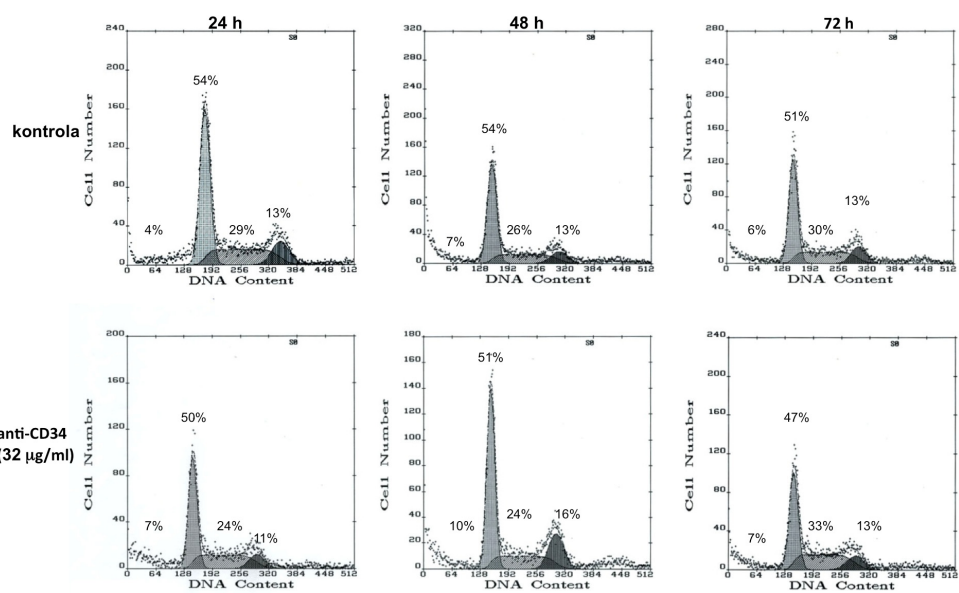
Obr. 20: Sledování životnosti leukemických buněčných linií CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1) po 24, 48 a 72 hodinách působení monoklonální protilátky anti-CD34 v koncentracích 16 -170  $\mu\text{g/ml}$ . Životnost buněk byla zjišťována obarvením trypanovou modří. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.



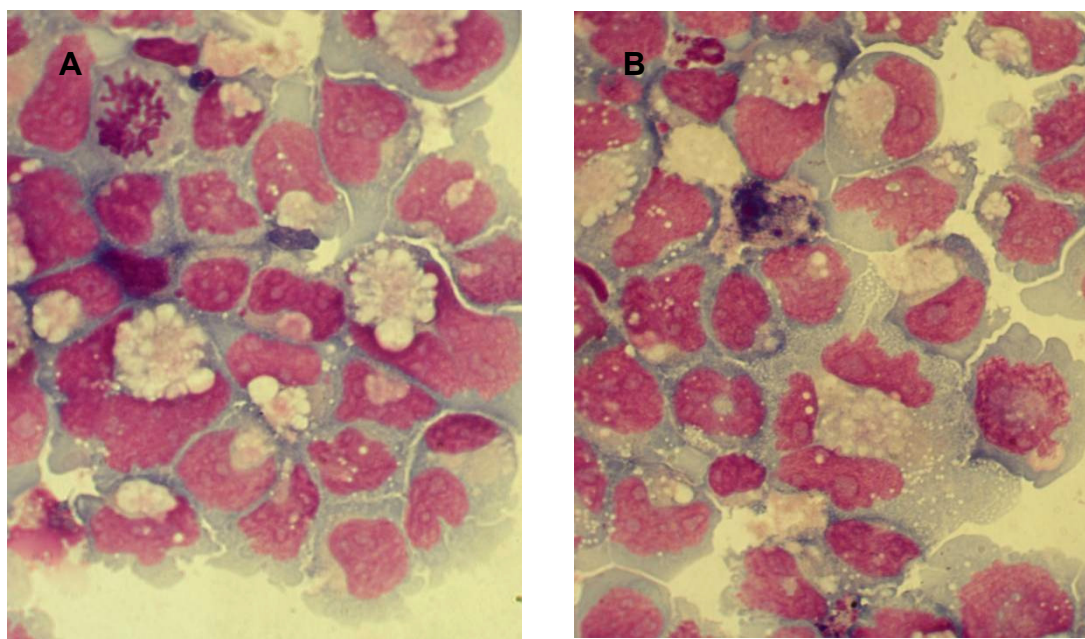
### **7.1.3 Indukce apoptózy CD34+ a CD34- leukemických buněčných linií působením monoklonální protilátky anti-CD34**

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). Za hlavní znak kulminujícího procesu apoptózy (terminální fáze) je považována fragmentace DNA. Frakce buněk, která dosáhla tohoto stádia, byla detekována pomocí metody TUNEL založené na značení fragmentů DNA pomocí terminální deoxynukleotidyltransferázy. Dále jsem již pracovala s anti-CD34 protilátkou v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$ , neboť působením nižších koncentrací (např. 32  $\mu\text{g/ml}$ ) na linii MOLM-9 nedošlo k výrazné indukci apoptózy a k ovlivnění buněčného cyklu oproti kontrolním buňkám (obr. 21).

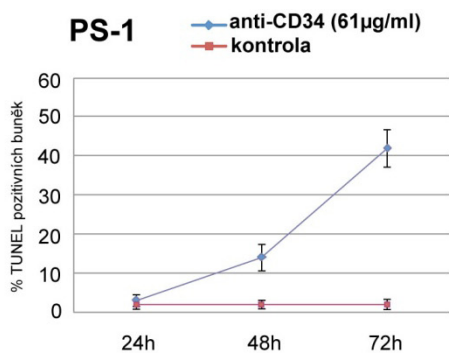
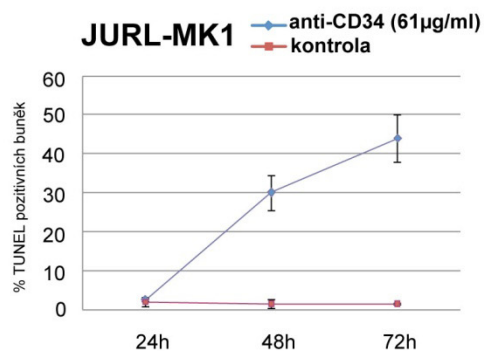
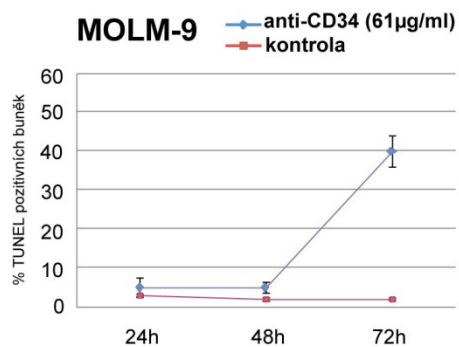
Buňky byly ošetřeny protilátkou v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$  a po 24, 48 a 72 hodinách jsme měřili pomocí průtokové cytometrie procentuální zastoupení TUNEL-pozitivních buněk. Procento apoptotických buněk (TUNEL-pozitivních) se během 72 hodinové inkubace s protilátkou postupně zvyšovalo, v kontrolních vzorcích bylo přitom stále jen asi 2% pozitivních buněk. Protilátka proti molekule CD34 v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$  indukuje apoptózu i u CD34- leukemické buněčné linie PS-1. Nejrychlejší proapoptotický účinek protilátky anti-CD34 v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$  byl pozorován u linie JURL-MK1 (obr. 23). Na obr. 22B můžeme vidět apoptotické buňky MOLM-9 po 24 hodinách působení anti-CD34.



Obr. 21: Analýza buněčného cyklu buněk MOLM-9 po 24, 48 a 72 hodinách ošetření protilátkou anti-CD34 (4H11) v koncentraci 32 µg/ml. Čísla udávají procentuální podíl buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.



Obr. 22: Cytospinový preparát buněk MOLM-9 A) neošetřená, B) po 24 hodinách působení monoklonální protilátky proti molekule CD34 produkované klonem 4H11 (61 µg/ml).

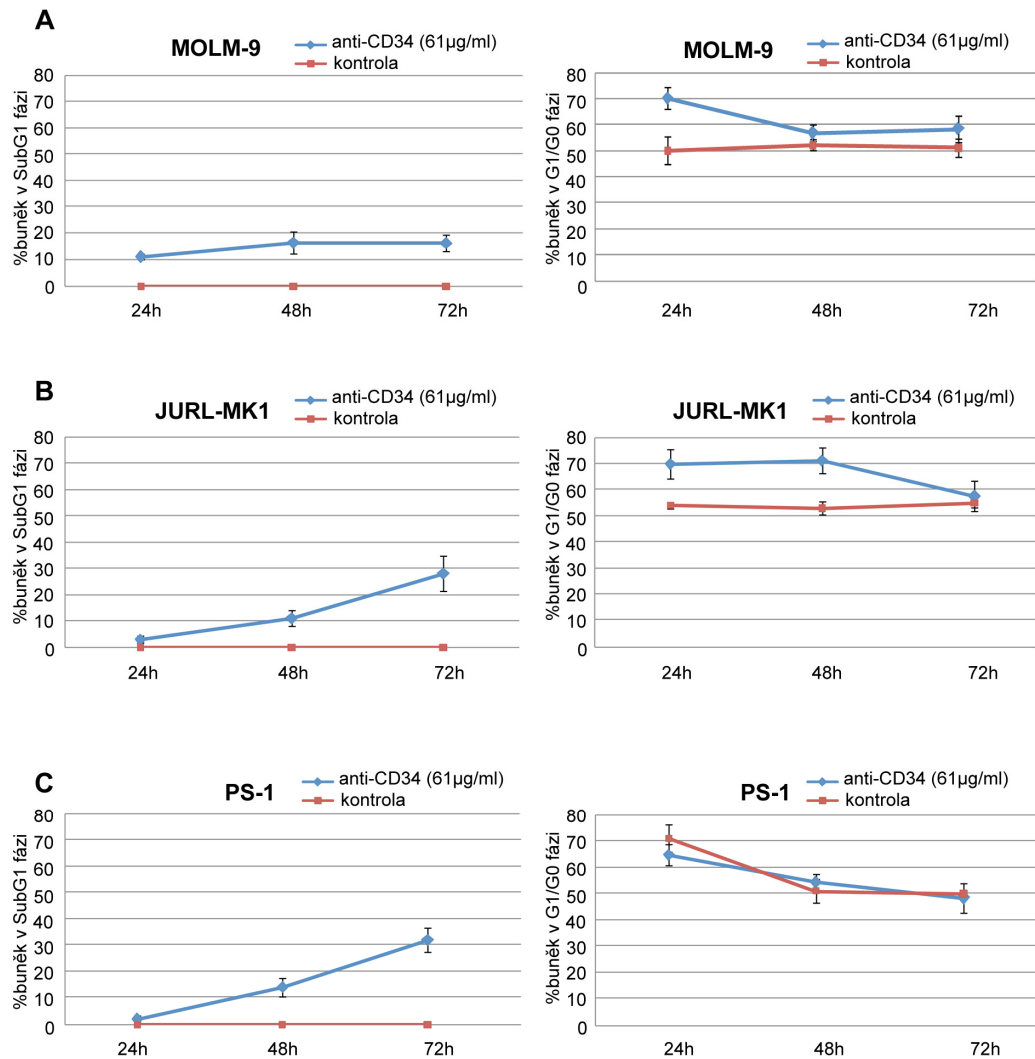


Obr. 23: Indukce apoptózy u leukemických buněčných linií CD34+ (MOLM-9, JURL-MK1) a CD34- (PS-1) působením monoklonální protilátky proti molekule CD34 v koncentraci 61 µg/ml. Frakce apoptotických buněk (TUNEL-pozitivních buněk) byla zjišťována pomocí testu TUNEL po 24, 48 a 72 hodinách měření na průtokovém cytometru. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.

#### **7.1.4 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. Pomocí průtokové cytometrie můžeme rozlišit buňky s rozdílnou intenzitou fluorescence v závislosti na množství DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G1, S, G2/M). Je také možné sledovat buňky v závěrečné fázi apoptózy, ve které dochází k fragmentaci DNA (subG1 fáze).

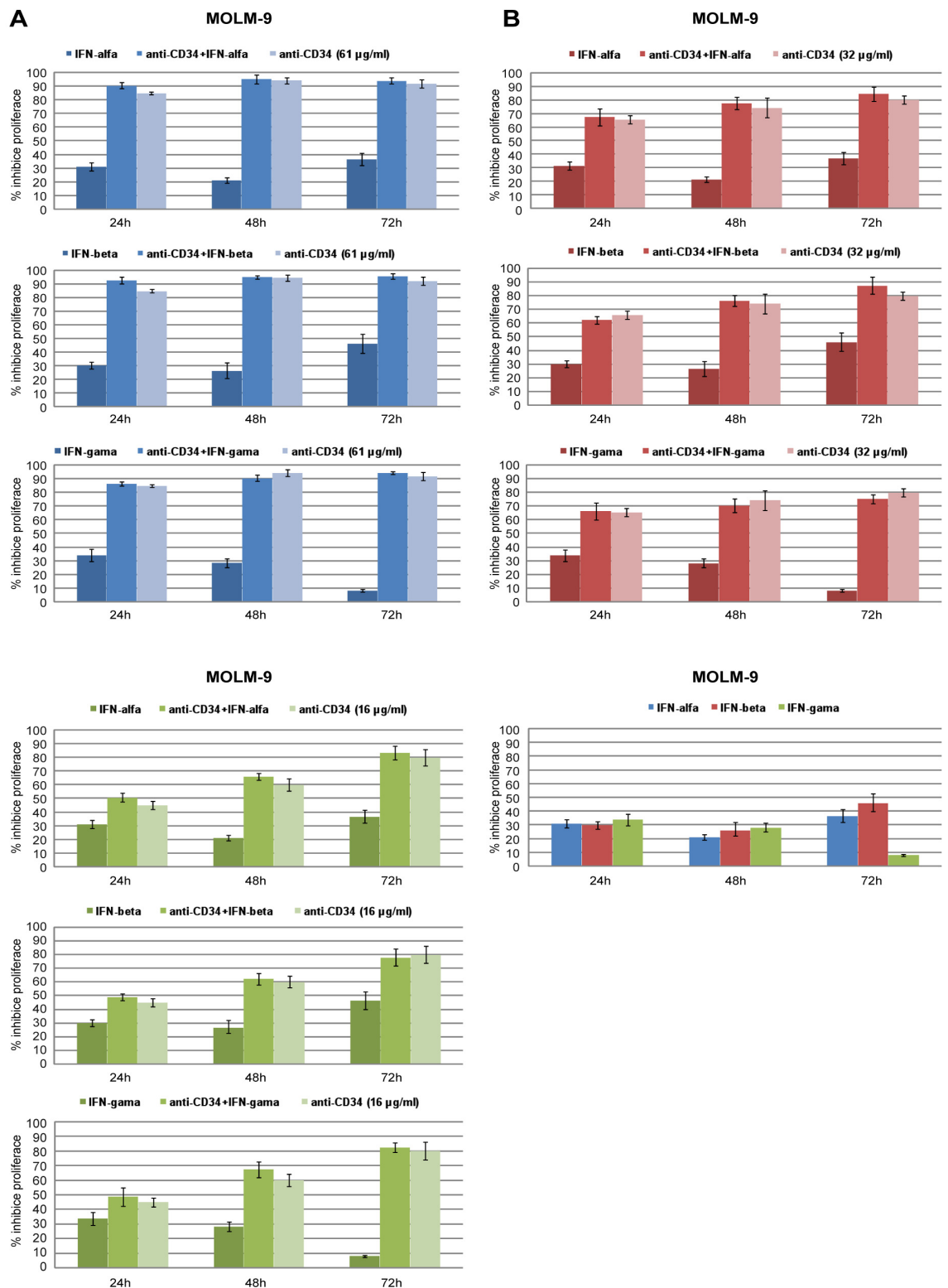
Monoklonální protilátka proti molekule CD34 v koncentraci 61 µg/ml indukovala zástavu buněčného cyklu v G1/G0 fázi po 24 hodinách u linie MOLM-7 (obr. 24 A) a po 24 a i po 48 hodinách u linie JURL-MK1 (obr. 24 B). Naproti tomu u linie PS-1 nebyla pozorována zástava v G1/G0 fázi (obr. 24 C), ale ani v 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.



Obr. 24: Analýza buněčného cyklu leukemických buněčných linií CD34+ MOLM-9 (A) a JURL-MK1 (B) a leukemické buněčné linie CD34- PS-1 (C) pomocí průtokové cytometrie. MOLM-9, JURL-MK1 a PS-1 buňky byly inkubovány s monoklonální protilátkou anti-CD34 v koncentraci 61 µg/ml po dobu 24, 48 a 72 hodin. Data udávají procentuální zastoupení buněk v G1/G0 fázi a buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.

### 7.1.5 Účinek interferonů IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ a monoklonální protilátky proti molekule CD34 na proliferaci buněk leukemické linie MOLM-9

Linie MOLM-9 byla inkubována buď se samotnými interferony: IFN- $\alpha$  (0.075  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo IFN- $\beta$  (0.375  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo IFN- $\gamma$  (0.125  $\mu\text{g/ml}$ ) a nebo v kombinaci s protilátkou proti molekule CD34 (v koncentracích 16, 32 a 61  $\mu\text{g/ml}$ ). Po 24, 48 a 72 hodinách kultivace buněk MOLM-9 s interferony a/nebo s protilátkou byla sledována inhibice proliferace měřením inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu do DNA. Jak je patrné na obrázku 25 D, interferony IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  potlačují růst buněk linie MOLM-9 ve srovnání s kontrolními buňkami. IFN- $\gamma$  také inhibuje proliferaci těchto buněk, ale s dobou působení antiproliferativní účinek IFN- $\gamma$  klesá. Ošetření buněk MOLM-9 samotnou protilátkou proti molekule CD34 v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 25 A) nebo 32  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 25 B) nebo 16  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 25 C) a nebo 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 (obr. 25).



Obr. 25: Účinek IFN- $\alpha$  (0,075  $\mu\text{g/ml}$ ), IFN- $\beta$  (0,375  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo IFN- $\gamma$  (0,125  $\mu\text{g/ml}$ ) a monoklonální protilátky anti-CD34 na proliferaci buněk MOLM-9. Buňky byly inkubovány v médiu obsahujícím IFN- $\alpha$  (0,075  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo IFN- $\beta$  (0,375  $\mu\text{g/ml}$ ) nebo IFN- $\gamma$  (0,125  $\mu\text{g/ml}$ ) (D), samotnou protilátkou anti-CD34 (v koncentraci 16, 32 nebo 61  $\mu\text{g/ml}$ ) anebo jednotlivé interferony v kombinaci s protilátkou anti-CD34 a to buď v koncentraci 16  $\mu\text{g/ml}$  (A), 32  $\mu\text{g/ml}$  (B) nebo (C) 61  $\mu\text{g/ml}$ .

Množství dělících se buněk bylo stanoveno měřením radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 4 hodin. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.

### **7.1.6 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- $\gamma$  (0,125  $\mu\text{g/ml}$ )] v kombinaci s protilátkou anti-CD34 (61  $\mu\text{g/ml}$ ) na buněčný růst a indukci diferenciaci leukemické buněčné linie MOLM-9. Po 72 a 120 hodinách kultivace s danými látkami byla buněčná diferenciaci vyhodnocena pomocí morfologické analýzy vytvořením cytopspinových preparátů. Dále jsem hodnotila indukci diferenciaci pomocí průtokové cytometrie sledováním exprese povrchových membránových molekul nacházejících se u více diferenciováných buněk, jako jsou CD14 a HLA-DR, ztrátu (snížení exprese) molekuly CD34. Exprese jednotlivých povrchových znaků po 72 hodinách kultivace je znázorněna v tab. 3. Po ošetření IFN- $\gamma$  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 (tab. 3). Pomocí morfologické analýzy (cytopspinové preparáty) nebo průtokové cytometrie jsme neobjevili žádné znaky myeloidní nebo lymfoidní diferenciaci 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- $\gamma$  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  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibovalo proliferaci buněk MOLM-9 (obr. 26). Na obr. 27 můžeme vidět ukázkovou imunofluorescenci povrchové

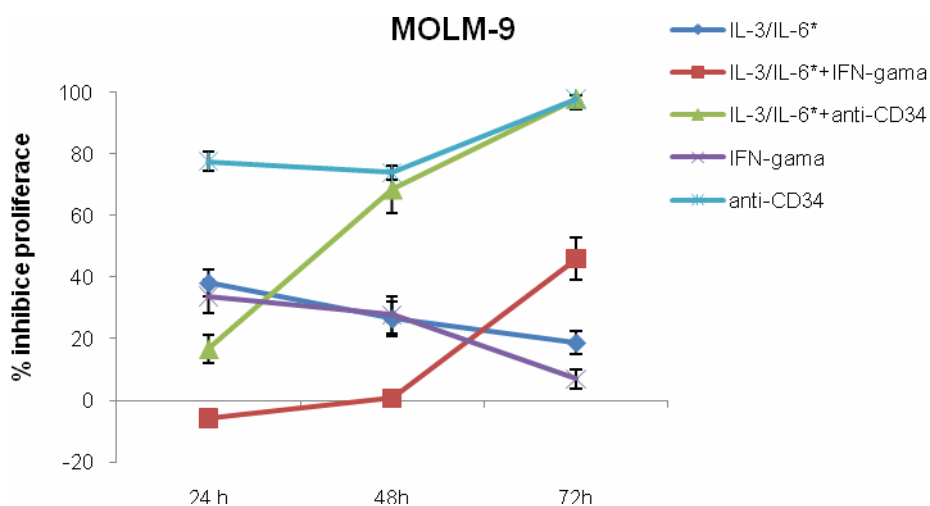


molekuly CD34 na buňkách MOLM-9 pomocí PE značené anti-CD34 monoklonální protilátky (klonu 4H11).

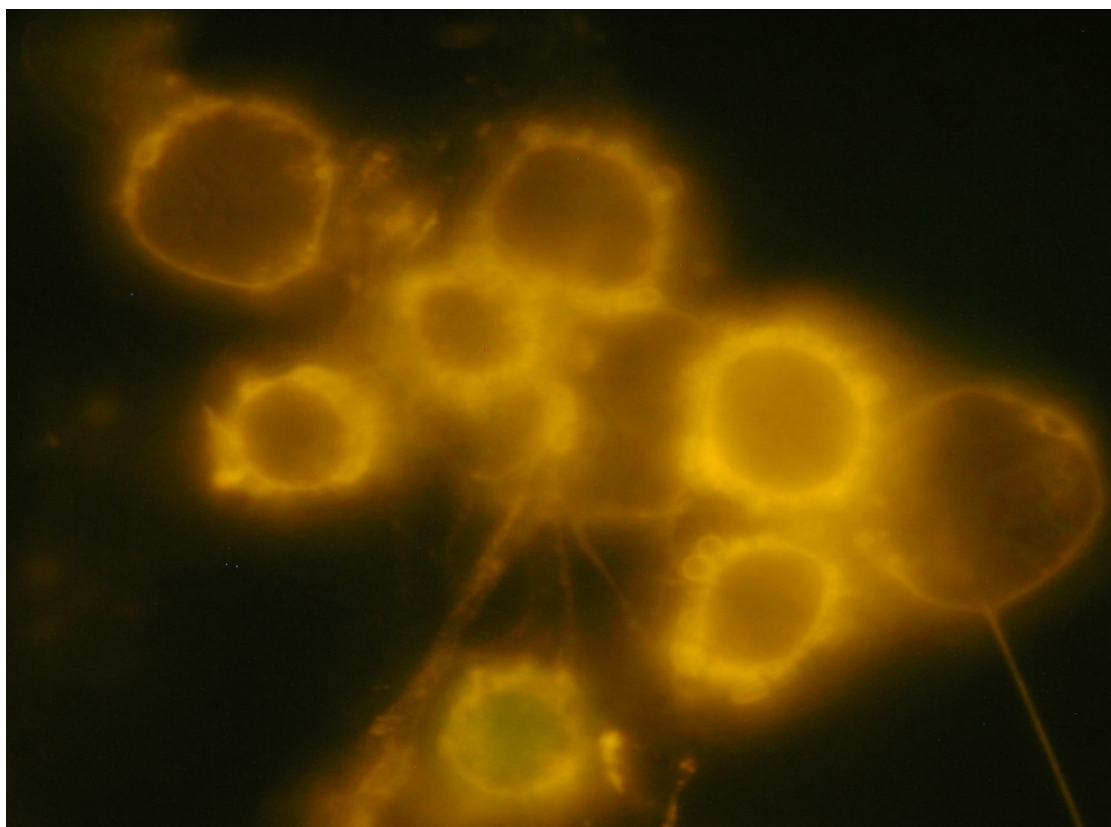
\* IL-3/IL-6 = směs cytokinů: IL-3+IL-6+G-CSF+GM-CSF+SCF

MOLM-9	CD34	CD38	CD14	HLA-DR
IL-3/IL-6*	89 ± 16	0	0	7 ± 3
IL-3/IL-6* + IFN- $\gamma$	91 ± 8	0	0	41 ± 7
IL-3/IL-6* + anti-CD34 (61 $\mu$ g/ml)	76 ± 14	0	0	8 ± 3
IFN- $\gamma$	33 ± 4	48 ± 5	54 ± 7	63 ± 9
anti-CD34 (61 $\mu$ g/ml)	87 ± 10	0	0	5 ± 2
kontrola	88 ± 6	0	0	8 ± 3

Tab. 3: Expres povrchových molekul u linie MOLM-9 po 72 hodinách působení cytokiny, protilátkou anti-CD34 nebo kombinovaném působení (hodnoty jsou udány v procentuálním počtu pozitivních buněk detekovaných pomocí průtokové cytometrie). Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.



Obr. 26: Účinek 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- $\gamma$  (0.125  $\mu$ g/ml) v kombinaci s protilátkou anti-CD34 (61  $\mu$ g/ml) na buněčný růst leukemické buněčné linie MOLM-9 během 24, 48 a 72 hodinové inkubace. Množství dělicích se buněk bylo stanoveno měřením radioaktivně značeného  $^3$ H-thymidinu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 4 hodin. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.



Obr. 27: Imunofluorescence povrchové molekuly CD34 na linii MOLM-9 pomocí PE značené monoklonální protilátky produkované klonem 4H1 (Mikroskop Olympus, zvětšení ca 1200x).

## 7.2 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.

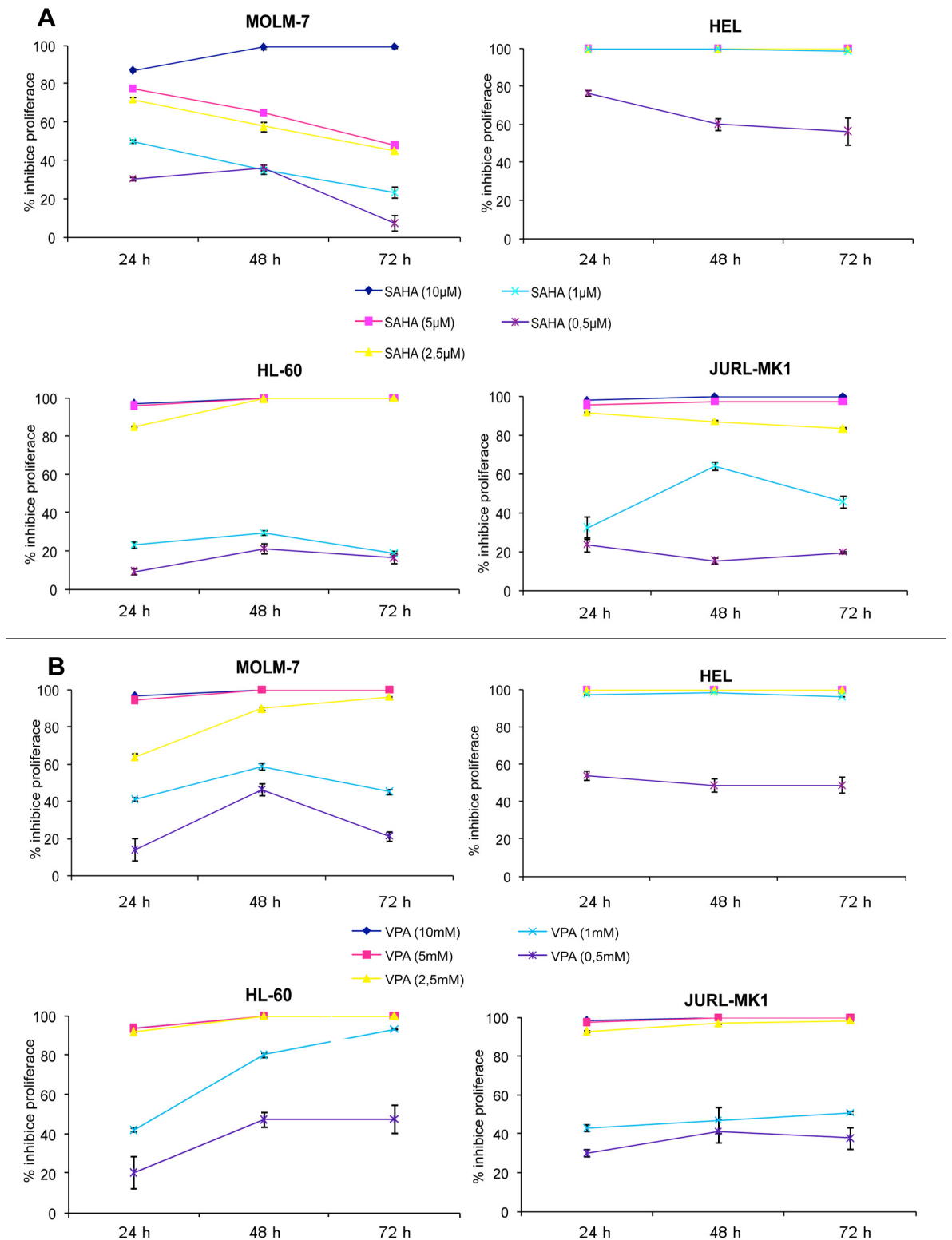
### 7.2.1 SAHA i VPA inhibují proliferaci leukemických buněčných linií

K navození inhibice buněčné proliferace bylo použito látky SAHA v koncentracích 0,5-10 $\mu$ M 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:

$$\text{Inhibice proliferace [\%]} = [\text{cpm (kontrolní)} - \text{cpm (ošetřené)}] / \text{cpm (kontrolní)}$$

#### 7.2.1.1 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). Jak je vidět na obr. 28 A a B, nejsilnější inhibiční účinek na linie JURL-MK1, HL-60 a HEL měly koncentrace 2,5-10  $\mu$ M 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 koncentracích 0,5-5  $\mu$ M 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 IC<sub>50</sub> (koncentrace způsobující 50% inhibici proliferace) byly u linie HEL 0,3  $\mu$ M pro SAHA a 0,3 mM pro VPA (tab. 4).



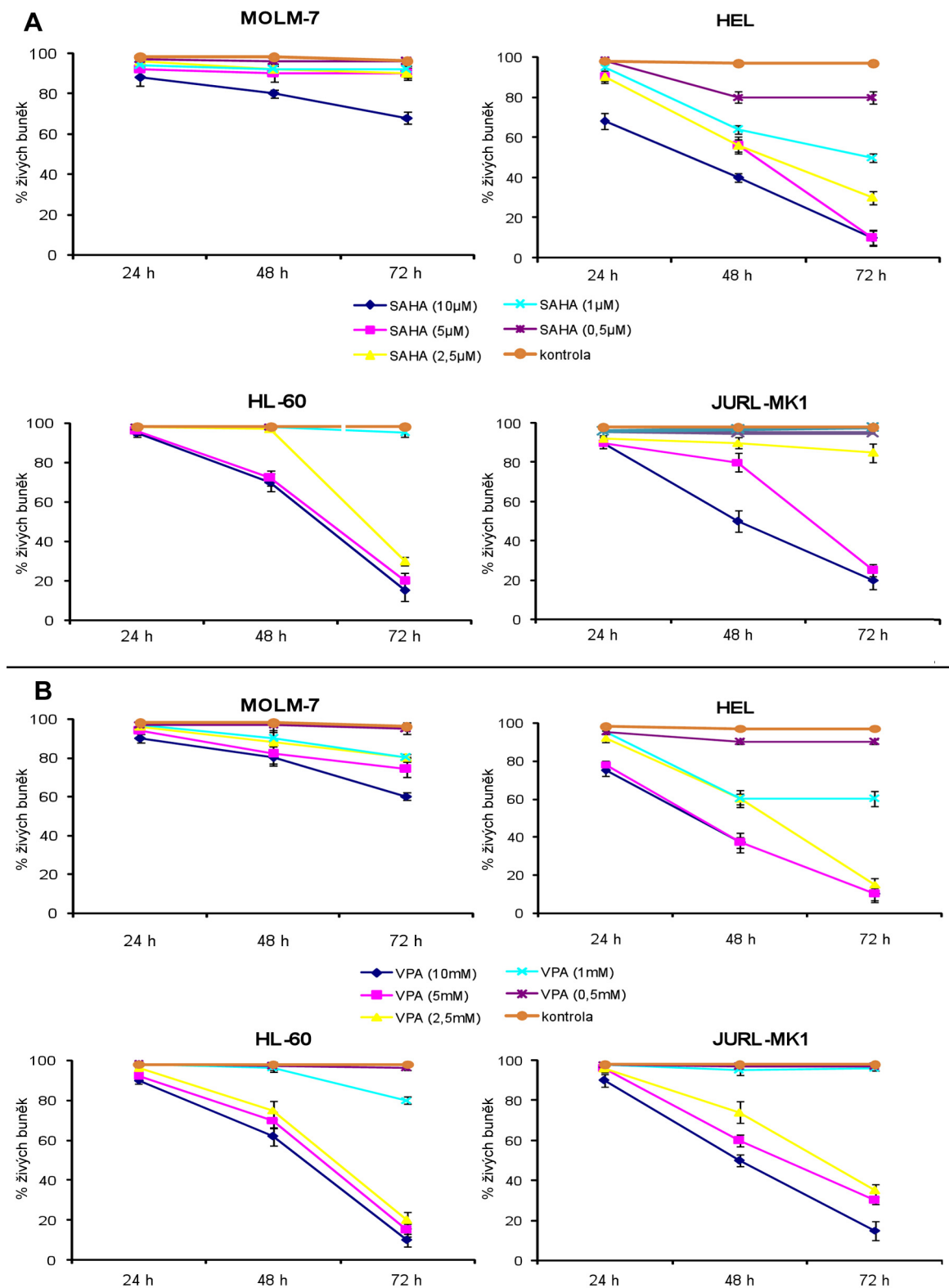
Obr. 28: Antiproliferativní účinek inhibitorů HDAC v koncentracích 0,5-10  $\mu\text{M}$  SAHA (**A**) a v koncentracích 0,5-10 mM VPA (**B**) na liniích MOLM-7, HEL, HL-60 a JURL-MK1 od 24 do 72 hodin. Množství dělících se buněk bylo stanoveno měřením radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 4 hodin. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.

### 7.2.1.2 Účinek inhibitorů HDAC na životnost leukemických buněčných linií

Linie byly inkubovány v přítomnosti 0,5-10  $\mu\text{M}$  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  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{M}$  pro SAHA a 0,5-1 mM pro VPA) byl zanedbatelný (obr. 29 A, B).

IC50						
	24h		48h		72h	
	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)
<b>HL-60</b>	1,5 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,04
<b>HEL</b>	0,3 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,04
<b>MOLM-7</b>	1,2 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,03	3,8 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1

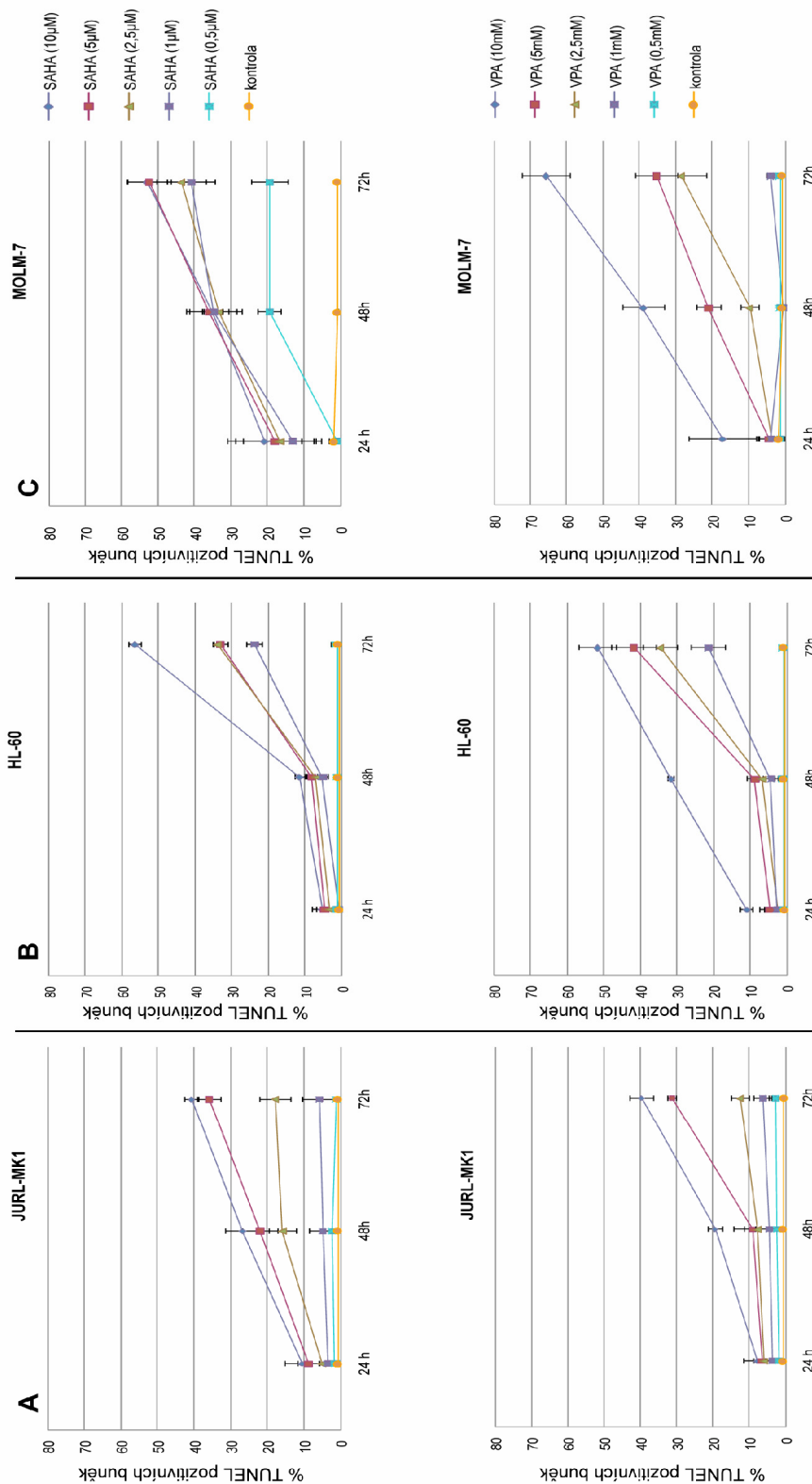
Tab.4: Hodnoty IC50 (koncentrace způsobující 50% inhibici proliferace) po 24, 48 a 72 hodinách působení SAHA a VPA u leukemických linií MOLM-7, JURL-MK1 a HL-60 a HEL. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.



Obr. 29: Sledování životnosti leukemických buněčných linií MOLM-7, HEL, HL-60 a JURL-MK1 po 24, 48 a 72 hodinách působení inhibitorů HDAC v koncentracích 0,5-10 µM pro SAHA (A) a v koncentracích 0,5-10 mM pro VPA (B). Životnost buněk byla zjišťována obarvením trypanovou modří. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.

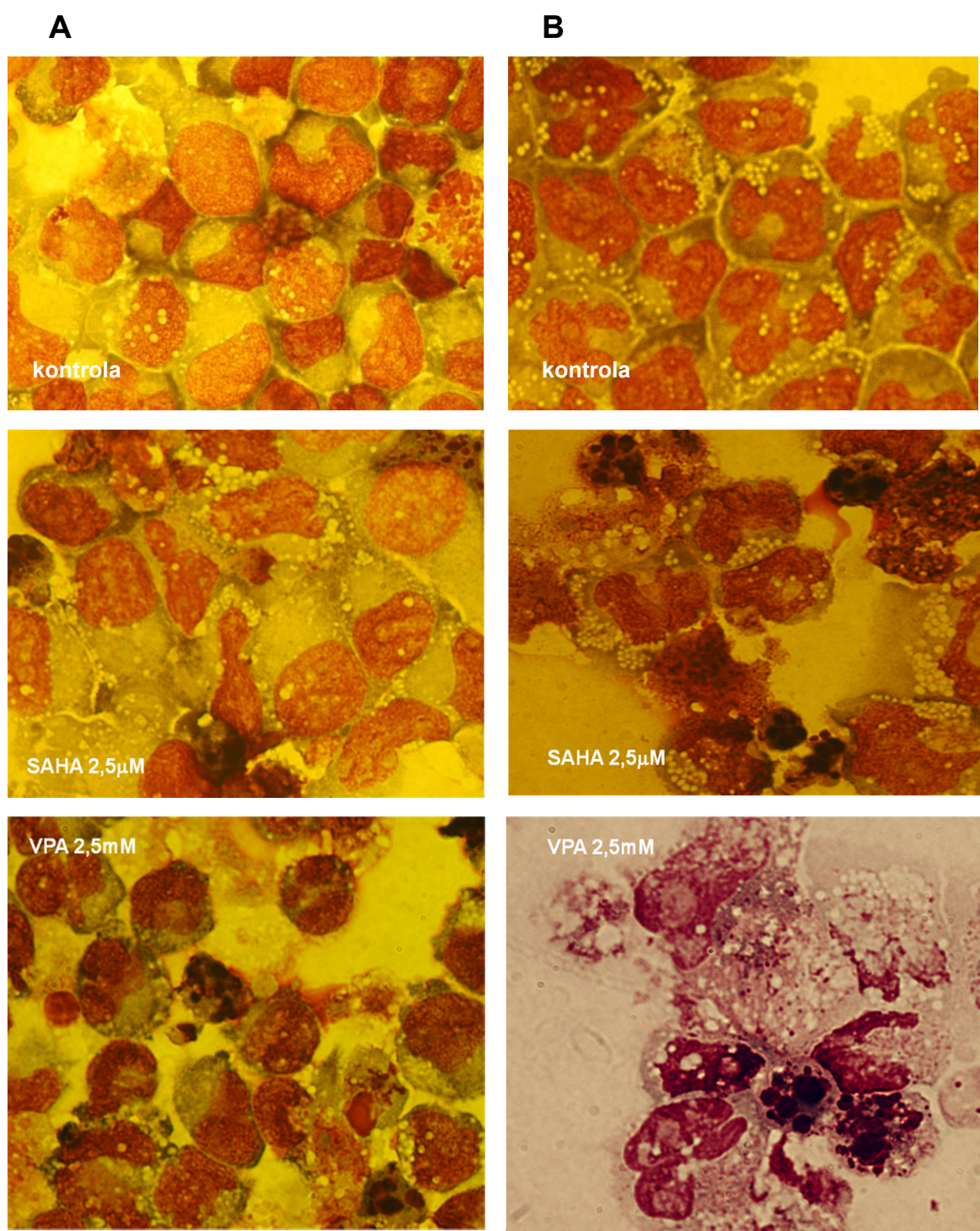
## 7.2.2 Indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

Vedle inhibice proliferace, jsme také sledovali, zda inhibitory HDAC indukují apoptózu u leukemických linií MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Za hlavní znak kulminujícího procesu apoptózy (terminální fáze) je považována fragmentace DNA. Frakci apoptotických buněk, které dosáhly terminální fáze apoptózy jsme měřili pomocí metody TUNEL založené na značení fragmentů DNA pomocí terminální deoxynukleotidyl-transferázy. Buňky byly ošetřeny SAHA v koncentracích 0,5-10  $\mu$ M 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 zvyšují počet TUNEL-pozitivních buněk linie JURL-MK1 a HL-60 a to až k 40-60% (obr. 30 A, B). Koncentrace 0,5-10 $\mu$ M SAHA a 2,5-10mM VPA indukovaly fragmentaci DNA a zvyšovaly počet TUNEL-pozitivních buněk linie MOLM-7 (obr. 30 C). Stejně jako u inhibice proliferace je indukce apoptózy závislá na koncentraci a době působení inhibitorů HDAC. Na obrázku 31. můžeme vidět apoptotické buňky JURL-MK1 a MOLM-9 po 72 hodinách inkubace se SAHA a VPA.



Obr. 30: Indukce apoptózy u leukemických buněčných linií JURL-MK1 (A), HL-60 (B) a MOLM-7 (C) působením inhibitorů HDAC (v koncentracích: 0,5-10 μM pro SAHA a 0,5-10 mM pro VPA). Frakce apoptotických buněk (TUNEL-pozitivních buněk) byla zjišťována pomocí testu TUNEL po 24, 48 a 72 hodinách měření na průtokovém cytometru. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří experimentů.



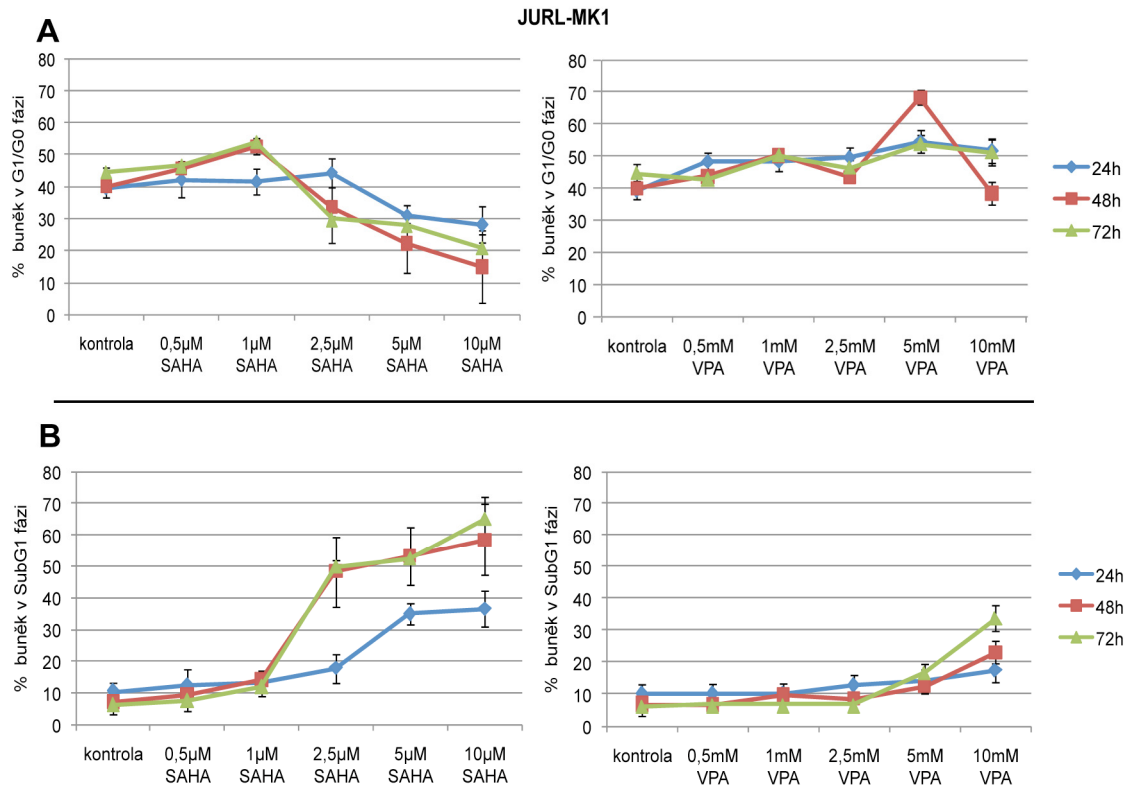


Obr. 31: Cytospinové preparáty leukemických buněčných linií JURL-MK1 (A) a MOLM-7 (B) po 72 hodinách působení SAHA 2,5μM a VPA 2,5mM.

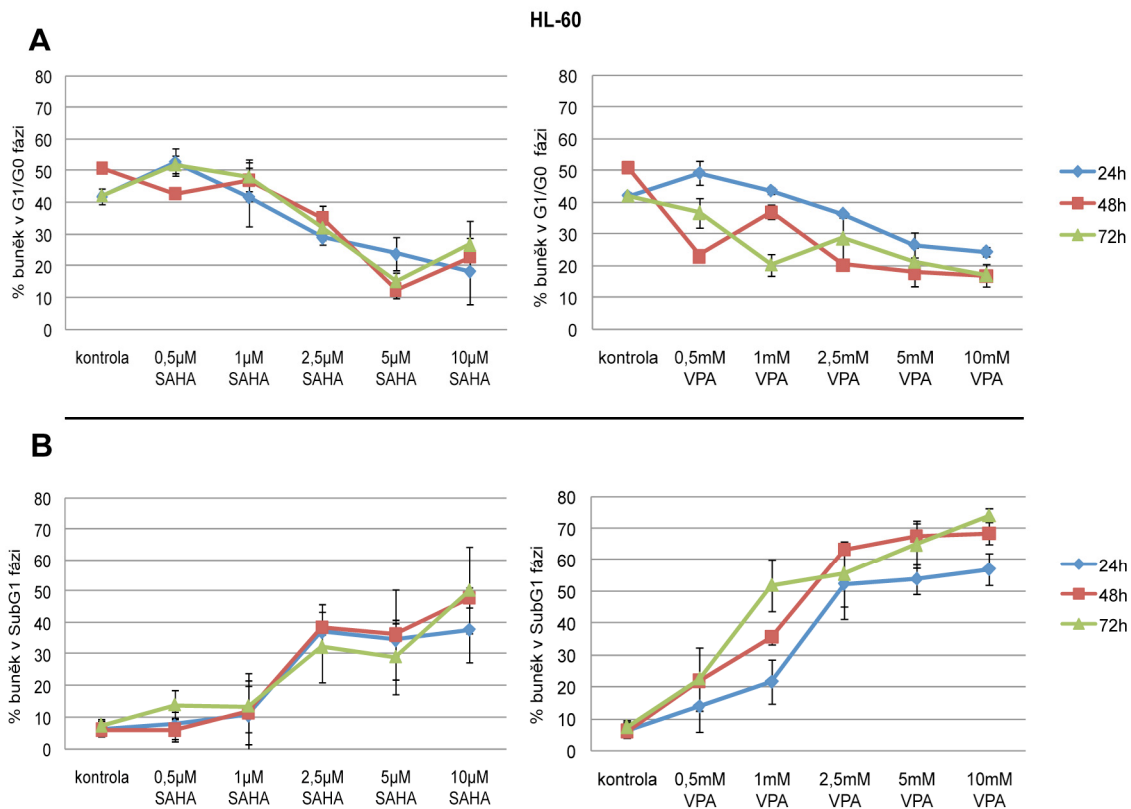
### 7.2.3 Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy leukemických buněčných linií působením inhibitorů HDAC

Metodou průtokové cytometrie s použitím propidium jodidu jsme sledovali, zda ošetření SAHA v koncentracích 0,5-10  $\mu\text{M}$  a VPA v koncentracích 0,5-10 mM ovlivnilo u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1 průběh buněčného cyklu. Po 24, 48 a 72 hodinové inkubaci s inhibitory HDAC, byla plazmatická membrána buněk permeabilizována 70% ledovým etanolem. Následně byla DNA permeabilizovaných buněk označena propidium jodidem a průtokovou cytometrií změřena červená fluorescence. Pomocí průtokové cytometrie můžeme rozlišit buňky s rozdílnou fluorescencí v závislosti na množství DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G1, S, G2/M). Je také možné sledovat buňky v závěrečné fázi apoptózy, ve které dochází k fragmentaci DNA (subG1 fáze).

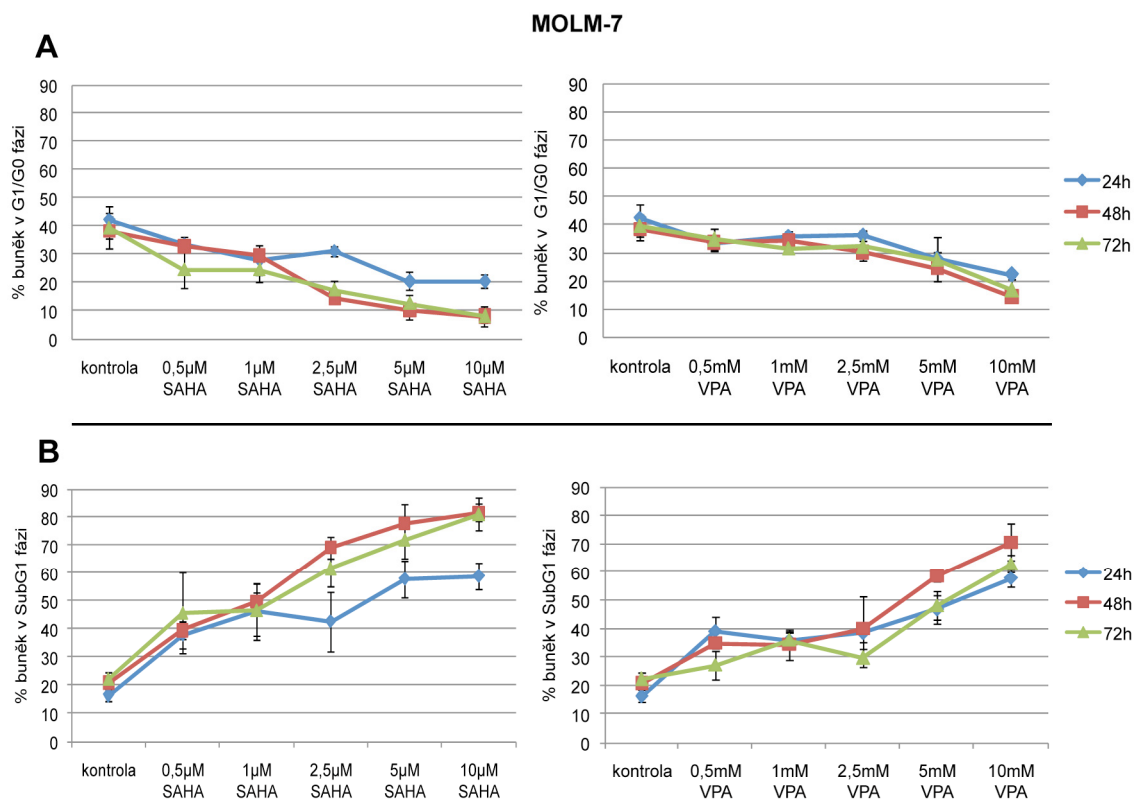
U buněčné linie JURL-MK1 vystavené účinku 5 mM VPA docházelo po 24 hodinách k mírné zástavě v G1/G0 fázi buněčného cyklu a po 48 hodinách 5 mM VPA indukovala rovněž u buněk JURL-MK1 zástavu buněčného cyklu v G1/G0 fázi. Avšak delší dobou působení (72 hodin) vyšších koncentrací VPA docházelo už k rostoucí akumulaci buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. SAHA v koncentraci 1  $\mu\text{M}$  indukovala po 48 a 72 hodinách mírnou zástavu v G1/G0 fázi buněčného cyklu (obr. 32). 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 (obr. 32). U linií HL-60 a MOLM-7 nebyla detekována zástava buněčného cyklu po ošetření SAHA nebo VPA. Avšak, jak je vidět na obrázku 33 a 34, působením zvyšujících dávek SAHA a VPA roste i počet buněk akumulovaných v subG1 fázi buněčného cyklu během 72 hodin působení.



Obr. 32: Analýza buněčného cyklu leukemické buněčné linie JURL-MK1 pomocí průtokové cytometrie. JURL-MK1 buňky byly inkubovány s inhibitory HDAC v koncentracích 0,5-10  $\mu$ M SAHA a 0,5-10 mM VPA po dobu 24, 48 a 72 hodin. **(A)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v G1/G0 fázi buněčného cyklu. **(B)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.



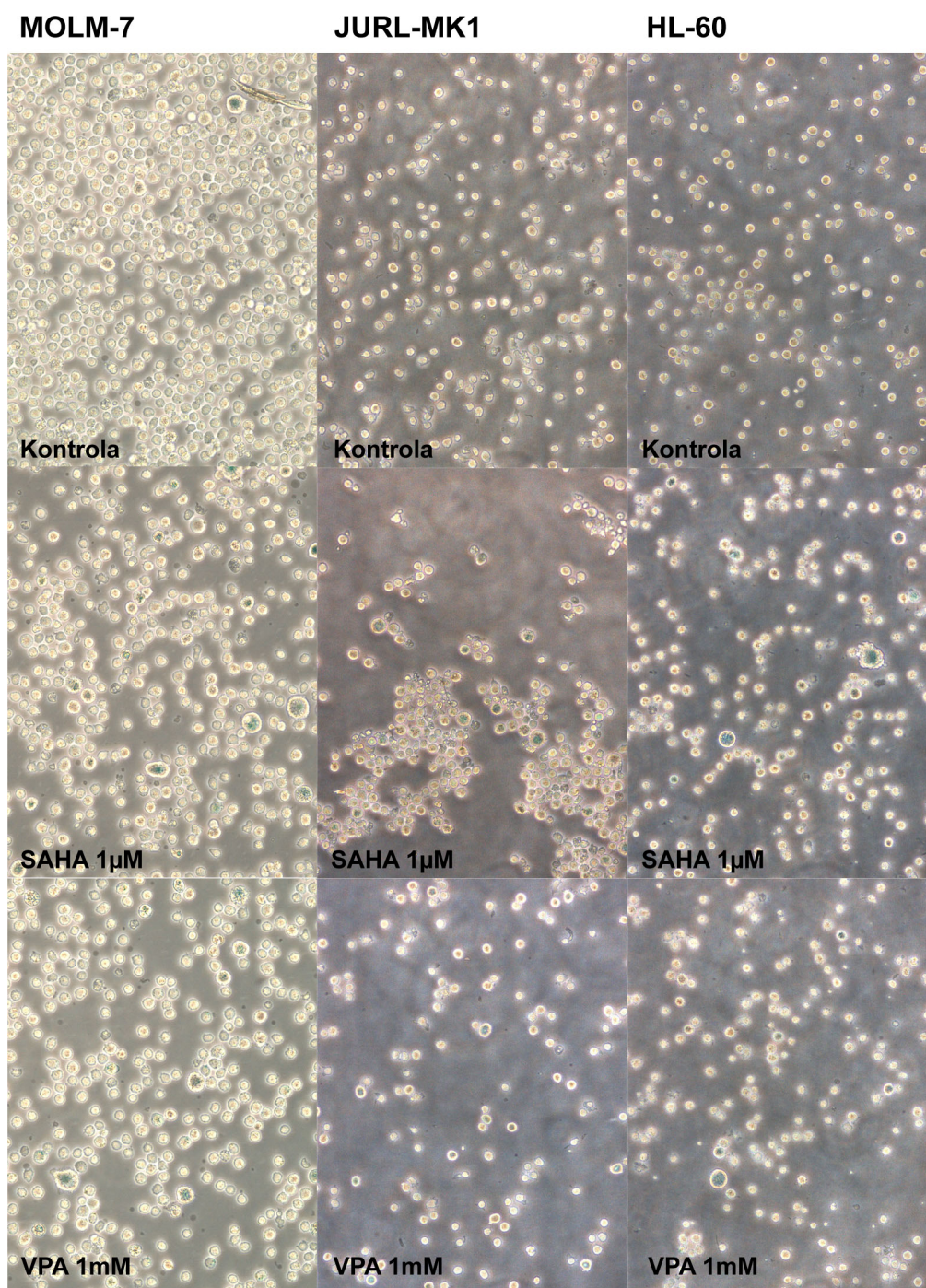
Obr. 33: Analýza buněčného cyklu leukemické linie HL-60 pomocí průtokové cytometrie. Buňky HL-60 byly inkubovány s inhibitory HDAC v koncentracích 0,5-10  $\mu$ M SAHA a 0,5-10 mM VPA po dobu 24, 48 a 72 hodin. **(A)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v G1/G0 fázi buněčného cyklu. **(B)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.



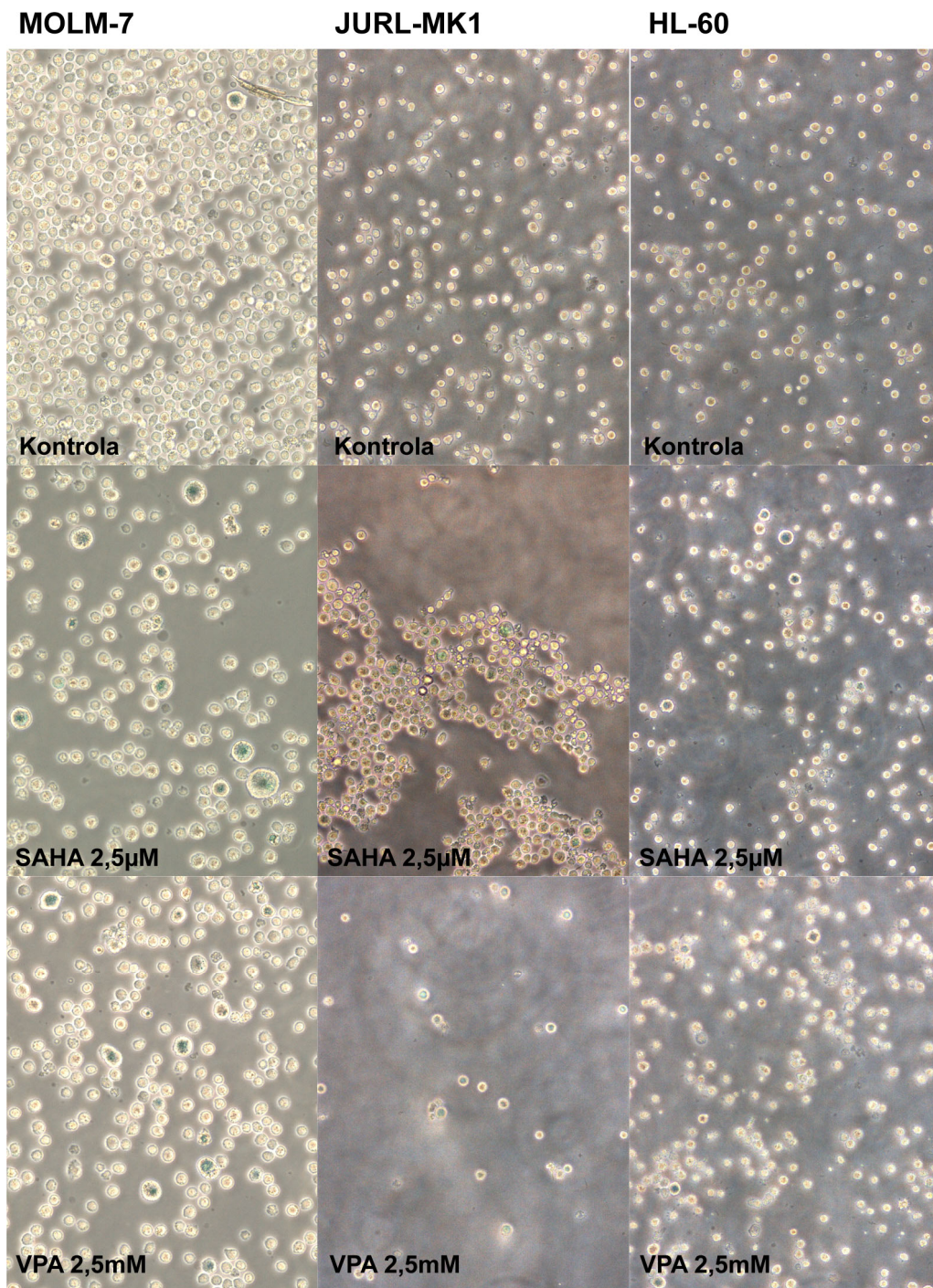
Obr. 34: Analýza buněčného cyklu leukemické linie MOLM-7 pomocí průtokové cytometrie. Buňky MOLM-7 byly inkubovány s inhibitory HDAC v koncentracích 0,5-10 $\mu$ M SAHA a 0,5-10mM VPA po dobu 24, 48 a 72 hodin. **(A)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v G1/G0 fázi buněčného cyklu. **(B)** Data udávají procentuální zastoupení buněk v subG1 fázi buněčného cyklu. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří experimentů.

#### **7.2.4 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  $\beta$ -galaktosidázy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -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  $\mu$ M 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- $\beta$ -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  $\mu$ M pro SAHA a 1 a 2,5 mM pro VPA bylo u těchto buněk detekováno modré zbarvení, prokazující zvýšenou aktivitu SA- $\beta$ -gal. U kontrolních buněk nebyl pozorován vývoj modrého zbarvení (obr. 35, 36). Avšak ve vyšších koncentracích SAHA i VPA indukovaly buněčnou smrt (obr. 37). Nejméně citlivá k indukci senescence byla linie HL-60 (obr. 38).

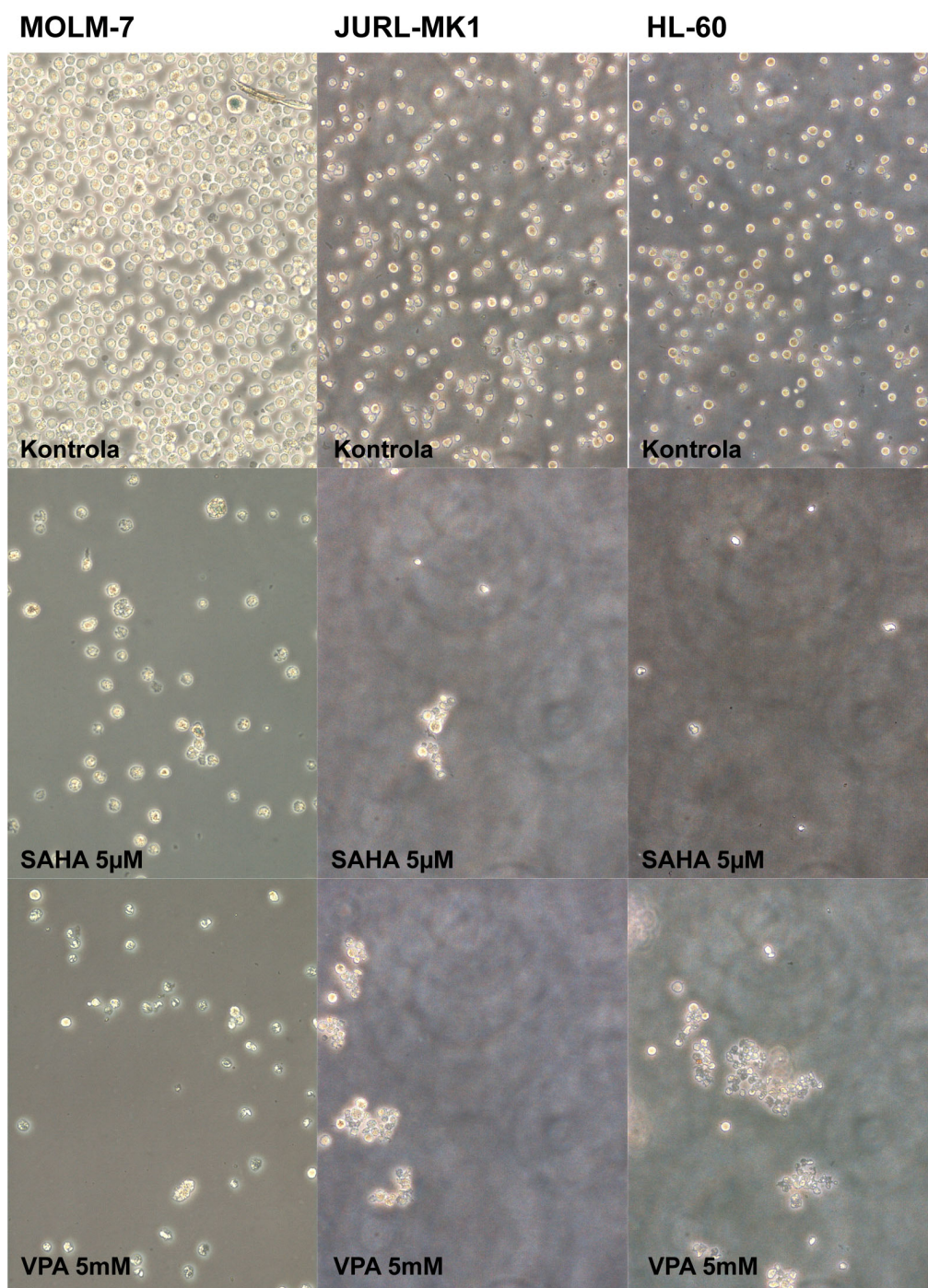


Obr. 35: Indukce senescence působením inhibitorů HDAC u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Po 5-ti denní inkubaci buněk s inhibitory HDAC (1  $\mu$ M SAHA a 1 mM VPA) byly buňky zafixovány a inkubovány s X-gal (1 mg/ml) rozpuštěné v roztoku obsahujícím 40 mM kyselinu citrónovou pH 6,5; 5 mM hexakvanoželezitan draselný; 5 mM hexakvanoželeznatan draselný; 150 mM NaCl a 2 mM  $MgCl_2$ . Po 24 hodinách se sledoval vývoj modrého zbarvení (pouze u senescentních buněk) pod fázovým mikroskopem (zvětšení 100x). Zobrazeny jsou reprezentativní výsledky jednoho ze tří nezávislých opakování.

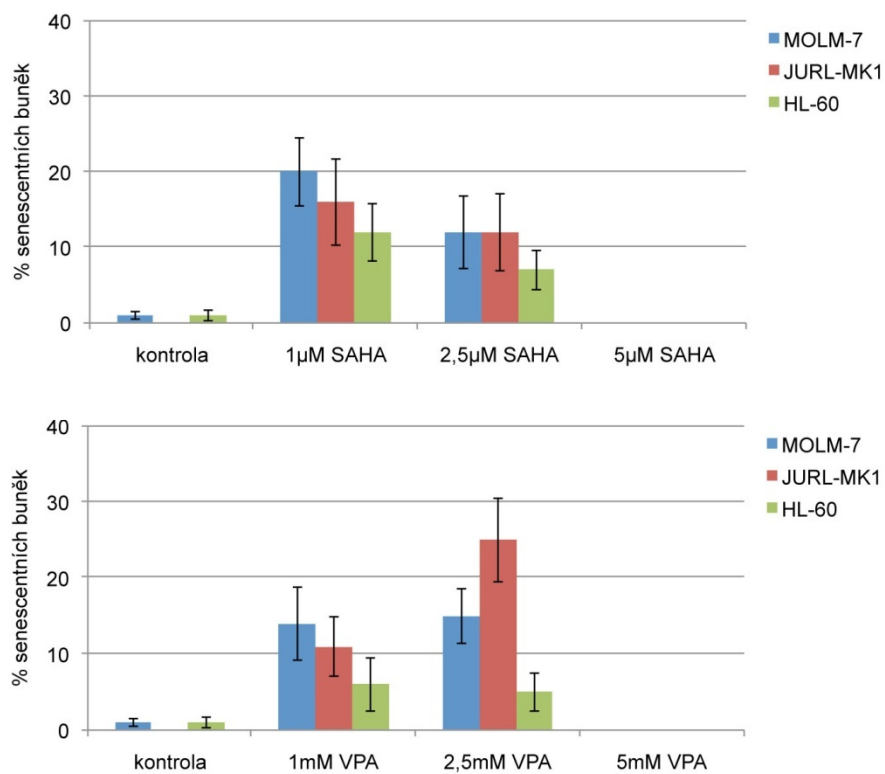


Obr. 36: Indukce senescence působením inhibitorů HDAC u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Po 5-ti denní inkubaci buněk s inhibitory HDAC (2,5 μM SAHA a 2,5 mM VPA) byly buňky zafixovány a inkubovány s X-gal (1 mg/ml) rozpuštěné v roztoku obsahujícím 40 mM kyselinu citrónovou pH 6,5; 5 mM hexakvanoželezitan draselný; 5 mM hexakvanoželeznatan draselný; 150 mM NaCl a 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Po 24 hodinách se sledoval vývoj modrého zbarvení (pouze u senescentních buněk) pod fázovým mikroskopem (zvětšení 100x). Zobrazeny jsou reprezentativní výsledky jednoho ze tří nezávislých opakování.





Obr. 37: Indukce senescence působením inhibitorů HDAC u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Po 5-ti denní inkubaci buněk s inhibitory HDAC (5  $\mu$ M SAHA a 5 mM VPA) byly buňky zafixovány a inkubovány s X-gal (1 mg/ml) rozpuštěné v roztoku obsahujícím 40 mM kyselinu citrónovou pH 6,5; 5 mM hexakvanoželezitan draselný; 5 mM hexakvanoželezitan draselný; 150 mM NaCl a 2 mM  $MgCl_2$ . Po 24 hodinách se sledoval vývoj modrého zbarvení (pouze u senescentních buněk) pod fázovým mikroskopem (zvětšení 100x). Zobrazeny jsou reprezentativní výsledky jednoho ze tří nezávislých opakování.



Obr. 38: Indukce senescence působením inhibitorů HDAC (1; 2,5 a 5 μM SAHA a 5 mM VPA) u buněk MOLM-7, HL-60 a JURL-MK1. Data udávají procenta senescentních buněk. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze 3 experimentů.

## 8. DISKUZE

### 8.1 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-MS). 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 jejich 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 vliv 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 vliv různých rekombinantních cytokinů (směsi cytokinů: IL-3 + IL-6 + SCF + G-CSF + GM-CSF) nebo interferonů (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  nebo IFN- $\gamma$ ) 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  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  však protilátka vykazovala nespecifický antiproliferativní účinek i na CD34- leukemickou buněčnou linii PS-1 (obr. 19). Stejný účinek byl pozorován i na životnost těchto buněk, což je znázorněno na obr. 20, který ukazuje závislost životnosti buněk na koncentraci protilátky proti CD34. Z těchto výsledků lze odvodit, že monoklonální protilátka proti molekule CD34 by mohla *in vivo* potlačovat proliferativní 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  $\mu\text{g/ml}$ , neboť působením nižších koncentrací (např. 32  $\mu\text{g/ml}$ ) na linii MOLM-9 nedošlo k výrazné indukci apoptózy (<10% apoptických buněk) a k ovlivnění buněčného cyklu (obr. 21). Monoklonální protilátka v koncentraci 61  $\mu\text{g/ml}$  evidentně indukovala apoptózu u leukemických buněčných linií MOLM-9 a JURL-MK1. K vyššímu nárůstu procenta apoptických buněk však docházelo až po 72 hodinách působení protilátky (obr. 23), 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 (obr. 24). 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 (obr. 23, 24). 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 preurzorů 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- $\alpha$  a INF- $\beta$  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- $\alpha$  a INF- $\beta$  potlačují růst i leukemické buněčné linie MOLM-9 (obr. 25). Benjamin et al. (2006) ve své práci popisuje antiproliferativní účinek IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  na sérii leukemických buněčných linií odvozených od AML. IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  inhiboval proliferaci buněk linie MOLM-9 účinněji než IFN- $\gamma$  (obr. 25D). Protilátka proti CD34 v různých koncentracích (16, 32 a 61  $\mu\text{g/ml}$ ) potencovala antiproliferativní účinek interferonů u linie MOLM-9 (obr. 25).

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 diferenciaci kmenových a progenitorových buněk. Fackle et al., 1995 zjistili, že posílení exprese molekuly CD34 brání v diferenciaci myší myeloblastické buněčné linie M1. Proto jsem zvolila jako jeden ze znaků stupně diferenciaci resp. nezralosti leukemických buněk sledování exprese molekuly CD34. Jako model pro indukci diferenciaci 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  $\text{INF-}\gamma$  nebo v kombinaci protilátky proti CD34 a směsí cytokinů. Indukci diferenciaci jsem sledovala analýzou exprese některých povrchových molekul (CD34, CD14, CD38, HLA-DR) pomocí průtokové cytometrie (po 72 hodinách) a morfologickou analýzou cytopspinových 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 cytopspinových preparátů nebyl objeven žádný znak diferenciaci. Dále jsem zjistila, že  $\text{INF-}\gamma$  po 72 hodinách působení snižuje expresi antigenu CD34 (tab. 3), což by mohlo být vysvětleno schopností  $\text{INF-}\gamma$  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 rozbořením cytopspinových preparátů nebyl objeven žádný konkrétní parametr diferenciaci do myeloidní nebo lymfoidní řady.

Ačkoliv přesný mechanismus 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. (viz příloha A)**

## **8.2 INHIBITORY DEACETYLÁZ HISTONŮ, SAHA A VPA**

Epigenetické mechanismy, 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 jevílo, 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. doxorubicinem, 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 vliv různých dávek inhibitorů HDAC, SAHA (0,5-10  $\mu$ M) 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 efekt 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 (obr. 28). Nejsilnější inhibiční efekt vykazovaly dávky v rozmezí 2,5-10  $\mu$ M SAHA a 2,5-10 mM VPA. Hodnoty IC<sub>50</sub> (koncentrace způsobující 50% inhibici proliferace) se u testovaných leukemických linií pohybovaly v rozmezí 0,2-3,8  $\mu$ M pro SAHA a 0,3-1,6 mM pro VPA během 72 hodinové inkubace (tab. 4). 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 (obr. 30). 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 (obr. 34). Na rozdíl od buněk MOLM-7, buňky JURL-MK1 i HL-60 vstupují do apoptózy pomaleji, což dokazuje i nižší počet TUNEL-pozitivních buněk (obr. 30). Pravděpodobně se u nich však spouští i jiné formy buněčné smrti (nekróza, autofágie), jak je znázorněno na obr. 29, kde můžeme pozorovat vyšší frakci 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 proapoptický účinek vykazovaly dávky 5 a 10 $\mu$ M pro SAHA a 5 a 10mM pro VPA.

Také byla testována aktivita  $\beta$ -galaktozidázy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -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, narozdíl od apoptózy, která byla patrná již po 48 hodinách působení inhibitorů deacetyláz histonů (obr. 30). 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 větší poškození DNA vyvolávají apoptotickou odpověď (Schwarze 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 (obr. 35, 36, 37). Toto zjištění by mohlo v podstatě přispět ke zlepšení protinádorové strategie a redukovat nežádoucí vedlejší efekty u mnoha léčebných protokolů a procedur (Schmitt, 2007; Lechel et al., 2005).

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. (viz příloha B)**

## 9. ZÁVĚR

### 9.1 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  $\mu\text{g/ml}$  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 leukémií v blastickém zvratu
- kombinované ošetření s  $\text{INF-}\gamma$  nebo směsí několika rekombinantních cytokinů neindukuje diferenciaci buněčné linie MOLM-9

## 9.2 EPIGENETICKÉ INHIBITORY HDAC - SAHA a VPA

- mechanismus 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

## 10. LITERATURA

- Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Raguz S, Gil J. *Cell Cycle*. 2008. 7: 2956-959.
- Adam Z, Pour L, Vorlicek J, Hajek R, Koptikova J, Smardova J. *Remedia*. 2005. 15: 390-404.
- Adams GP, Weiner LM, *Nature Biotechnol*. 2005. 23: 1147-157.
- Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK. DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol*. 2007. 20: 711-21
- Ahn MY, Jung JH, Na YJ, Kim HS. *Gynecol Oncol*. 2008. 108: 27-33.
- Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD. *Mol Pharmacol*. 2005. 68: 917-32.
- 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.
- Alon R, Rosen S. *Nature Immunol*. 2007. 8: 339-41.
- Ancrile B, Lim KH, Counter CM. *Genes Dev*. 2007. 21: 1714-719.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. *Annu Rev Immunol*. 2007. 25: 21-50.
- Ashkenazi A, Dixit VM. *Curr Opin Cell Biol*. 1999. 11: 255-60.
- Bakkenist CJ, Drissi R, Wu J, Kastan MB, Dome JS. *Cancer Res*. 2004. 64: 3748-752.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. *Nature*. 2003. 421: 499-506.
- Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA. *Science* 1993. 262: 436-38.
- Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10: 345-52.
- Bedi A, Sharkis SJ. *Curr Opin Hematol*. 1995. 2: 12-21
- Belada D. *Remedia*. 2008, 6: 416-23.
- 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.

- Bernstein ID. Clin. Lymphoma. 2002. 2: 9-11.
- Bernstein ID. Leukemia. 2000.14: 474-75.
- Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JC, Murdoch B, Dick JE. J Exp Med. 1997. 186: 619-24.
- Bird A. Genes Dev. 2002. 16: 6-21.
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJA. Nat Rev Cancer. 2005. 5:899-904.
- Blasco MA. Nat Rev Genet. 2005. 6: 611-22.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Nat Rev Drug Discov. 2006. 5: 769-84
- Bonnet D, Dick JE. Nat Med. 1997.3: 730-37.
- Borden EC. J Interferon Cytokine Res. 2005, 25: 511-527.
- Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Mönch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC, Hansen KH, Helin K. Genes Dev. 2007.21: 525-30.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Nature. 2005. 436: 660-65.
- Braig M, Schmitt CA. Cancer Res. 2006. 66: 2881-884.
- Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. Int Immunol. 1991, 3: 175-84.
- Bullock TE, Wen B, Marley SB, Gordon MY. Stem Cells. 2007, 25: 844-51.
- Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Acta Oncol. 2009. 48:811-21.
- Butcher EC, Picker LJ. Science 1996. 272: 60-6.
- Byrd JC, Murphy T, Howard RS, Lucas MS, Goodrich A, Park K, Pearson M, Waselenko JK, Ling G, Grever MR, Grillo-Lopez AJ, Rosenberg J, Kunkel L, Flinn IW. J Clin Oncol. 2001. 19: 2153-164.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007. 8: 729-40.
- Campisi J. Trends Cell Biol. 2001. 11: 27-31.
- Campisi. J. Cell. 2005. 120: 513-22.
- Campoli M, Ferris R, Ferrone S, Wang X. Clin Cancer Res. 2010. 16: 11-20.

- Carlo Stella C, Cazzola M, De Fabritiis P. *Haematologica*. 1995. 80: 367-87.
- Carter P. *Nature*. 2006, 6: 343.
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe D. *Anti-Cancer Drugs*. 1997. 8: 958-63
- Civin CL, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. *J Immunol*. 1984. 133: 157-65.
- Classon M, Harlow E. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2: 910-17.
- Claus R, Lubbert M. *Oncogene*. 2003. 22: 6489-496.
- Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Choudhury A, Batra SK. *Q J Nucl Med*. 1998. 42: 225-41.
- Collado M, Serrano M. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6: 472-76.
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. *PLoS Biol*. 2008. 6: 2853-868.
- Cory S, Adams JM. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2: 647-56.
- Cozzio A, Passegué E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. *Genes Dev*. 2003. 17:3029-35.
- Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. *Biochem J*. 2003. 375: 263-74.
- Cristofalo VJ, Phillips PD, Sorger T, Gerhard G. *J Gerontol*. 1989.44: 55-62.
- Crowe JS, Hall VS, Smith MA, Cooper HJ, Tite JP. *Clin Exp Immunol*. 1992. 87: 105-10.
- Cwiertka K, Trojanec R, Spackova K, Hajduch M. *Klin Farmakol Farm*. 2004. 18: 165-70.
- Cyster JG, Shotton DM, Williams AF. *EMBO J*. 1991. 10: 893-902.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. *Nature*. 2003. 426: 194-98.
- d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. *Genes Dev*. 2004. 18:1781-799.
- Dalle S, Thieblemont C, Thomas L, Dumontet C. *Anti-Cancer Agent Med Chem*. 2008. 8: 523-32.

- Davie JR. *Curr Opin Genet Dev.* 1998. 2: 173-78.
- De Lange T. *Genes Dev.* 2005. 19: 2100-110.
- Deckert J, Struhl K. *Mol Cell Biol.* 2001. 21: 2726-235.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. *Genes Dev.* 1994. 8: 2540-551.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. *Nature.* 2006. 444: 638-42.
- Di Micco R, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. *Trends Cell Biol.* 2007. 17: 529-36.
- 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.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. *Mol Cancer Res.* 2007. 5: 981-89.
- Dokmanovic M, Marks PA. *J Cell Biochem.* 2005. 96: 293-304.
- Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005. 45: 495-528.
- Dunkelberger JR, Song WC. *Cell Res.* 2010. 20: 34-50.
- Ebbinghaus C, Ronca R, Kaspar M, Grabulovski D, Berndt A, Kosmehl H. *Int J Cancer* 2005. 116: 304-13.
- Edwards A, Li J, Atadja P, Bhalla K, Haura EB. *Mol Cancer Ther.* 2007. 6: 2515-524.
- Ehrlich P. New York: J Wiley & Sons. 1906.
- Ellis LM, Hicklin DJ. *Nature Rev Cancer.* 2008, 8: 579-91.
- Enever C, Batuwangala T, Plummer Ch, Sepp A. *Curr Opin Biotech.* 2009. 20: 405-411.
- European Medicines Agency (EMA). Londýn 24. ledna 2008. Dok. ref. č. EMEA/186667/2008.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/000705/WC500070678.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000705/WC500070678.pdf)
- Ewald J, Desotelle J, Almassi N, Jarrard D. *Br J Cancer.* 2008. 98:1244-249.

- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. *J Natl Cancer Inst.* 2010. 102: 1536-546.
- Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. *Blood.* 1995. 85: 3040-47.
- Fadeel B. *Cell Mol Life Sci.* 2003. 60: 2575-585.
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39: 1462-475.
- Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. *Genes Dev.* 2000. 14: 2015-27.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D. *Blood.* 1990. 75: 2417-426.
- Finnin MS, Donigian JR, Pavletich NP. *Nat Struct Biol.* 2001. 8: 621-25.
- Fischer N, Leger O. *Pathobiology.* 2007. 74: 3-14.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. *Nat Genet.* 2005. 37: 391-400.
- Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX.. *Cancer Cell.* 2004. 5: 317-28.
- Funk WD, Wang CK, Shelton DN, Harley CB, Pagon GD, Hoeffler WK. *Exp Cell Res.* 2000. 258: 270-78.
- Gadhoum Z, Leibovitch MP, Qi J, Dumenil D, Durand L, Leibovitch S, Smadja-Joffe F. *Blood.* 2004. 103: 1059-68.
- Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, Reilly JF, Loboda A, Nebozhyn M, Fantin VR, Richon VM, Scheithauer B, Giannini C, Flynn PJ, Moore DF Jr, Zwiebel J, Buckner JC. *J Clin Oncol.* 2009. 27: 2052-58.
- Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris G, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM. *Blood.* 2008. 111: 1060-66.
- Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, Shiu V. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005. 46: 726-733.



- Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rassool FV. *Mol Cancer Res.* 2006. 4: 563-73.
- Gil J, Peters G. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. 7: 667-77.
- Glozak MA, Seto E. *Oncogene* 2007. 26: 5420–432.
- Goldstein. S. *Science.* 1990. 249:1129-133.
- Gordon MY, Marley SB, Davidson RJ, Grand FH, Lewis JL, Nguyen DX, Lloyd S, Goldman JM. *Hematol J.* 2000. 1: 77-86.
- Gray SG, Ekström TJ. *Exp Cell Res.* 2001. 262: 75-83.
- Greaves MF, Brown J, Molgaard HV. *Leukemia.* 1992. 6: 31-6.
- Gregory PD, Wagner K, Hörz W. *Exp Cell Res.* 2001. 265: 195-202.
- Greider CW, Blackburn EH. *Cell.* 1985. 43: 405-13.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. *Nature.* 1993. 363: 446-48.
- Hampel B, Wagner M, Teis D, Zwerschke W, Huber LA, Jansen-Dürr P. *Aging Cell.* 2005. 4: 325-30.
- Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S. *Scand J Immunol.* 2000. 51: 634-41.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. *Nature.* 1990. 345: 458-60.
- Harpaz Y, Chothia C. *J Mol Biol.* 1994. 238: 528-39.
- Haupt Y. *Cell Cycle.* 2003. 2: 113-15.
- Hayflick L, Moorhead PS. *Exp Cell Res.* 1961. 25: 585-621.
- Hayflick L. *Exp Cell Res.* 1965. 37: 614-36.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. *Cell.* 2001. 107: 67-77.
- Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. *Science.* 2006. 311: 1257.
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. *Mol Cell.* 2004. 14: 501-13.
- Holliger P, Hudson PJ. *Nat Biotechnol.* 2005. 23: 1126-316.
- Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. *Cancer.* 2007. 110: 1911-928.
- Horák P. 2010. *FarmiNews.* 3: 17

- Hornsby PJ. *Pflugers Arch.* 2010. 459: 291-99.
- Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, Krensky AM, Weissman IL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104: 11008-1013.
- Hossini AM, Geilen CC, Fecker LF, Daniel PT, Eberle J. *Oncogene.* 2006. 25: 2160-169.
- Hudis CA. *N Engl J Med.* 2007. 357: 39-51.
- Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, Coulombel L. *Blood.* 1995. 86: 4474-480.
- Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. *Brit J Pharm.* 2009. 157: 220-33.
- 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.
- Chang CH, Sharkey RM, Rossi EA, Karacay H, McBride W, Hansen HJ, Chatal JF, Barbet J, Goldenberg DM. *Mol Cancer Ther.* 2002. 1: 553-63.
- Charrad RS, Li Y, Delpech B, Balitrand N, Clay D, Jasmin C, Chomienne C, Smadja-Joffe F. *Nat Med.* 1999. 5: 669-76.
- Chen JS, Lan K, Hung MC. *Drug Resist Updat.* 2003. 6: 129-36.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. *Nature.* 2005. 436: 725-30.
- Cheng D, Yadav N, King RW, Swanson MS, Weinstein EJ, Bedford MT. *J Biol Chem.* 2004. 279: 23892-3899.
- Cheng J, Baumhueter s, Cacalano G. *Blood.* 1996. 87: 479-90.
- Cheson BD. *J Clin Oncol.* 2010. 21:3525-530.
- Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. *Curr Opin Cell Biol.* 2000. 12: 326-33.
- Chiantore MV, Vannucchi S, Mangino G, Percario ZA, Affabris E, Fiorucci G, Romeo G. *Curr Med Chem.* 2009. 16: 287-300.
- Choi J, Shendrik I, Peacocke M, Peehl D, Buttyan R, Ikeguchi EF, Katz AE, Benson MC. *Urology.* 2000. 56: 160-66.

- Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, Altucci L, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. *Nat Med.* 2005. 11: 71-6.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. *Methods Mol Biol.* 2007. 371: 21-31.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. *Nat Med.* 2006. 12: 446-51.
- Jacobs JJ, De Lange T. *Curr Biol.* 2004. 14: 2302-308.
- Jahagindar BN, Miller JS, Shet A, Vertaille CM. *Exp Hematol.* 2001. 29: 543-56.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001. 293:1074-80.
- Jerne NK. *Ann. Immunol.* 1974. 125: 373-89.
- Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. *Nat Med.* 2006. 12:1167-174.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. *N Engl J Med.* 2006. 355:1253-261.
- Kahlem P, Dörken B, Schmitt CA. *J Clin Invest.* 2004. 113: 169-74.
- Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. *Cell Death Differ.* 2002. 9: 1115-125.
- Karagiannis TC, Kn H, El-Osta A. *Epigenetics.* 2006. 1: 131-7.
- Kaspar M, Trachsel E, Neri D. *Cancer Res.* 2007. 67: 4940-948.
- Katz F, Tindle RW, Sutherland DR, Greaves MF. *Leuk Res.* 1985. 9: 191-98.
- Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, Rai KR. *Blood.* 2002. 99: 3554-561.
- Kelly WK, Marks PA. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005. 2: 150-57
- Kim R, *Lancet Oncol.* 2009. 10: 1140-141.
- Klener P., Klener P. jr. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. 2010. 232 s. ISBN 978-80-247-2808-7
- Klener. *Onkológia*, 2007, 2: 363–66
- Kohler G, Milstein C. *Nature.* 1975. 256: 495-97.
- Kouraklis G, Theocharis S. 2006. 15: 489-94.
- Kovář J. vyd. Karolinum: Univerzita Karlova v Praze. 1999, 74 s. ISBN 80-7184-804-2

- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. *Blood*. 1996. 87: 1-13.
- Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. *Nat Med*. 2006. 12: 1175-180.
- Krtolica A, Campisi J. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002. 34: 1401-414.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. *Cell*. 2008. 133: 1019-31.
- Kuilman T, Peeper DS. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9: 81-94.
- Lafon-Hughes L, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L, Martínez-López W. *Mutat Res*. 2008. 658: 191-214.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenameele P. *Cell Death Differ*. 2007. 14: 44-55.
- Lane AA, Chabner BA. *J Clin Oncol*. 2009. 27: 5459-468.
- Lanza F, Healy L, Sutherland DR. *J Biol Regl Homeost Agents*. 2001. 15: 1-13.
- Lanza F, Moretti S, Papa s, Malavasi F, Castoldi GL. *Haematologica*. 1994. 79: 374-86.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *Nature*. 1994. 367: 645-48.
- Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*. 1992. 258: 964-69.
- 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.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. *J Transl Med*. 2006. 4:48.
- Li LC, Carroll PR, Dahiya R. *J Natl Cancer Inst*. 2005. 97: 103-15.
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. *Cancer Cell*. 2005. 7: 301-11.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. *Genes Dev*. 1998. 12: 3008-19.
- Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. *Med Res Rev*. 2006. 26: 397-413.

- Linke R, Klein A, Seimetz D. *MAbs*. 2010. 2.
- Lo AS, Zhu Q, Marasco WA. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2008, 181: 343-73.
- Lonberg N. *Nat Biotechnol*. 2005. 23: 1117-125.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. *Nature*. 2004. 432: 307-15.
- Lowe SW, Sherr CJ. *Curr Opin Genet Dev*. 2003.13: 77-83.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. *Nature*. 1997. 389: 251-60.
- Lundin J, Kimby E, Bjorkholm M, Broliden PA, Celsing F, Hjalmar V, Mollgard L, Rebello P, Hale G, Waldmann H, Mellstedt H, Osterborg A, *Blood* 2002, 100: 768-773.
- Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB. *Drugs*. 2009. 69: 1911-934.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. *Med Res Rev*. 2005. 25: 261-309.
- Majdic O, Stockl J, Pickl WF. *Blood*. 1994. 83. 1226-234.
- Majumder PK, Grisanzio C, O'Connell F, Barry M, Brito JM, Xu Q, Guney I, Berger R, Herman P, Bikoff R, Fedele G, Baek WK, Wang S, Ellwood-Yen K, Wu H, Sawyers CL, Signoretti S, Hahn WC, Loda M, Sellers WR. *Cancer Cell*. 2008. 14: 146-55.
- Manfredini R, Zini R, Salati S. *Stem Cell*. 2005. 23:496-506.
- Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. *Nature*. 2001. 1: 194-202
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. *Adv Cancer Res*. 2004. 91: 137-68.
- Marks PA, Xu WS. *J Cell Biochem*. 2009. 107: 600-8.
- Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. *Exp Cell Res*. 2000. 256: 291-99.
- Masopust J. *Labor Aktuell*. 2008. 2: 4-9
- Massagué J. *Cell*. 2008. 134: 215-30.
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. *Cell*. 2003. 114: 241-53.
- Matsuda F, Honjo T, *Adv Immunol*. 1996, 62: 1-29.

- Matsumura T, Zerrudo Z, Hayflick L. *J Gerontol.* 1979. 34: 328-34.
- Mayer O. *Folia Gastroenterol Hepatol*, 2007. 5: 31-4.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. 1990. *Nature.* 348: 552-54.
- Mehnert JM, Kelly WK. *Cancer J.* 2007. 13: 23-9.
- Meier P, Finch A, Evan G. *Nature.* 2000. 407: 796-801.
- Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. *Cancer Res.* 2003. 63: 5414-419.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. *Nature.* 2005. 436: 720-24.
- Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. *J Med Chem.* 2003. 46: 5097-116.
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. *J Cell Mol Med.* 2007. 11:981-1011.
- Minucci S, Pelicci PG. *Nat Rev Cancer.* 2006. 6: 38-51.
- Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, Bertrand FE, Bäsecke J, Libra M, Nicoletti F, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Cervello M, Martelli AM, McCubrey JA. *Leukemia.* 2009. 23:25-42.
- Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. *Leukemia.* 1989. 3: 773-76.
- Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK. *Exp Cell Res.* 2004. 295: 525-38.
- Muthná, D., Řezáčová, M., Stoklasová, A., Vávrová. J. *Postgraduální medicína.* 2009. 11: 254-60.
- Nagao M, Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N, Kanehiro H, Aomatsu Y, Ko S, Yagita H, Yamada T, Okumura K, Nakano H. Nagao M, Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N, Kanehiro H, Aomatsu Y, Ko S, Yagita H, Yamada T, Okumura K, Nakano H. *Hepatology.* 1999. 30:413-21.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. *Cell.* 2003. 113: 703-16.
- Neuberger MS, Willieams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH. *Nature.* 1985. 314: 268-70.
- Nielsen JS, McNagny KM. *Microcirculation.* 2009. 16: 487-96.
- Nieri P, Donadio E, Rossi S, Adinolfi B, Podesta A. *Curr Med Chem.* 2009. 16: 753-79.

- Nimmerjahn F, Ravetch JV. *Adv Immunol.* 2007. 96: 179-204.
- Normansell DE. *Diagn Clin Immunol.* 1985. 5: 115-28.
- O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich, EJ, Cortes J, Lerner S, Keating MJ. *J Clin Oncol.* 2001. 19: 2165-170.
- Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH. *Mol Cell Biol.* 1996. 16: 5210-218.
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E. *Nature.* 2001. 409: 1067-70.
- Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Røste LS, Taubøll E. *Mol Cell Endocrinol.* 2004. 213: 173-79.
- Ormerod MG. DeNovo Software, 2008. On-line verze (<http://flowbook.denovosoftware.com/>)
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. *Biochim Biophys Acta.* 2002. 1602:73-87.
- Otulakowski GL, Shewen PE, Udoh AE, Mellors A, Wilkie BN. *Infect Immun.* 1991. 42: 64.
- Paris M, Porcelloni M, Binaschi M, Fattori D. *J Med Chem.* 2008. 51: 1505-529.
- Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. *J Cell Sci.* 2005. 118: 485-96.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. *Nat Cell Biol.* 2003. 5: 741-47.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. *Nat Cell Biol.* 2003. 5: 741-7.
- Passequé E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100:11842-1849.
- Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. *Cancer Res.* 1999. 59: 4185-189.
- Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S. *Nature* 2000. 406: 207-10.
- Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. 102: 3697-702.
- Pepper C, Bentley P, Hoy T. *Br J Haematol.* 1996. 95: 513-17.

- Piekarz RL, Robey RW, Zhan Z, Kayastha G, Sayah A, Abdeldaim AH, Torrico S, Bates SE. *Blood*. 2004. 12: 4636-643.
- Piekarz RL, Tucker E, Figg WD, Chan KK, Goldspiel B, Fojo AT, Balcerzak SP, Bates SE. *Clin Cancer Res*. 2002. 8: 718-28
- Pirofski L, Casadevall A, Rodriguez L, Zuckier LS, Scharff MD. *J Clin Immunol*. 1990. 6: 5-14
- Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. *Oncogene*. 2003. 22: 2805-811.
- Reichert JM. *MAbs*. 2010. 2: 84-100.
- Remold-O'Donnell E, Rosen FS. *Immunodeficiency Rev*. 1990. 2: 151.
- Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. *Cell Signal*. 2009. 21: 378-83.
- Robinson MK, Shaller C, Garmestani K, Plascjak PS, Hodge KM, Yuan QA. *Clin Cancer Res*. 2008. 14: 875-82.
- Robles SJ, Adami GR. *Oncogene*. 1998. 16: 1113-123.
- Rosato RR, Maggio SC, Almenara JA, Payne SG, Atadja P, Spiegel S, Dent P, Grant S. *Mol Pharmacol*. 2006. 69: 216-25.
- Rosato, RR., Grant, S. *Cancer Biol Ther*. 2003. 2: 30-7.
- Rosen SD, Hwang ST, Giblin PA, Singer MS. *Biochem Soc Trans*. 1997. 25: 428-33.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. *Annu Rev Biochem*. 2001. 70: 81-120.
- Rowan W, Tite J, Topley P, Brett SJ. *Immunol*. 1998. 95: 427-36.
- Saab R. *ScientificWorldJournal*. 2010. 10: 727-41.
- Sachs L. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93: 4742-749.
- Salati S, Zini R, Bianchi E, Testa A, Mavilio F, Manfredini R, Ferrari S. *Stem Cells*. 2008. 10: 1-20.
- Sandor V, Bakke S, Robey RW, Kang MH, Blagosklonny MV, Bender J, Brooks R, Shen L, Issa JP. *Curr Opin Gastroenterol*. 2002. 18: 68-73.
- Sankey EA, More L, Dhillon AP. *J Pathol*. 1990. 161: 267-71.
- Saretzki G. *Curr Pharm Des*. 2010. 16: 79-100.



- Satterthwaite AB, Burn TS, Le Beau MM, Tenen DG, Genomics. 1992. 12: 788-794.
- Savill J, Fadok V. Nature. 2000. 407: 784-88.
- Scorrano L, Korsmeyer SJ. Biochem Biophys Res Commun. 2003. 304: 437-44.
- Serrador JM, Nieto M, Alonso-Lebrero JL. Blood. 1998. 91: 4632-644.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Cell. 1997. 88: 593-602.
- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. Exp Cell Res. 1991. 196: 33-9.
- Shay JW, Roninson IB. Oncogene. 2004. 23: 2919-933.
- Shay JW, Wright WE. Carcinogenesis. 2005. 26: 867-74.
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Curr Biol. 1999. 9: 939-45.
- Sherr CJ, McCormick F. Cancer Cell. 2002. 2: 103-12.
- Shirahata S, Katakura Y, Teruya K. Methods Cell Biol. 1998. 57:111-45.
- Schlingemann RO, Reiffeld FLR, deWaal RMW. Lab invest. 1990. 62: 690-95.
- 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.
- Schroeder HW, Cavacini L. J Allergy Clin Immunol. 2010. 125: 41-52.
- Schulz L, Tyler J. Mol Cell. 2005. 17: 168-70.
- Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF. Neoplasia. 2005. 7: 816-23.
- Silverman JS, Tamsen A. J Cutan Pathol. 1997. 24: 484-90.
- Smith KA, Nelson PN, Warren P, Astley SJ, Murray PG, Greenman J. J Clin Pathol. 2004. 57: 912-17.
- Sobotková M, Bartůňková J. Remedica. 2008. 18: 356-364.
- Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Gialleonardo V, Cippitelli M, Fionda C, Petrucci MT, Guarini A, Foà R, Santoni A. Blood. 2009. 113: 3503-511.

- Spendlove L, Li L, Potter V, Christiansen D, Loveland BE, Durrant LG. Eur J Immunol. 2000. 30: 2944-953.
- Spotswood HT, Turner BM. An increasingly complex code. J Clin Invest. 2002. 110: 577-82.
- **Starková J, Zápotocký M, Trka J.** Transfuzie Hematol dnes. 2008. 14: 50-4.
- Stein GH, Dulić V. Bioessays. 1995. 17: 537-43.
- 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
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Oncogene. 2001. 20: 2122-133.
- Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, Xie C, Chen J, Deng Q, Yamout M, Dong MQ, Frangou CG, Yates JR 3rd, Wright PE, Han J. Cell. 2007. 128: 295-308.
- Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J, MacLeod CL. Proc Natl Acad Sci USA. 1986. 83: 3825-829.
- Sutherland DR, Keating A. J Hematother. 1992a. 1: 115-29.
- Sutherland DR, Marsh JCW, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A. Exp Hematol. 1992B. 20: 590-99.
- Sutherland DR, Watt SM, Dowden G, Karhi K, Baker MA, Greaves MF, Smart JE. Leukemia. 1988. 2: 793-803.
- Tada J, Omine M, Suda T, Yamaguchi N. Blood. 1999. 93: 3723-735.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. Curr Biol. 2003. 13: 1549-556.
- Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, Marie JP. Leukemia. 2004. 18: 1246-251
- Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lièvre F, Péault B. Blood. 1996. 87: 67-74.
- 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.

- Tenen DG, Satterthwaite AB, Borson R, Simmons DL, Eddy RL, Shows TB. *Cytogenet Cell Genet.* 1990. 53: 55-7.
- Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A. *Cell Mol Life Sci.* 2001. 58: 728-36.
- Tindle RW, Nichols RAB, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD. *Leuk Res.* 1985. 9: 1-10.
- Tomimatsu K, Matsumoto SE, Yamashita M, Teruya K, Katakura Y, Kabayama S, Shirahata S. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009. 73: 1465-469.
- Torres RM, Imboden J, Schroeder HW Jr. *Clinical Immunology: principles and practice.* 3Th ed London: Mosby Elsevier. 2008. 53-77.
- Trimarchi JM, Lees JA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002. 3: 11-20.
- Tsuji-Takayama K. *Hum Cell* 1994. 7: 167-171
- Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102: 673-78.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. *Curr Mol Med.* 2008. 8: 207-20.
- Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, Chen C, Ricker JL, Randolph SS, Schöffski P. *Invest New Drugs.* 2008. 26:483-88.
- Vegh V, Slíva J. *Tempus medicorum-edukafarm medinews (onkologie).* 2009. s: 20-21. <http://www.edukafarm.cz/soubory/medinews/2009-03/angiogeneze.pdf>
- Vergel M, Marin JJ, Estevez P, Carnero A. *J Aging Res.* 2010. 2011: 1-12
- Vincenti F. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation.* 2005. 16: 506-13.
- Voelter-Mahlknecht S, Ho AD, Mahlkecht U. *Int J Mol Med.* 2005. 16: 589-98.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. *J Clin Oncol.* 2002. 20: 719-26.
- Vousden KH, Prives C. *Cell.* 2009. 137: 413-31.
- Wagner HN Jr, Wiseman GA, Marcus CS, Nabi HA, Nagle CE, Fink-Bennett DM, Lamonica DM, Conti PS. *J Nucl Med.* 2002. 43: 267-72.

- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. *Cell*. 2008. 132: 363-74.
- Ward CJ, Crocker J, Chan SJ, Stockley RA, Burnett D. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. 167: 659-64.
- Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJ, Katz FE, Healy LE, Altass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R. *Leukemia*. 1987. 1: 417-26.
- Weigert O, Illidge T, Hiddemann W, Dreyling M. *Cancer*. 2006. 107: 686-95.
- Weiner LM, Surana R, Wang S. *Nature Rev Immunol*. 2010. 10: 317-27.
- Whitesell L, Lindquist SL. *Nat Rev Cancer*. 2005. 5: 761-72.
- Wierda W, O'Brien SM, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, Do KA, Cortes J, Koller C, Beran M, Ferrajoli A, Giles F, Lemer S, Albitar M, Kantarjian H, Keating M. *J Clin Oncol*. 2005. 23: 4070-78.
- Wildová M, Rumlová M. *Chem Listy*. 2008. 102: 28-34
- Williams AF, Barclay AN. *Annu Rev Immunol*. 1988. 6: 381-405.
- Wiseman GA, Gordon LI, Multani PS, Witzig TE, Spies S, Barlett NL, Schilder RJ, Murray JL, Saleh M, Allen RS, Grillo-Lopez AJ, White CA. *Blood*. 2002. 99: 4336-342.
- Witzig TE, Flinn IW, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmaouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Mutani P, White CA. *J Clin Oncol*. 2002. 20: 2453-463.
- Wolffe AP, Hayes JJ. *Nucleic Acids Res* 1999. 27:711-20.
- Wright WE, Shay JW. *Nat Biotechnol*. 2002. 20: 682-88.
- Wu Y, Guo E, Yu J, Xie Q. *Am J Clin Oncol*. 2008. 31: 79-83.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. *Oncogene*. 2007. 26: 5541-552.
- Xu WS, Perez G, Ngo L, Gui CY, Marks PA. 2005 *Cancer Res* 65: 7832-839.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. *Nature*. 2007. 445: 656-60.
- Yamashita M, Yoshinroi K, Sanetaka S. *Cytotechnology*. 2007. 55: 55-60.

- Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. *Nature*. 1996. 382: 319-24.
- Yang XJ, Seto E. *Oncogene*. 2007. 26: 5310-318.
- Yang YM, Chang JW. *Cancer Invest*. 2008. 26:741-55.
- Yonemura S, Nagatuchi A, Sato N, Tsukita S. *J Cell Biol*. 1993. 120: 437.
- Yoo CB, Jones PA. *Nat Rev Drug Discov*. 2006. 5: 37-50.
- Yoon IK, Kim HK, Kim YK, Song IH, Kim W, Kim S, Baek SH, Kim JH, Kim JR. *Exp Gerontol*. 2004. 39: 1369-378.
- Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, Schrupp DS. *J Natl Cancer Inst*. 2002. 94: 504-13.
- Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. *Front Biosci*. 2005. 10: 853-65.
- Zada AA, Singh SM, Reddy VA, Elsässer A, Meisel A, Haferlach T, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. *Oncogene*. 2003. 22: 2296-308.
- Zhang H, Pan KH, Cohen SN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 3251-256.
- Zipfel PF, Skerka C. *Nature Rev. Immunol*. 2009. 9: 729-40.

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody dependent cell mediated cytotoxicity)
AIF	faktor indukující apoptózu (apoptosis inducing factor)
AML	akutní myeloidní leukémie
CASP	kaspázy (caspases)
CDKi	inhibitory cyklin-dependentních kináz
CDR	hypervariabilní domény (complementarity determining regions)
CD	clusters of differentiation
CML	chronická myeloidní leukémie
CRDs	domény bohaté na cystein (cysteine rich domains)
DD	doména smrti (death domain)
DDR	odpověď na poškození DNA (DNA-damage response)
DISC	smrt indukující signalizační komplex (death inducing signaling complex)
Fab	antigen vázající fragmenty (fragment antigen binding)
FADD	s Fas spojená doména smrti (Fas-associated death domain)
Fc	fragment crystalizable
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
G-CSF	faktor stimulující růst granulocytárních kolonií
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytárních a monocytárních kolonií

HACA	lidské anti-chimerické protilátky (human anti-chimeric antibodies)
HAHA	lidské anti-lidské protilátky (human anti-human antibodies)
HAMA	lidské anti-myší protilátky (human anti-mouse antibodies)
HAT	acetylázy histonů
HDAC	deacetylázy histonů
HDACi	inhibitory deacetyláz histonů
HP1	protein heterochromatin protein 1
HSC	hematopetické kmenové buňky (hematopoietic stem cell)
IAP	inhibitor apoptózy (inhibitor of apoptosis)
IFN- $\alpha$	interferon-alfa
IFN- $\beta$	interferon-beta
IFN- $\gamma$	interferon-gamma
IL-3	interleukin-3
IL-6	interleukin-6
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
LSC	leukemické kmenové buňky (leukemia stem cells)
MAC	membrane attack complex
macroH2A	transkripčně represivní varianta H2A
OIS	senescence indukovaná onkogeny
p16 <sup>INK4a</sup>	cyklin-dependent kinase inhibitor 2A
p21CIP1	cyklin-dependent kinase inhibitor protein 1
pRb	retinoblastoma protein

ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SAHA	suberoylanilid hydroxamové kyseliny
SAHF	senescence-associated heterochromatin foci
SASP	sekreční fenotyp spojený se senescencí (senescence-associated secretome phenotype)
SA-β-gal	β-galaktosidáza spojená se senescencí (senescence-associated β-galaktosidase)
SCF	faktor kmenových buněk (stem cell factor)
scFv	single chain fragment variable
SIPS	stresem-indukovaná předčasná senescence
T-ALL	akutní T-lymfoblastická leukémie
TIS	senescence indukovaná terapií (therapy-induced senescence)
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TUNEL	<u>T</u> dT-mediated d <u>U</u> TP-biotin <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
VPA	kyselina valproová
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-galactoside



## 12. SEZNAM PUBLIKACÍ

- 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: 311-320, IF: 1,247 (viz příloha A)
- 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 (viz příloha B)
- 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 Jan 1;109(1):184-95. IF: 3,285 (viz příloha C)

## Growth inhibitory effect of the antibody to hematopoietic stem cell antigen CD34 in leukemic cell lines\*

K. ELKNEROVÁ, Z. LACINOVÁ, J. SOUČEK, I. MARINOV, P. STÖCKBAUER\*\*

*Department of Cellular Biochemistry, e-mail: petr.stockbauer@uhkt.cz, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague 2, 128 20, Czech Republic*

**Received December 18, 2006**

Growth-inhibitory and proapoptotic effects of the monoclonal antibody to CD34 molecule, clone 4H11, were tested in CD34+ leukemic cell lines (MOLM-9, JURL-MK1, HEL) and CD34- cell lines (PS-1, ML-2 and CTV-1). We have found that the monoclonal antibody to CD34 inhibited the proliferation and induced apoptosis of all CD34+ cell lines. 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 all the cell lines studied. Combinations of anti-CD34 antibody with both type I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) or type II ( $\gamma$ ) interferons did not enhance the effects on the cell growth or inhibition of cellular proliferation of the antibody alone. 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 targeted antibody therapy of acute or chronic myeloid leukemia.

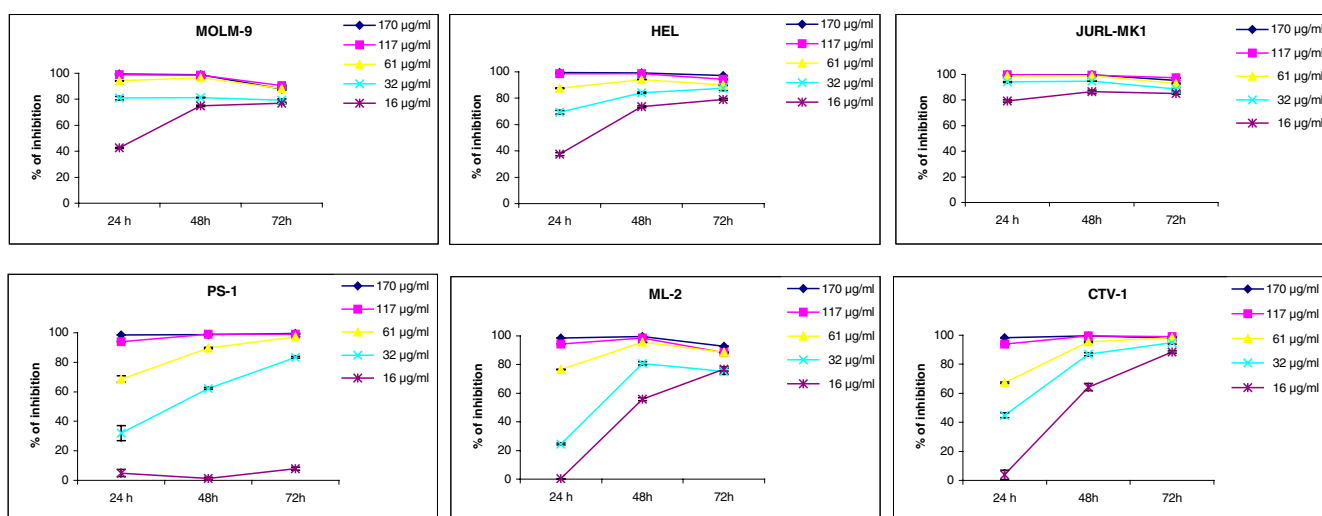
*Key words: monoclonal antibody therapy, CD34 antigen, leukemia cell lines, proliferation, apoptosis, cellular senescence*

The precondition for antibody therapy of tumors is the ability of antibody to react with the specific target molecules expressed on the surface of tumor or leukemic cells and the ability to induce either direct or immune system mediated cell death or inhibit the proliferation by activation of cellular differentiation program or by induction of apoptosis or senescence. Attempts to treat tumors by antiidiotypic antibodies to membrane immunoglobulins in chronic lymphocytic leukemia (CLL) or to T-cell antigens in T-lymphoma were performed already in early eighties of the last century [1, 2, 3]. Unfortunately, there were problems with the immune response of the host to the therapeutic antibody and with the inability of mouse antibodies to activate human complement and the effectors of the immune response. A further problem was the antigenic modulation. Recently, the progress in construction of both chimeric and recombinant antibodies using the phage libraries first enabled the initiation of relevant clinical studies aimed at the targeted therapy of human tumors including leukemias and malig-

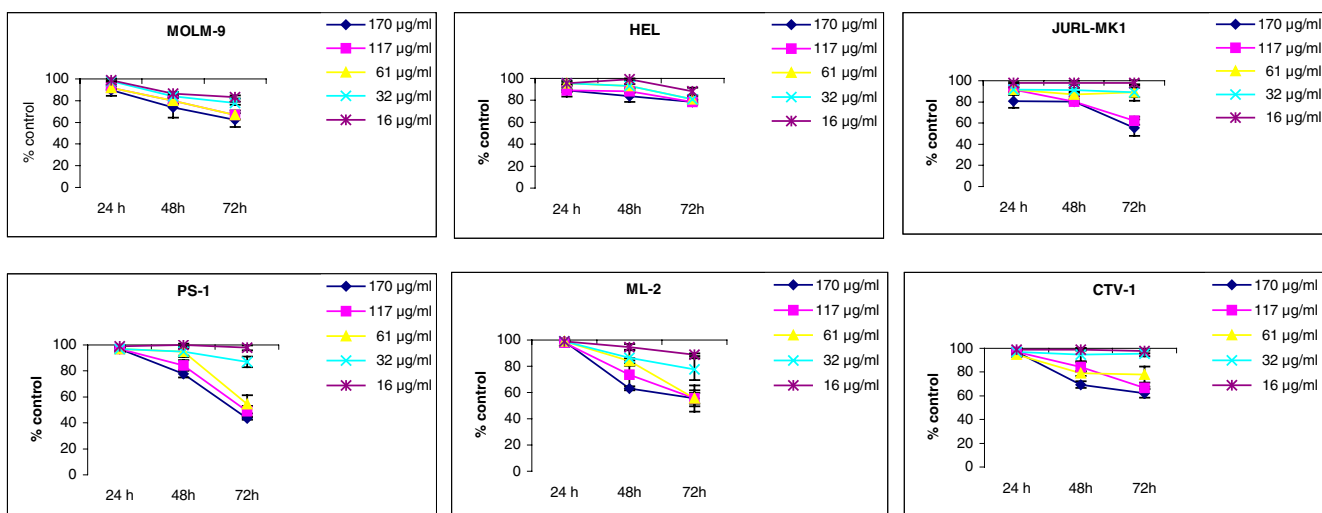
nant lymphomas using of monoclonal antibodies. One of the first antibodies introduced to the clinic of CLL and non-Hodgkin's lymphomas was the chimeric monoclonal antibody to B-cell antigen CD20 rituximab (Mabthera). This antibody consists of mouse Fab part and human Fc part of immunoglobulin IgG, which is able to activate human complement. It selectively kills cells expressing the membrane antigen CD20 by induction of apoptosis, probably by a mechanism of complement mediated cytotoxicity (CDC) or antibody mediated cytotoxicity (ADCC). This antibody is recently used not only in the treatment of malignant lymphomas and CLL of B-cell type, but also for the treatment of autoimmune diseases, e.g. rheumatoid arthritis. Another monoclonal antibody used in the clinic of acute myeloid leukemia (AML) or promyelocytic leukemia (APL) is targeted to the myeloid surface membrane antigen CD33. This antibody is conjugated to anthracyclin cytostatic agent calicheamicin. Treatment of AML by this antibody is however limited. Therefore we concentrated our effort on the possibilities for the development of new therapeutic antibodies targeting leukemic stem cells. One of the candidates of antibody reactive with the leukemic stem cells of some patients with AML and CML is the antibody to the surface

\* This study was supported by grant No. NR 8233-3 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA-MZCR)

\*\* Corresponding author



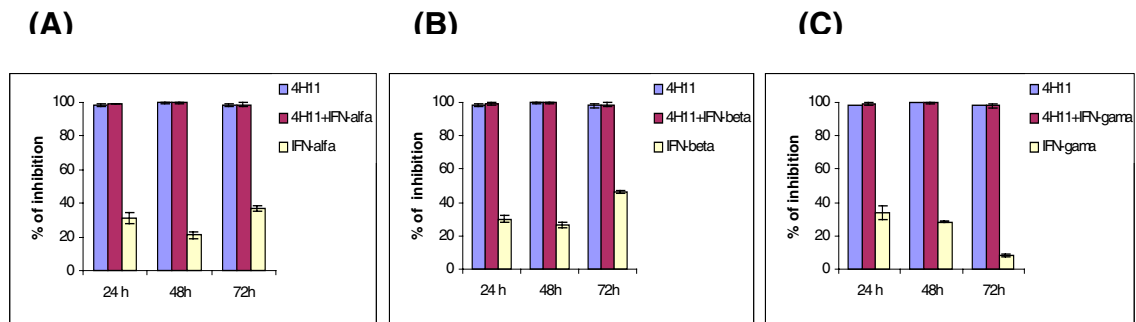
**Figure 1.** Inhibition of proliferation of CD34<sup>+</sup> cell lines (MOLM-9, HEL, JURL-MK1) and CD34<sup>-</sup> cell lines (PS-1, ML-2, CTV-1) after treatment with 4H11 antibody. Cells were incubated in the presence of 16–170 µg/ml of purified immunoglobulin from supernatant of mouse monoclonal antibody to CD34 molecule (clone 4H11) for up to 72 h, and the cell aliquots in quadruplicates were assayed on proliferation with <sup>3</sup>H-thymidine for 4 h. The cells were harvested and the <sup>3</sup>H-thymidine radioactivity was measured in counts/min (cpm). Results are expressed as the mean of three experiments.



**Figure 2.** Viability of CD34<sup>+</sup> cell lines (MOLM-9, HEL, JURL-MK1) and CD34<sup>-</sup> cell lines (PS-1, ML-2, CTV-1) after treatment with 4H11 antibody. Cells were incubated in the presence of purified immunoglobulin from hybridoma cell line 4H11 (anti-CD34) in concentrations of 16–170 µg/ml for up to 72 h. Viability was assessed by Trypan blue exclusion test. Results are expressed as percentage of untreated control cells and represent mean of three experiments.

molecule of normal hematopoietic stem and progenitor cells, CD34. We have previously prepared a monoclonal antibody to this antigen by immunization of BALB/c mice with cells from the chronic myeloid leukemia cell line MOLM-7 [4]. After fusion of mouse spleen cells with SP2/0 mouse myeloma cell line, we obtained the hybridoma clone, which produced monoclonal antibody to hematopoietic stem and progenitor cells, clone 4H11(APG)(70066) of mouse IgG1

class. This antibody reacts with the majority of myeloid progenitor cells and cell lines (MOLM-6, MOLM-7, MOLM-9, HEL, KG-1) and detects the class III epitope of the CD34 molecule. Specificity of this antibody was defined at the 6th international workshop on the human leukocyte differentiation antigens [6]. Our results show that this antibody in purified form inhibits proliferation and specifically kills cells of CD34<sup>+</sup> leukemic cell lines.



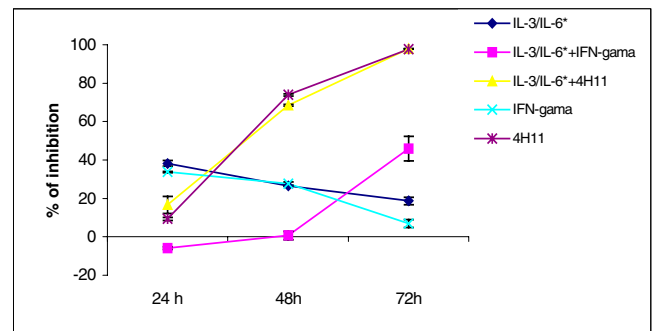
**Figure 3.** The effect of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and purified immunoglobulin from the hybridoma clone 4H11 (anti-CD34) on the proliferation of MOLM-9 cells assayed by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. The cells were incubated in the medium containing IFN- $\alpha$  (0.075  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), antibody alone (61  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and by both agent simultaneously (A), IFN- $\beta$  (0.375  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), antibody alone (61  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and by both agent simultaneously (B), IFN- $\gamma$  (0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), antibody alone (61  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and by both agent simultaneously (C) for up to 72 hours. The cell aliquots in triplicates were incubated in the medium containing  $^3\text{H}$ -thymidine for 4 h. The cells were harvested and the  $^3\text{H}$ -thymidine radioactivity was measured. Results are expressed as the percentage of inhibition of proliferation (mean of three experiments).

## Material and methods

**Reagents.** Recombinant human interleukin-3 (IL-3), recombinant human interleukin-6 (IL-6), recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), recombinant human stem cell factor (SCF) were purchased from BioSource Europe, S.A., Nivelles, Belgium. Recombinant human interferon-alpha-2c (IFN- $\alpha$ ), recombinant human interferon-beta (IFN- $\beta$ ), recombinant human interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) were purchased from Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany. Anti-human monoclonal antibodies CD14 (61D3), CD38 (HIT2) were purchased from eBioscience, San Diego, USA. Affinity purified mouse anti-human monoclonal antibody to CD34 molecule of IgG1 class was previously prepared on Prosep-A (Bioprocessing, Ltd., Scotland) from collected serum free culture medium of 4H11 hybridoma clone. Mouse anti-human monoclonal antibody to HLA-DR (B33.1) was gifted by Dr. Bice Perrusia, (Wistar Institute, Philadelphia, USA). RPE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse immunoglobulins was purchased from DAKO, Glostrup, Denmark. The APO-BrdU<sup>TM</sup> TUNEL assay kit was purchased from Invitrogen, Carlsbad, California, USA.

**Culture of cell lines.** Myeloid (MOLM-9 [4], JURL-MK1 [5]), myelomonocytic (ML-2, CTV-1), lymphomyeloid (PS-1) and erythroid-megakaryocytic cell lines (HEL) were maintained in suspension culture in medium RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS), 150 mg/l L-glutamine, 50 000 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The culture medium was changed three-times a week.

**Detection of cell viability and proliferation.** Cell lines were seeded and allowed to reach exponential growth for 24 hours. Cells were plated at the initial density of  $2 \times 10^5$  cells/ml. Purified mouse IgG1 antibody to CD34, clone 4H11, was used in concentrations 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 117  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 61  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,



\* IL-3/IL-6 = mixture of IL-3+IL-6+G-CSF+GM-CSF+SCF

**Figure 4.** The effect of cytokines (IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) and antibody from hybridoma clone 4H11 (anti-CD34) on proliferation of MOLM-9, cells assayed by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. Cells were incubated in medium containing IL-3 (1 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (5 ng/ml), G-CSF (1 ng/ml), GM-CSF (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (0.175mg/ml) and antibody from clone 4H11 (61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for up to 72 hours. The cell aliquots in triplicates were incubated with  $^3\text{H}$ -thymidine for 4 hours.

and 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in culture medium. In some experiments, also recombinant IFN- $\alpha$  (0.075  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IFN- $\beta$  (0.375  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IFN- $\gamma$  (0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or a cocktail of recombinant cytokines consisting of IL-3 (1 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (5 ng/ml), G-CSF (1 ng/ml), GM-CSF (1 ng/ml) were added to growing cells to potentiate differentiation or to inhibit proliferation and induce cell death. After 24, 48 and 72 hours of drug treatment, adherent and non-adherent cells were harvested and viable cells were counted by trypan blue dye exclusion method (at least 200 cells were counted in each assay). Cell viability was calculated as the percentage of values of untreated adequate control cells.

Cell proliferation was assayed by measuring uptake (incorporation) of  $^3\text{H}$ -thymidine. The treated cells as well as the appropriate controls in triplicates were pulsed with 24 kBq

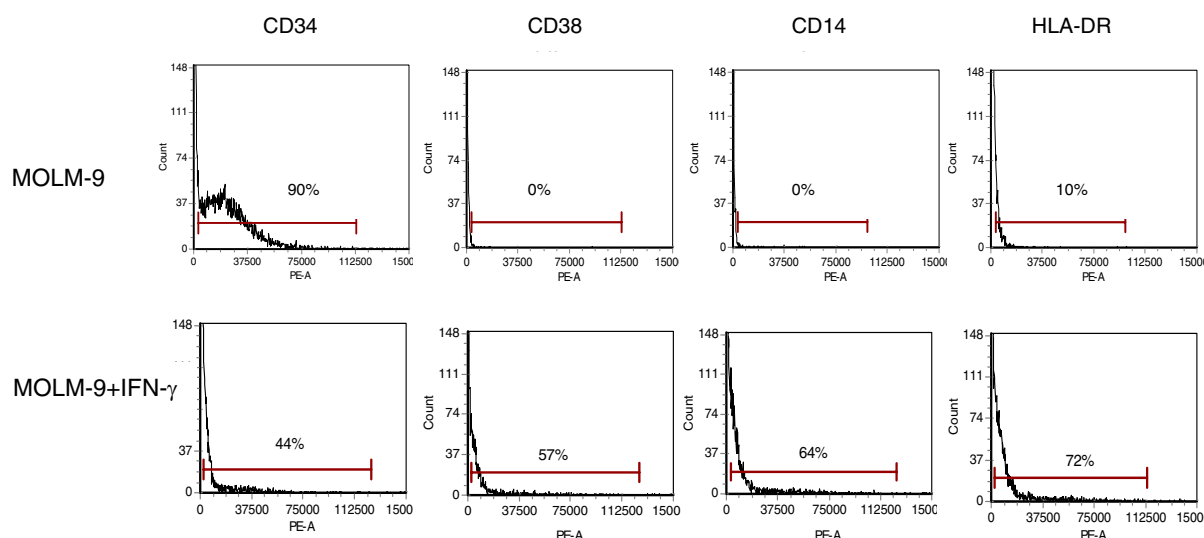


Figure 5. Expression of CD34, CD38, CD14 and HLA-DR determined by flow cytometry in untreated and IFN- $\gamma$  treated MOLM-9 cells after 72 hours of treatment.

Table 1. Expression of cell surface molecules of untreated, antibody, cytokines or both antibody + cytokine treated cells after 72 hours of induction (in percentage of positive cells detected by flow cytometry)

MOLM-9	CD34	CD38	CD14	HLA-DR
IL-3/IL-6*	89	0	0	7
IL-3/IL-6* + IFN-g	91	0	0	41
IL-3/IL-6* + 4H11	76	0	0	8
IFN-g	33	48	54	63
4H11	87	0	0	5
untreated control	88	0	0	8

\* IL-3/IL-6 = mixture of IL-3+IL-6+G-CSF+GM-CSF+SCF

(6-<sup>3</sup>H)-thymidine (Institute for Research, Development and Application of Radioisotopes, Prague, Czech Republic) of the specific activity 980 (Gbp/mmol) for 4 h and the cells were collected using Scatron cell harvester. The incorporated radioactivity into the newly synthesized DNA was measured on the beta scintillation counter. The mean values of triplicate experiments expressed in counts per minute (cpm) were calculated. The inhibition of proliferation was expressed as percentage of cpm of cells that were treated in relation to untreated cells according to the formula:

$$\text{Inhibition of proliferation [\%]} = \frac{[\text{cpm (untreated)} - \text{cpm (treated)}]}{\text{cpm (untreated)}} \times 100$$

**Cell cycle analysis.** MOLM-9, JURL-MK1, PS-1 cells ( $10^6$  cells/ml) treated by 4H11 antibody (61 mg/ml) were collected by centrifugation after 24, 48 and 72 hours, suspended in 4.5 ml of ice-cold 70% ethanol, incubated for 30

min at 10 °C and kept for 5-7 days at -20 °C. The samples were then washed once in PBS and incubated for 30 min at room temperature in 1 ml of the modified Vindelov's propidium iodide buffer (10 mM Tris, pH 8, 1 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 20 mg/ml PI and 10 K units of ribonuclease A). The fluorescence excited at 488 nm was then measured using Coulter Epics XL flow cytometer. Distribution of DNA during the treatment by 4H11 antibody was indicated by G1/G0-G2/M transition.

**Assessment of apoptosis by TUNEL assay.** The tunel assay was performed employing the APO-BrDU TUNEL Assay Kit following the standard manufacturer's protocol. Briefly, MOLM-9, HEL, JURL-MK1, PS-1 cells treated with 4H11 antibody (61  $\mu$ g/ml) were collected after 24, 48 and 72 hours. The cells were washed by PBS, adjusted to a density of  $1-2 \times 10^6$  cells/ml and fixed with 1% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min. Subsequently, the cells were pelleted and permeabilized with the ice-cold 70% ethanol for 18 hours at -20 °C. To label DNA strand breaks,  $1-2 \times 10^6$ /ml cells were incubated with 50  $\mu$ l of TUNEL reaction mixture for 60 min. at 37 °C. The extent of DNA labeling with Alexa Fluor 488 dye-labeled anti-BrdU antibody was determined by flow cytometry.

**Morphological analysis.** Cytospin preparations were made after 24, 48 and 72 hours of incubation of MOLM-9 cells with a cocktail of recombinant cytokines IL-3 (1 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (5 ng/ml), G-CSF (1 ng/ml), GM-CSF (1 ng/ml) or with recombinant IFN- $\gamma$  (0,125  $\mu$ g/ml) in combination with 4H11 antibody or without.

**Immunophenotype analysis.** The expression of surface antigens on MOLM-9 cell line was determined by indirect immunofluorescence using a panel of monoclonal antibodies and RPE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse

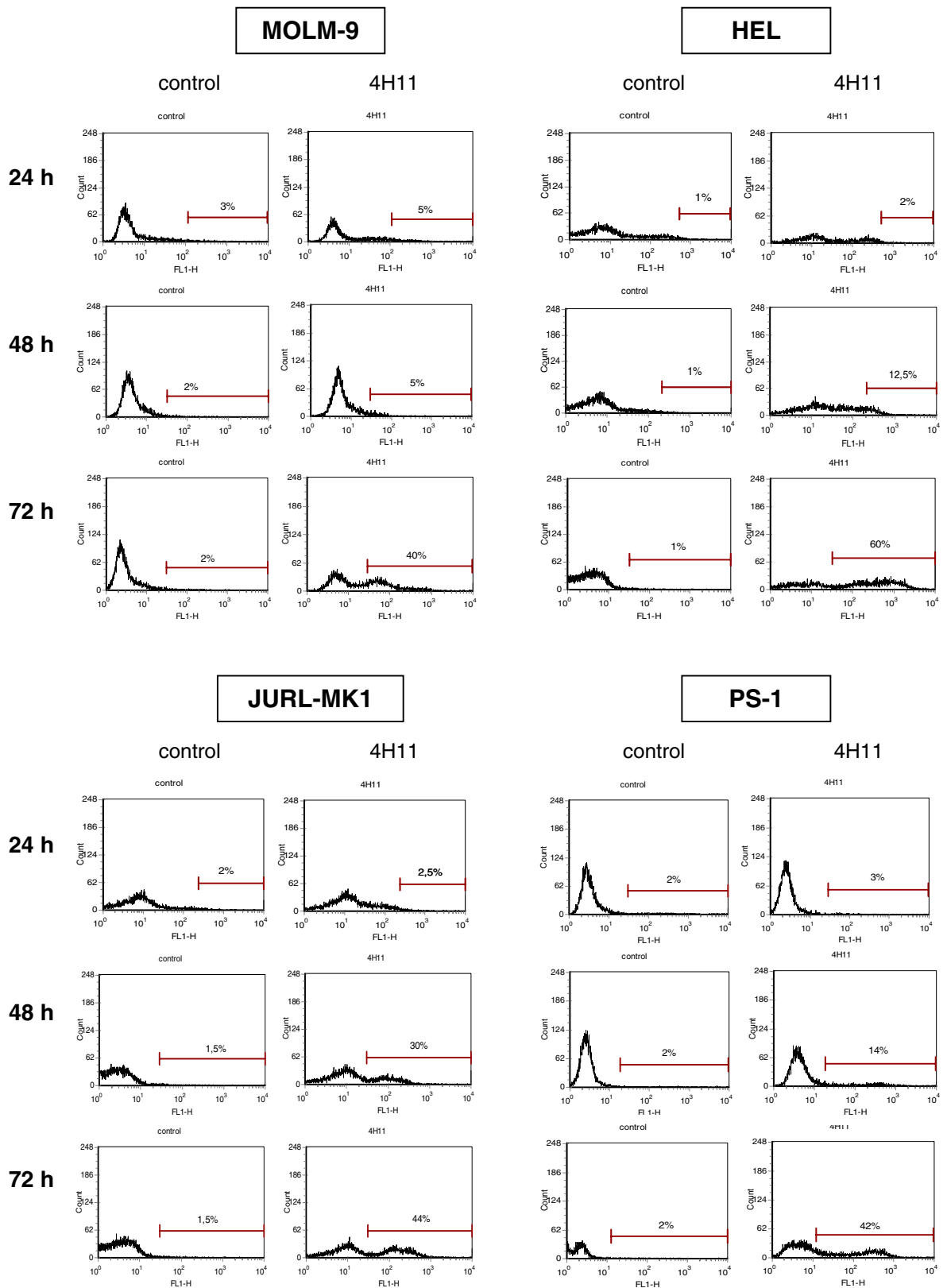


Figure 6. Flow cytometry analysis of MOLM-9, HEL, JURL-MK1, PS-1 cells induced to apoptosis by 4H11 antibody (61µg/ml). Fractions of apoptotic cells were determined by TUNEL assay after 24 h, 48 h and 72 h.

immunoglobulin as a secondary reagent. The following monoclonal antibodies were used: mouse anti-human CD14 (61D3), CD34 (4H11), CD38 (HIT2), HLA-DR (B33.1). The percentage of labeled cells was determined by flow cytometry.

## Results

*The effect of anti-CD34 antibody 4H11 on proliferation and viability of CD34+ cell lines (MOLM-9, HEL, JURL-MK1) and CD34- lines (PS-1, ML-2, CTV-1).* As shown in the Fig. 1, the concentrations of antibody at 16 mg/ml and higher strongly inhibited the proliferation of all CD34+ cell lines. However the growth of CD34- cell lines was also inhibited, but only in the antibody concentrations at 32 mg/ml and higher. The strongest growth-inhibitory effect on all cell lines was detected after 72 hours of treatment.

The number of viable cells gradually decreased with the increasing concentration of antibody during the period of treatment. The effect of the antibody at the lowest concentrations (16-32 µg/ml) on the viability of CD34- cell lines (JURL-MK1, PS-1, CTV-1) was negligible (Fig. 2).

*The effect of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and antibody 4H11 on proliferation of MOLM-9 cell line.* The effect of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and of the antibody 4H11 alone on the growth of MOLM-9 leukemic cell line was examined. To assess the effect of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and 4H11 antibody on the proliferation of MOLM-9 cells, we used  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into the cellular DNA. As shown in Fig. 3, both IFN- $\alpha$  or IFN- $\beta$  alone suppressed the cell growth of MOLM-9 (around 30-40%) compared to untreated control cells. IFN- $\gamma$  also inhibited the proliferation of MOLM-9 cells but the inhibition of cell growth decreased (from 35% to 10%) within the period of treatment. The course of treatment of MOLM-9 cells by 4H11 antibody in combination with IFN- $\alpha$  or IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$  and by antibody 4H11 was very similar. Both treatments progressively suppressed the growth of MOLM-9 cells.

*The effect of cytokines and antibody 4H11 on cell growth and differentiation of MOLM-9 leukemic cell line.* We investigated the effect of various cytokines together with anti-CD34 antibody on cell growth of MOLM-9 cell line during the 72 hours of treatment. The possible induction of cell differentiation and inhibition of cellular proliferation by treatment with this agent alone and in combinations was also studied. Cellular differentiation was assessed by morphological analysis of Cytospin preparations and by the loss of expression of CD34 and by the appearance of membrane molecules of more differentiated cells such as CD14 and HLA-DR. Table 1 shows the expression of cell surface molecules on MOLM-9 cells after 72 hours of treatment. Levels of CD38, CD14 were strongly increased only after treatment by IFN- $\gamma$  in comparison to untreated control cells. However, the expression of CD34 was down-regulated by IFN- $\gamma$  (Fig. 5). Treatment with other agents did not influence the expression of CD38, CD14 and HLA-DR. By morphological analysis of Cytospin preparations (Fig. 8) and by flow cytometry, we did not find signs

of either myeloid or lymphoid differentiation. We observed a relative decrease of inhibition of cell growth during the treatment of MOLM-9 cells with the mixture of cytokines (IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+GM-CSF) and after treatment of MOLM-9 cells by IFN- $\gamma$  alone. The combined treatment of MOLM-9 cells by mixture of cytokines (IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+GM-CSF+IFN- $\gamma$ ) did not influence the proliferation of MOLM-9 cells within 48 hours of culture, compared to the untreated control cells. The growth of MOLM-9 cells decreased after 48 and 72 hours of treatment. The treatment of MOLM-9 by mixture of recombinant cytokines (IL-3+IL-6+ SCF+G-CSF+GM-CSF) in the presence of 4H11 antibody or the treatment by 4H11 antibody alone inhibited proliferation (Fig. 4).

*DNA fragmentation and Tunnel assay.* We studied the effect of 4H11 antibody on the induction of apoptosis of CD34+ cell lines (MOLM-9, HEL, JURL-MK1) and CD34- cell line (PS-1). The number of TUNEL-positive cells gradually increased during 72 hours of treatment by 4H11 antibody compared to 2% in control cells (Fig. 6). The majority of TUNEL-positive cells (60%) was detected after 72 hours of treatment of HEL cells. The apoptosis of MOLM-9 cells was delayed up to 72 hours of treatment when the apoptosis of CD34- cell line PS-1 was also detected.

*Cell cycle analysis.* Induction of apoptosis in leukemic cell lines MOLM-9, JURL-MK1 and PS-1 was also studied by the cell cycle analysis. In the Fig. 7, a series of flow cytometry histograms show pronounced changes of DNA distribution that occurred after treatment with 4H11 antibody. An increase of the percentage of cells in G1 phase in comparison with controls was detected in all cell lines treated by 4H11 antibody. It indicates that cells are arrested in the G1 phase of the cell cycle. An increased fraction of cells in subG1 phase (apoptotic cells) was detected during the treatment by 4H11 antibody compared to control cells in all the cell lines studied.

## Discussion

Due to morphological and phenotypic heterogeneity observed in leukemia and also in other malignant tumors, two models of tumor etiology have been recently proposed [7, 8]. The stochastic theory postulates that cells within malignant tumors are relatively homogeneous and the genetic changes leading to the development and progression of malignancy are operative in all cells. Therapy to eradicate tumor can be directed to the bulk of the cell population. However, the newly proposed stem cell model (Fig. 9) postulates that a rare population of tumor-initiating cells is biologically and functionally distinct and only the cancer stem cell subset has the ability to proliferate extensively and to form new tumor cells [8, 9]. This model is substantiated by findings of Lapidot et. al [10] and Bonnet et al [11], who have shown that AML, like the normal hematopoietic system, is organized as a hierarchy of distinct, functionally heterogeneous classes of cells that are ultimately sustained by a small num-

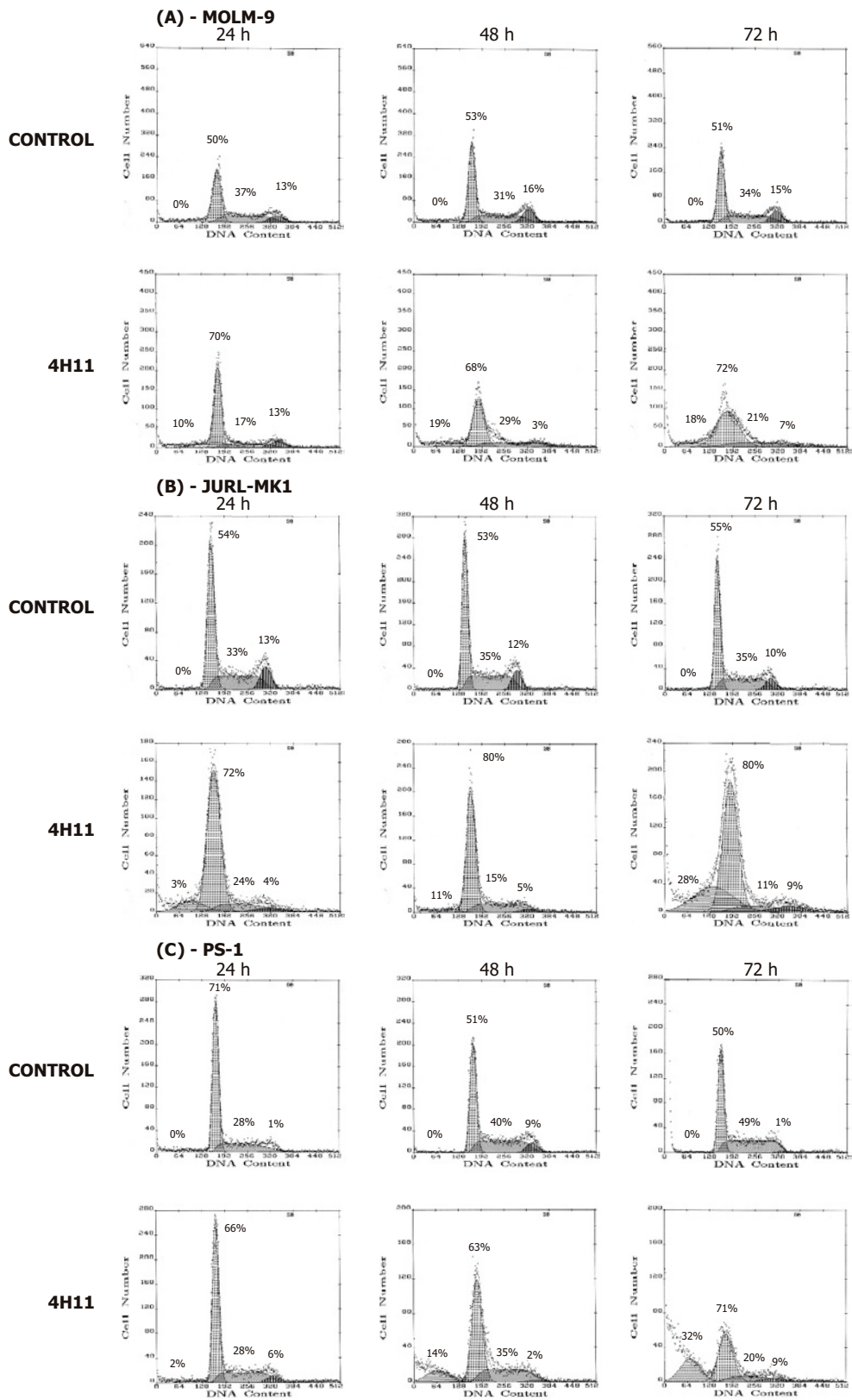
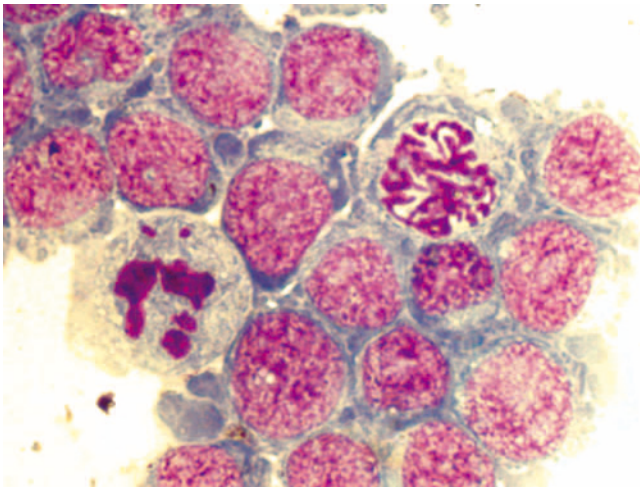


Figure 7. Cell cycle distribution obtained by flow cytometry analysis of MOLM-9 (A), JURL-MK1 (B) and PS-1 cells (C) after 24, 48 and 72 hours of treatment by 4H11 antibody.





**Figure 8.** Smear of MOLM-9 cells treated by anti-CD34 clone 4H11 for 24 hours. Cells in mitosis transiting to apoptosis are characterized by chromosome and chromatin condensation.

ber of leukemia stem cells (LSCs). Also in CML, the property of self-renewal has been recently identified within the stem cell population of CML patients in the chronic phase disease and within the stem cell and myeloid progenitor population in patients in blast crisis [12]. LSCs have a primitive immunophenotype that is similar to normal HSCs (hematopoietic stem cells) in many respects. Both LSCs and HSCs express CD34 molecule but not CD38 [11]. However, Thy-1 (CD90) and c-kit (CD117) that are present on normal HSCs are not expressed on LSCs [13, 14] and the IL-3 receptor  $\alpha$  chain (CD123) is unique marker for LSCs [15] (Fig. 9). Therefore the targeted therapy of leukemia may be focused and designed to specifically target these LSCs in case it effectively cures and prevents disease relapse. In context with these recent findings, we decided to target the leukemia stem cells in AML and CML with our previously developed monoclonal antibody to hematopoietic stem cell antigen CD34, clone 4H11, with the aim of possible eradication of the rare population of LSCs responsible for maintaining the disease.

In this study, we investigated the effect of purified immunoglobulin from hybridoma clone 4H11 of anti-CD34 alone or in combination with one or more recombinant cytokines (IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) on proliferation, differentiation and induction of cell death of CD34+ and CD34- leukemic cells in the “*ex vivo*” system. The ultimate goal of this investigation is the development of a new therapeutic agent based on the antibody to the surface molecule of hematopoietic stem cells CD34. For this purpose, we have chosen several CD34+ cell lines, especially Ph1+ CML-derived cell lines (MOLM-9, JURL-MK1), erythroleukemia-derived cell line (HEL), in comparison to CD34- lymphomyeloid cell line (PS-1) and monocytic cell lines (CTV-1, ML-2). The mouse monoclonal antibody to CD34

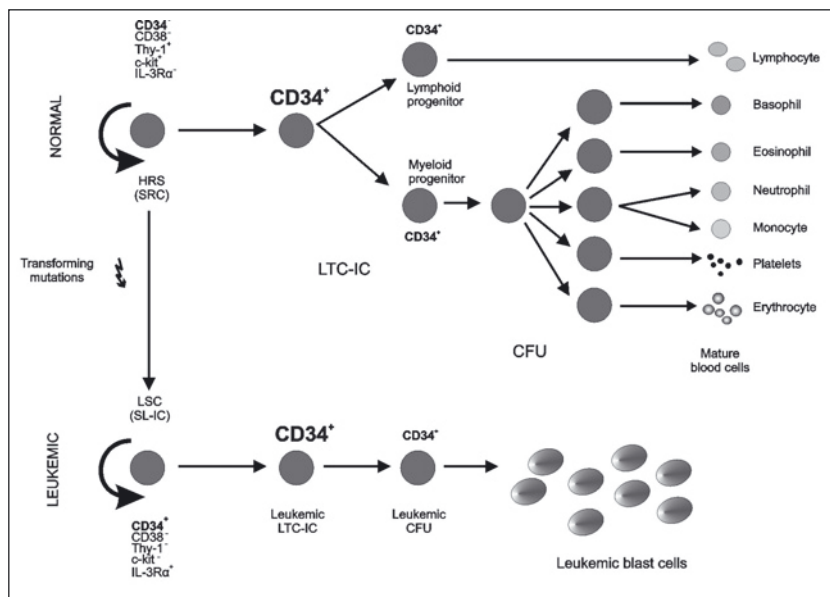
molecule of IgG1 class, clone 4H11 (APG), was previously developed in our laboratory by fusion of mouse spleen cells immunized with cells of CD34+ cell line MOLM-7 with mouse myeloma cell line SP 2/0 and the purified antibody from the resulting hybridoma clone 4H11 (APG) was used in all experiments. This antibody inhibited proliferation and induced cell death of all studied CD34+ cell lines, however in the concentrations higher than 32  $\mu$ g/ml exhibited a non-specific antiproliferative and proapoptotic effect also on CD34- cell lines. As is shown in the Fig. 1 and 2, the antiproliferative effect of the antibody on CD34+ cell lines is dose dependent and the optimal concentration of antibody which efficiently mediated inhibition of proliferation and induced the cell death determined as the percentage of trypan blue positive cells was at narrow range between 16 to 32  $\mu$ g/ml. At concentrations lower than 16  $\mu$ g/ml the effect was diminished (not shown), but at the antibody concentrations higher than 32  $\mu$ g/ml the nonspecific inhibitory effect of antibody was prevalent. The cell cycle analysis revealed that after 24 hours of the antibody treatment, cells were arrested in the G1/G0 phase of the cell cycle (Fig. 7). DNA fragmentation, another feature of the process related to apoptosis, was also detected (Fig. 6). The results obtained on the MOLM-9 cell line are similar to the results of Zada et al [16] who have shown the growth-inhibitory G1 arrest of anti-CD44 monoclonal antibody A3D8 or H90 on cells of myeloid cell lines. In their study, the percentage of apoptotic cells (cells in subG1 phase) also increased after treatment with anti-CD44 antibody. Charrad et al [17] reported induction of terminal differentiation and inhibition of proliferation of myeloid leukemia cell lines HL-60, THP-1 and NB4 after treatment by anti-CD44 monoclonal antibody A3D8 or H90.

Induction of differentiation is generally associated with the cell cycle arrest and with the prolongation of G1 phase of cell cycle in differentiating cells. After treatment of MOLM-9 cells with 4H11 antibody alone, we did not reveal signs of either monocytic or granulocytic differentiation by monitoring morphology (Fig. 8) and expression of the surface antigen CD14 by flow cytometry. 4H11 antibody, however, inhibited the cell growth and arrested the cells in the G1 phase. Therefore, we suggest that 4H11 is able to induce cell senescence, characterized by cessation of cell division while retaining cell viability. Senescent cells are typically arrested in G1 phase of the cell cycle [18]. The mechanism of the direct cell death induction by this antibody in CD34+ cell lines, however, remains to be explained.

Type I IFNs (IFNs  $\alpha/\beta$ ) have shown a considerable promise in the treatment of many malignant tumors [19] and have been proven to be effective in several hematological malignancies including chronic myeloid leukemia [20] and hairy cell leukemia [21]. We have shown that both IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  suppressed the cell growth of MOLM-9 Ph1+ chronic myeloid leukemia cells. This observation is in accordance with the finding of Benjamin et al., who reported antiproliferative activity of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  against AML cell lines [22]. IFN- $\alpha$  (0.075  $\mu$ g/ml)

and IFN- $\beta$  (0.375  $\mu\text{g/ml}$ ) were more effective in the antiproliferative effect than IFN- $\gamma$  (0.125  $\mu\text{g/ml}$ ). The combination of 4H11 antibody with IFN- $\alpha$  or IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$  did not have an enhancing effect and did not result in cell growth inhibition to a higher extent than did 4H11 antibody alone. The decreased expression of CD34 antigen detected after treatment by IFN- $\gamma$ , as shown in Fig. 5, can be explained by the ability of IFN- $\gamma$  to stimulate the expression of MHC-II and many other surface molecules of more mature cells such as CD38, CD14 and HLA-DR, compared with untreated controls. It has been shown earlier that IFN- $\gamma$  inhibits proliferation and induces monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells and myeloid cell lines HL-60, ML-1 [23]. After treatment of MOLM-9 cells with a mixture of recombinant cytokines (IL-3+IL-6+SCF+G-CSF+GM-CSF) and with 4H11 antibody simultaneously, the proliferation rate decreased (Fig. 4). The growth of MOLM-9 cells in medium containing mixture of recombinant cytokines was partially inhibited, nevertheless, the growth-inhibitory effect of recombinant cytokines in combination with 4H11 antibody was the same as the treatment with 4H11 antibody alone. This suggests that 4H11 antibody inhibits cell proliferation by a different mechanism, because the cytokines alone or combinations of 4H11 antibody with recombinant cytokines did not show an enhanced antiproliferative effect.

In conclusion, we demonstrated that the anti-CD34 antibody at concentrations of 16-32  $\mu\text{g/ml}$  produced by clone 4H11 exhibits a strong antiproliferative effect on myeloid (MOLM-9, JURL-MK1) and erythroid-megakaryocytic (HEL) CD34+ cell lines, but only a weak or no antiproliferative effect was detected on CD34- lymphomyeloid cell lines. The proapoptotic effect of 4H11 has been observed in both CD34+ and CD34- cell lines. These results indicate that MOLM-9, JURL-MK1, HEL cell lines are suitable experimental models for laboratory studies of the mechanism(s) involved in 4H11-induced apoptosis and growth inhibition. Our data indicate the induction of G1/G0 arrest of MOLM-9 cells by 4H11 antibody, however without the induction of differentiation. Furthermore, recombinant cytokines (IL-3, IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) do not significantly potentiate the growth-inhibitory effect of 4H11 antibody. Despite that the exact mechanisms of cell death induction and of the antiproliferative effect of this antibody remains unknown, this antibody (4H11), after sufficient preclinical testing on laboratory animals, may represent a new alternative to the spectrum of surface molecules chosen for targeted therapy of human myeloid leukemia. It might be especially useful in cases where therapy by gemtuzumab-ozogamicin fails, due to the late ex-



**Figure 9.** Scheme of the hierarchy of normal and leukemic hematopoietic cells. Human hematopoietic stem cells (HSC) are organized in a hierarchy that is sustained by a small population of self-renewal capacity LTC-ICs (long term culture-initiating cells), CFU (colony-forming units), which produce functionally mature blood cells. Disturbances of pathways regulating self-renewal and differentiation by transforming mutations give rise to leukemia stem cells (LSCs). *In vivo* reconstitution assay immune-deficient mouse recipients enable detection of HSCs and LSCs as SCID-repopulating cells (SRC) and SCID leukemia-initiating cells (SL-IC) [9].

pansion of leukemic stem cells, which do not express the target antigen CD33, but do express the CD34 molecule. There are, however, still many problems to be solved. In the first place is the cross-reactivity of anti CD34 antibodies with other types of cells, mainly cells of nonhematopoietic origin such as endothelial and some neural cells. Also the possible damage to normal hematopoietic cells must be considered and carefully examined.

We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Mrs. G. Lindnerová and Mrs. J. Němcová. We also acknowledge many helpful ideas and comments of Dr. J. Schwarz of our Institute.

## References

- [1] MILLER RA, MALONEY DG, WARNKE R, LEVY R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 1982, 306: 517-522.
- [2] MILLER RA, LEVY R. Response of cutaneous T cell lymphoma monoclonal antibody. *Lancet* 1981, 2: 226-230.
- [3] PRESS OW, APPELBAUM F, LEDDBETTER JA. Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 1987, 69: 584-591.
- [4] TSUJI-TAKAYAMA K. Establishment of multiple leukemia cell lines with diverse myeloid and/or megakaryoblastoid characteristics from a single Ph1 positive chronic myelogenous leukemia blood sample. *Hum Cell* 1994, 7: 167-171.

- [5] DI NOTO R, LUCIANO L, LO PARDO C et al. JURL-MK1 (c-kit(high)/CD30-/CD40-) and JURL-MK2 (c-kit(low)/CD30+/CD40+) cell lines: 'two-sided' model for investigating leukemic megakaryocytopoiesis. *Leukemia* 1997, 11: 1554–1564.
- [6] STÖCKBAUER P, HRADCOVÁ M, NOVÁK JT et al. Monoclonal antibody to a human chronic myeloid leukaemia cell line reacts with antigen in apoptotic cells and apoptotic bodies. In: MASON D editor. *Leukocyte typing VII*. New York: Oxford University Press, 2002: 63–68.
- [7] DICK JE. Breast cancer stem cells revealed. *P Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 3547–3549.
- [8] REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. Stem cells, cancer stem cells. *Nature* 2001, 414: 105–111.
- [9] WANG JCY, DICK JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 2005, 15: 494–501.
- [10] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994, 367: 645–648.
- [11] BONNET D, DICK JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997, 3: 730–737.
- [12] JAMIESON CH, AILLES LE, DYLLA SJ. Granulocyte macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML. *N Engl J Med* 2004, 351: 657–667.
- [13] BLAIR A, HOGGE DE, AILLES LE et al. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997, 89: 3104–3112.
- [14] BLAIR A, SUTHERLAND HJ. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol* 2000, 28: 660–671.
- [15] JORDAN CT, UPCHURCH D, SZILVASSY SJ et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000, 14: 1777–1784.
- [16] ZADA AAP, SINGH SM, REDDY VA et al. Down regulation of c-jun expression and cell cycle regulatory molecules in acute myeloid leukemia cells upon CD44 ligation. *Oncogene* 2003, 22: 2296–2308.
- [17] CHARRADRS, GADHOUM Z, QI J, GLACHANT A et al. Effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 2002, 99: 290–299.
- [18] CESANO A, PIERSON G, VISONNEAU S et al. Use of a lethally irradiated major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line for effective purging of marrows containing lysis-sensitive or – resistant leukemic targets. *Blood* 1996, 87: 393–403.
- [19] BORDEN EC. Review: Milstein Award lecture: interferons and cancer: where from here? *J Interferon Cytokine Res* 2005, 25: 511–527.
- [20] ALLAN NC, RICHARDS SM, SHEPHERD PC. UK Medical research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. *Lancet* 1995, 345:1392–1397.
- [21] JAHAGINDAR BN, MILLER JS, SHET A, VERTAILLE CM. Novel therapies for chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2001, 29: 543–556.
- [22] BENJAMIN R, KHWAJA A, SINGH N et al. Continuous delivery of human type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) has significant activity against acute myeloid leukemia cells in vitro and in a xenograft model. *Blood* 2006, (in press).
- [23] PERUSSIA B, DAYTON ET, FANNING V et al. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J Exp Med* 1983, 158:2058–2080.

## Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines – induction of cell death and senescence

K. ELKNEROVA, D. MYSLIVCOVA, Z. LACINOVA, I. MARINOV, L. UHERKOVA, P. STÖCKBAUER

*Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic e-mail: petr.stockbauer@uhkt.cz*

Received June 24, 2010

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 optimally induce apoptosis, growth inhibition or stress-induced premature senescence. We have found that SAHA inhibited proliferation and induced apoptosis in concentration 1000x lower than VPA. 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 24h. The optimal doses for the induction of cell death are 2,5-5  $\mu$ M of SAHA and 2,5-5 mM of VPA. These doses of HDACi induce both apoptosis and senescence of studied leukemia cell lines.

*Keywords: senescence, apoptosis, histone deacetylase inhibitors (HDACi) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), valproic acid (VPA)*

Recently, the use of histone deacetylase inhibitors (HDACi) as anti-cancer agents has received great attention. Histone deacetylase enzymes (HDACs) are the class of proteins that catalyze removal of acetyl groups from lysine residues of histone or non-histone proteins that regulate the expression of genes and proteins essential for cell survival [1-3]. The acetylation status of histones can alter the chromatin structure, thereby modulating the gene expression. This process is controlled by the relative activities of histone acetyltransferases (HATs) and HDACs [4]. Disturbance of the HAT-HDAC dynamics appears to result in the development of cancer. The aberrant recruitment of HDAC is closely associated with leukemogenesis through silencing the expression of genes involved in the hematopoietic cell differentiation [5]. Number of a small-molecule HDAC inhibitors (HDACi) have been developed as a new promising class of anticancer drugs [2, 6-8]. Natural and synthetic inhibitors have been characterized. Despite the fact that these inhibitors are structurally different, they share the capacity to induce cell differentiation [9], apoptosis [10], growth inhibition [11] and cell cycle arrest in a variety of malignant cells [12]. Several HDAC inhibitors are currently in clinical trials as anti-cancer agents, because they show an inhibitory activity against cancer at well-tolerated doses [13]. Some of them, however, have a short half-life and exert a significant

toxic side effects in vivo [14]. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, vorinostat) belongs to the hydroxamic acid-based hybrid polar compounds and is a prototypic compound of HDACi [6]. SAHA increases the intracellular acetylation of histones H2B, H3 and H4 and also increases the expression of p21 and Bax while decreasing the expression of STAT6 and levels of phospho-STAT6. All these actions ultimately lead to the activation of apoptosis and other forms of cell death [15]. Valproic acid (2-propylpentanoic acid, VPA) is a member of branched short chain fatty acids and has been widely used in the management of various types of epilepsy for decades. VPA affects the growth and differentiation of some cell types. It induces differentiation of neuroblastoma cells, inhibits their growth [16] and induces apoptosis in selected solid tumors as well as in hematological neoplasias [17,18].

Induction of cell death or cell growth arrest upon the treatment with anticancer drugs correlates with the tumor response. Recently the most extensively studied mechanisms of cancer treatment is the induction of cell death by apoptosis, necrosis, or autophagy, or induction of senescence. Numerous studies have shown that in cells where apoptosis is blocked, non-apoptotic cell death or irreversible cell growth arrest namely senescence, can be activated as potential tumor-suppressor

mechanism [19,20]. Senescence is the physiological program of the irreversible terminal growth arrest occurring in both normal and immortalized cells in response to telomeric alterations, and also to sublethal stress and inappropriate oncogenic signaling. The term “stress-induced premature senescence” is used for senescence resulting from the stress or DNA damage induced by the effect of chemotherapeutic drugs on cancer cells. Senescent cells develop the characteristic phenotype, including the enlarged, flattened morphology, prominent nucleus, senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), and also the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA $\beta$ -gal) activity [21,22,23]. When senescence is induced in cancer cells, the up-regulation of inflammatory cytokines triggers an innate immune response, that targets the tumor cells [24]. Cellular senescence prevents some cells from initiating cancer, but can paradoxically promote cancer development in neighbouring cells [22].

Here we examine the drug dosage of SAHA or VPA, which can optimally induce apoptosis, growth inhibition or stress-induced premature senescence in leukemic cell lines JURL-MK1, MOLM-7, HEL, HL-60. We have found that SAHA inhibited proliferation and induced apoptosis in concentration 1000x lower than VPA. Both SAHA and VPA can induce senescence and apoptosis at low drug concentrations, however by longer treatment (5 days) rather senescence than apoptosis (2 days) is induced. The use of lower treatment concentrations can limit the undesired side effects.

## Material and methods:

**Chemicals.** Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was purchased from Alexis Corporation (San Diego, CA, USA) and was dissolved in DMSO as stock solution. The maximum concentration of DMSO in the experiments was less than 0,1%. Valproic acid sodium salt was purchased from Alexis Corporation (San Diego, CA, USA) and was dissolved in water. The APO-BrdU™ TUNEL assay kit was purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA). The senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit was purchased from Cell Signaling Technology, Denver, USA.

**Cultivation of cell lines.** Myeloid-megakaryocytic (MOLM-7, JURL-MK1), myeloid-promyelocytic (HL-60), erythroid-megakaryocytic cell lines (HEL) were maintained in suspension culture in medium RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS), 150 mg/l L-glutamine, 50 000 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. They were diluted to a density of 2 to 4 x 10<sup>5</sup> cells per ml three times a week. Cells were harvested in the exponential growth phase. Viability was assessed by Trypan blue exclusion test.

**Detection of cell viability and growth inhibition.** Cell lines were seeded and allowed to reach the exponential growth for 24 hours. Cells were plated at the initial density of 2,5 x 10<sup>5</sup> cells/ml. SAHA was used in 0,5 to 10  $\mu$ M concentrations. Valproic acid was used in 0,5 to 10 mM concentrations to inhibit proliferation and induce cell death. After 24, 48 and 72 hours of drug treatment, cells were harvested and viable cell were

counted by Trypan blue dye exclusion method (at least 200 cells were counted in each assay). Cell viability was calculated as the percentage of values of untreated control cells.

Growth inhibitory effect of HDACi was assayed by measuring the uptake (incorporation) of <sup>3</sup>H-thymidine. Shortly the treated cells as well as the appropriate controls in triplicates were pulsed with 24 kBq (6-<sup>3</sup>H)-thymidine (Institute for Research, Development and Application of Radioisotopes, Prague, Czech Republic) of the specific activity 980 (Gbpq/mmol) for 4 h and the cells were collected using Scatron cell harvester. The incorporated radioactivity into the newly synthesized DNA was measured on the beta scintillation counter. The mean values of triplicate experiments expressed in counts per minute (cpm) were calculated. The inhibition of proliferation was expressed as the percentage of cpm of cells that were treated in relation to untreated cells, cpm (untreated), according to the formula:

$$\text{Inhibition of proliferation [\%]} = \frac{[\text{cpm (untreated)} - \text{cpm (treated)}]}{\text{cpm (untreated)}} * 100\%$$

**Cell cycle analysis:** MOLM-7, JURL-MK1, HL-60 cells (10<sup>6</sup> cells) treated by SAHA (concentrations 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M), valproic acid (concentrations 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1mM, 0,5 mM) were collected by centrifugation after 24, 48 and 72 hours, suspended in 4.5ml of ice-cold 70% ethanol, incubated for 30min at 10°C and kept for 5-7 days at -20°C. The samples were then washed once in PBS and incubated for 30min at room temperature in 1ml of the modified Vindelovs propidium iodide buffer (10 mM Tris, pH 8, 1 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 20  $\mu$ g/ml PI and 10K units of ribonuclease A). The fluorescence excited at 488nm was then measured using Coulter Epics XL flow cytometer. The histograms were analysed using the FLOWJo (Flow Cytometry Analysis Software) software.

**Assessment of apoptosis by TUNEL assay.** The TUNEL assay was performed employing the APO-BrdU TUNEL Assay Kit (Invitrogen, California, USA) following the standard manufacturer's protocol. Briefly, MOLM-7, JURL-MK1, HL-60 cells treated by SAHA and VPA as indicated above. After drug treatment, cells were washed in PBS, adjusted to a density of (1-2) x 10<sup>6</sup> cells/ml and fixed with 1% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min. Subsequently, the cells were pelleted and permeabilized with the ice-cold 70% ethanol for 18 hours at -20 °C. To label DNA strand breaks, 1-2 x 10<sup>6</sup>/ml cells were incubated with 50  $\mu$ l of TUNEL reaction mixture for 60 min at 37°C. The extent of DNA labeling with Alexa Fluor 488 dye-labeled anti-BrdU antibody was determined by flow cytometry.

**Detection of senescent cells.** MOLM-7, HL-60 and JURL-MK1 cells were seeded in 12-well plates in culture medium containing SAHA (5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) or VPA (5 mM, 2,5 mM, 1 mM) and the cells were incubated for 24h, 48h, 72h or 120 h. SA- $\beta$ -gal staining was performed using a senescence staining kit (Cell signaling). In brief, cells were fixed for 10 min in fixative solution (2% formaldehyde, 0,2% glutaraldehyde), washed and incubated at 37°C with X-gal (1mg/ml), dissolved in solution containing 40 mM citric acid pH 6,5; 5 mM potas-

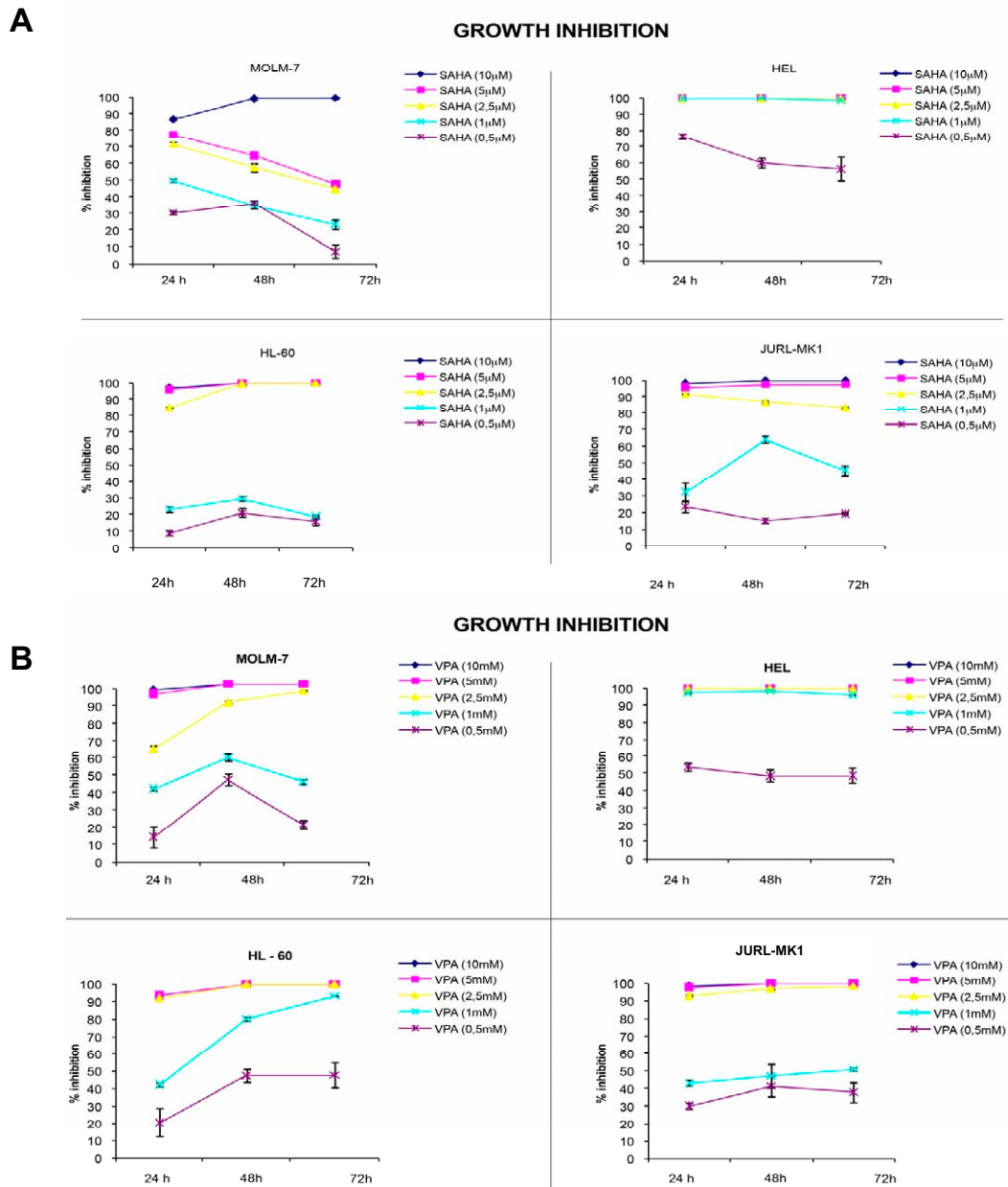


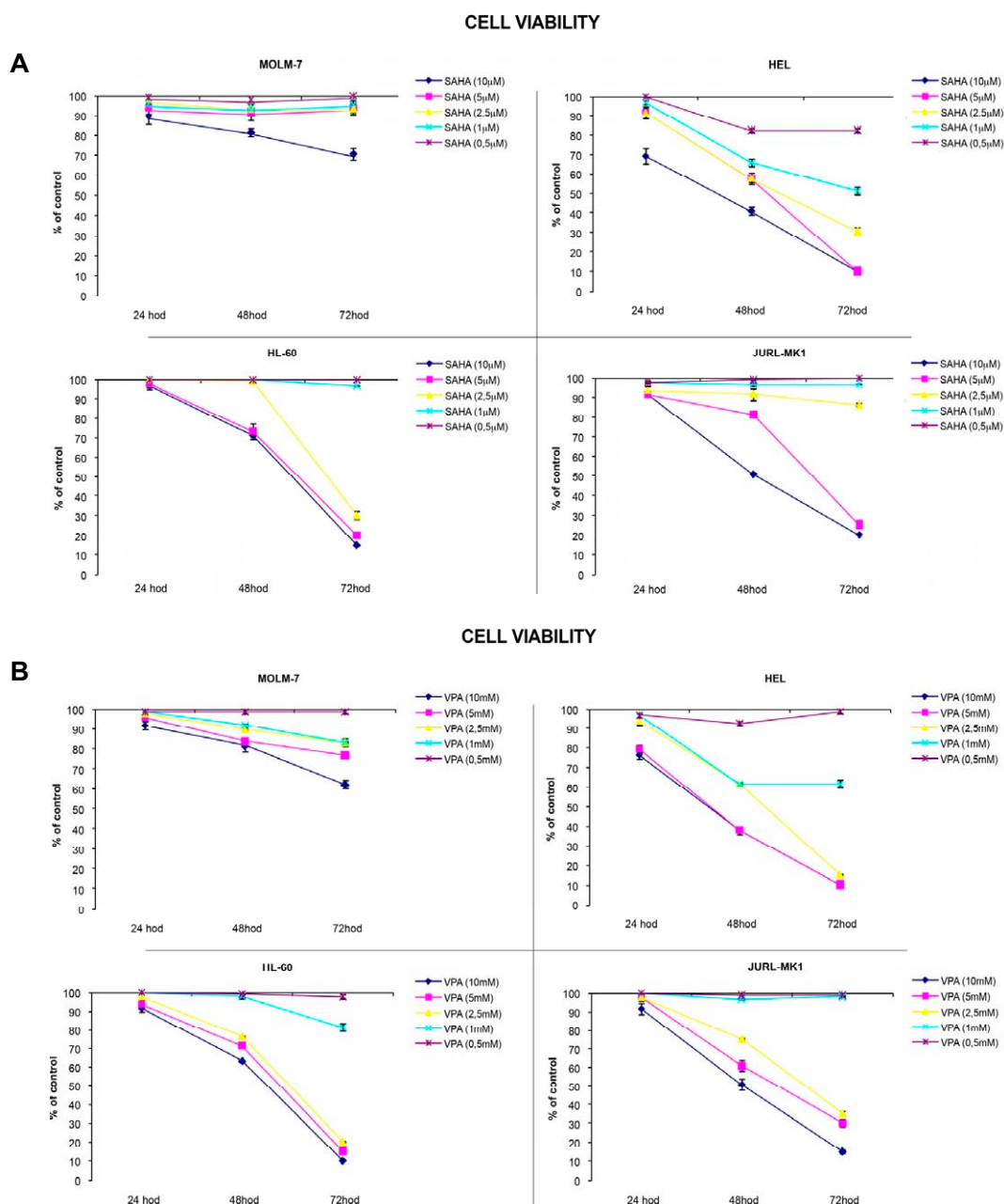
Figure 1. Effect of SAHA and VPA on the proliferation of MOLM-7, HEL, HL-60 and JURL-MK1 leukemic cell lines. Cells were treated with various concentrations (0,5-10  $\mu$ M) of SAHA (A) and (0,5-10 mM) of VPA (B) for up to 72h. The cell aliquots in triplicates were assayed on proliferation with  $^3$ H-thymidine for 4 h. The cells were harvested and the  $^3$ H-thymidine radioactivity was measured in counts/min (cpm). Results are expressed as percentage of untreated control cells and represent mean and standard deviation (SD) of three independent experiments.

sium ferrokyanide, 5 mM potassium ferrikyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM  $MgCl_2$ . After 24 h incubation, photographs were taken under the phase microscope.

## Results

**Both SAHA and VPA inhibited proliferation of leukemic cell lines:** We evaluated the growth-inhibitory effect of HDACi

at concentrations 0,5-10 mM of VPA and/or 0,5-10 mM of SAHA on the variety of leukemic cell lines. Myeloid-megakaryocytic (MOLM-7, JURL-MK1), myeloid-promyelocytic (HL-60) and erythroid-megakaryocytic (HEL) cell lines were treated by SAHA and by VPA for 72h. Both SAHA and VPA inhibited the proliferation of leukemic cell lines in the dose-dependent manner. As shown in Fig.1.A,B the strongest growth-inhibitory effect exhibited concentrations 2,5-10  $\mu$ M SAHA and



**Figure 2.** Viability of MOLM-7, HEL, HL-60 and JURL leukemic cell lines after treatment with SAHA (0,5-10  $\mu$ M) (A) and VPA (0,5-10 mM) (B) for up to 72h. Viability was assessed by Trypan blue exclusion test. Results are expressed as percentage of untreated control cells and represent mean and standard deviation (SD) of three independent experiments.

2,5-10 mM VPA on JURL-MK1, HL-60 and HEL cells during the 72h treatment. In contrast, the antiproliferative effect of SAHA in concentrations 0,5-5  $\mu$ M and VPA in concentrations 0,5-2,5 mM on MOLM-7 was weaker and decreased after the prolonged incubation. The most sensitive leukemic cell line to the treatment by HDACi was the erytroleukemia cell line HEL. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of HDACi on HEL cells was found to be 0,3  $\mu$ M SAHA or 0,3 mM VPA. (Tab.1).

The number of Trypan blue-positive cells gradually increased with the increasing concentration of HDACi during the treatment period. The effect of HDACi in the lowest concentrations (0,5-1 mM VPA or 0,5-1  $\mu$ M SAHA) on the viability of JURL-MK1, HL-60 and MOLM-7 cells was negligible (Fig. 2.A,B). The most pronounced cytotoxic effect was observed in HEL cells for both SAHA and VPA. On the other hand, MOLM-7 cells were the most resistant.

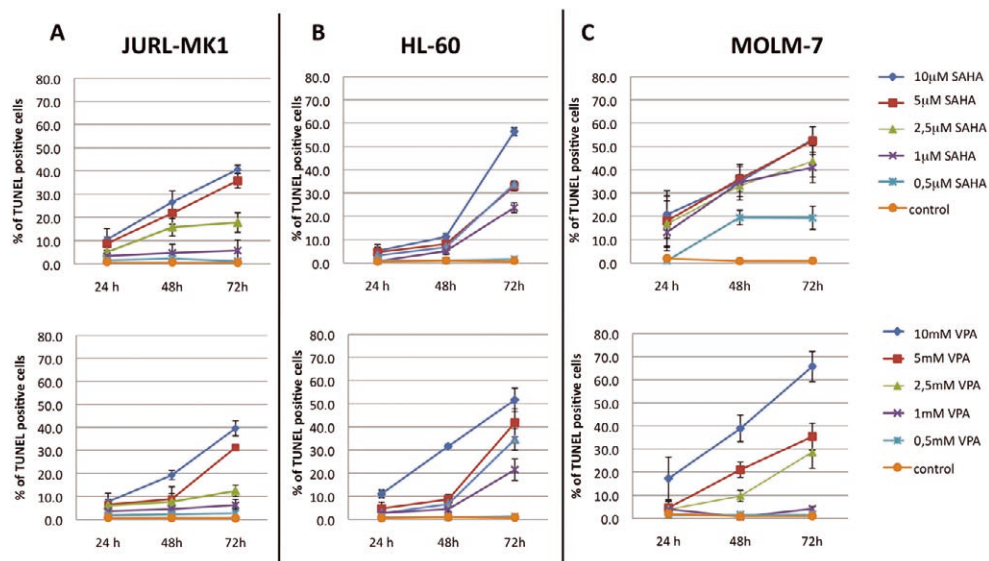
**Table 1.** The growth inhibitory effects of SAHA and VPA on HL-60, HEL, MOLM-7 and JURL-MK1 leukemic cell lines. Cells were treated with various concentrations (0,5-10  $\mu\text{M}$ ) of SAHA and (0,5-10 mM) of VPA for 24, 48 and 72 hours. Each value indicates the mean IC50. Results are expressed as the mean and standard deviation of three independent experiments.

Cell line name	IC50					
	24h		48h		72h	
	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)	SAHA ( $\mu\text{M}$ )	VPA (mM)
HL-60	1,5 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,04
HEL	0,3 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,04
MOLM-7	1,2 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,03	3,8 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1
JURL-MK1	1,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,05	1,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05

**DNA fragmentation and tunel assay:** DNA fragmentation is considered to be the hallmark of the culminating apoptotic process. The cellular fraction having reached this stage of ordered auto-destruction can be determined by the TUNEL method based on the enzymatic fluorescence labeling of DNA strand breaks. Our data have shown that SAHA in concentrations 1  $\mu\text{M}$  and lower, or VPA in concentrations 1 mM and lower, did not induce apoptosis of JURL-MK1 cells during the 72 hours period of treatment. Higher doses of HDACi (2,5-10  $\mu\text{M}$ ) SAHA or (2,5-10 mM) VPA caused an increase of TUNEL-positive cells within the 72h (Fig. 3.A). In HL-60 cells, the highest level of DNA fragmentation was achieved 72h after the addition of 10  $\mu\text{M}$  SAHA or 10 mM VPA and it reached 58% cells in culture. The lower concentrations of HDACi caused an increase of the TUNEL-positive HL-60 cells to 20%-35% for SAHA and 25%-45% for VPA (Fig.3.B). In MOLM-7 cells, concentrations 0,5–10  $\mu\text{M}$  SAHA or 2,5–

10 mM VPA induced apoptosis. The highest level of DNA fragmentation was achieved 72h after the addition of 10 mM VPA and it reached 70% of all cells (Fig. 3.C).

**Cell cycle analysis:** The fraction of cells in the individual cell cycle phases were assessed during the incubation with SAHA or VPA. The treatment of JURL-MK1 cells with 2,5–10  $\mu\text{M}$  SAHA resulted in the accumulation of cells in sub-G1 phase of the cell cycle. The concentration of 0,5  $\mu\text{M}$  SAHA did not influence the cell cycle of JURL-MK1 cells, there was the same distribution as in the controls (Fig.4). VPA in the concentration (5 mM) induced G1/G0 cell cycle arrest after 48h of treatment and SAHA (1  $\mu\text{M}$ ) induced G1/G0 cell cycle arrest after 48h and 72h of treatment of JURL-MK1 cells. During the period of treatment (up to 72h), the highest concentration of VPA (10 mM) showed a growing accumulation of cells in the subG1 phase. The lower concentrations of VPA (0,5-1 mM) induced the same distribution as in controls (Fig.4). In HL-60 and MOLM-



**Figure 3.** Flow cytometry analysis of JURL-MK1 (A), HL-60 (B), MOLM-7 (C) cells induced to apoptosis by HDACi in concentrations (0,5-10  $\mu\text{M}$  for SAHA and 0,5-10 mM for VPA). Fractions of apoptotic cells were determined by TUNEL assay after 24h, 48h and 72h. Data are reported as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



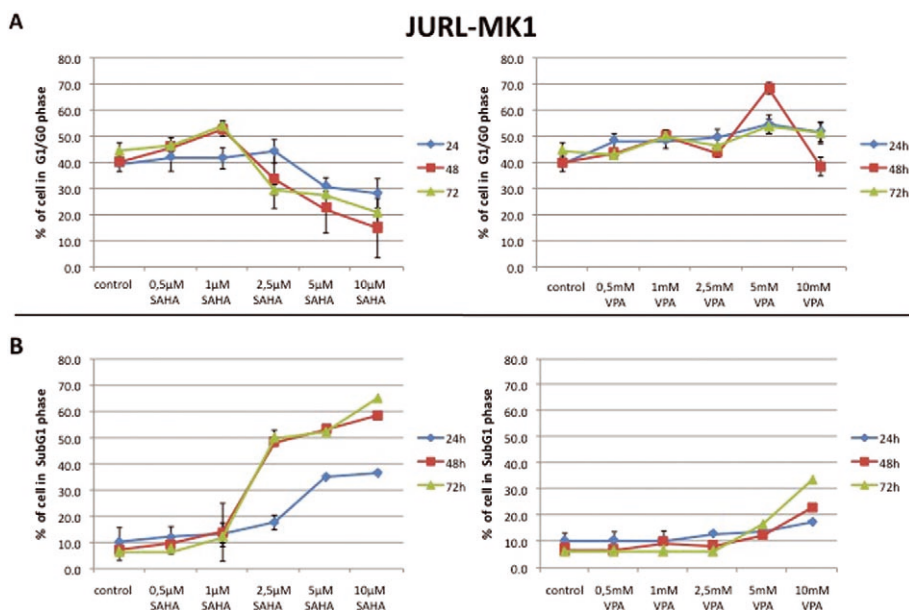


Figure 4. Cell cycle analysis of JURL-MK1 by flow cytometry. The JURL-MK1 were treated with HDACi in concentrations (0,5-10  $\mu$ M for SAHA and 0,5-10 mM for VPA) for 24, 48 and 72 hours (A) Data indicated the percentage of cells in G1/G0 phase. (B) Data indicated the percentage of cells in subG1 phase. Data are reported as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

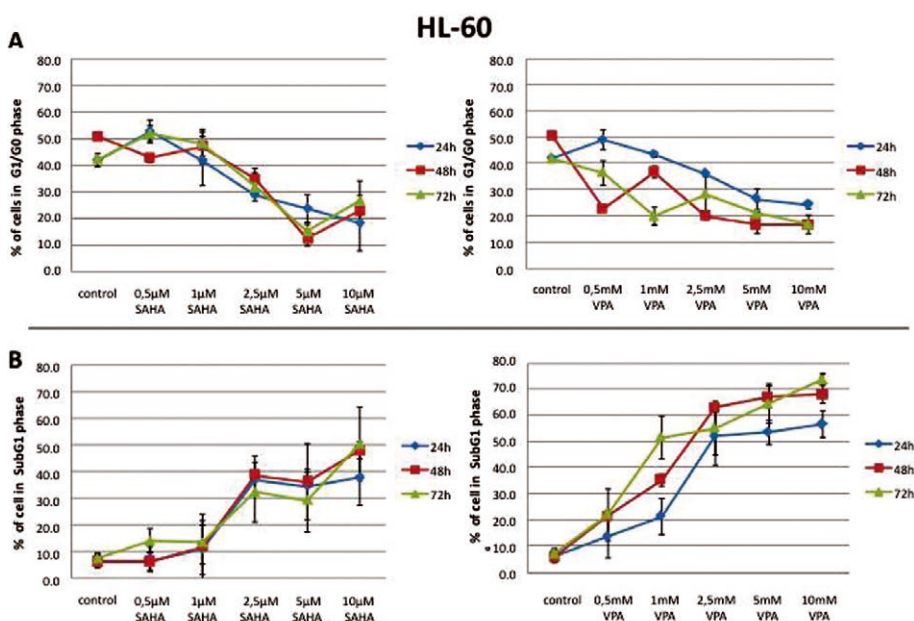


Figure 5. Cell cycle analysis of HL-60 by flow cytometry. The HL-60 were treated with HDACi in concentrations (0,5-10  $\mu$ M for SAHA and 0,5-10 mM for VPA) for 24, 48 and 72 hours (A) Data indicated the percentage of cells in G1/G0 phase. (B) Data indicated the percentage of cells in subG1 phase. Data are reported as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

7 cells, no cell cycle arrest in G1/G0 phase was detected in the presence of SAHA or VPA. However, an increasing number of cells accumulated in the sub-G1 region of the cell cycle during the treatment with increasing concentrations of SAHA and VPA was noted, as is shown in the graphs on Fig. 5,6.

**Induction of senescence.** HDAC inhibitors can induce the growth arrest and apoptosis in many cell types, and they have been recently reported to induce a senescence-like state in normal human fibroblasts [25,26]. Therefore, we attempted to determine whether the HDAC inhibitors SAHA and VPA

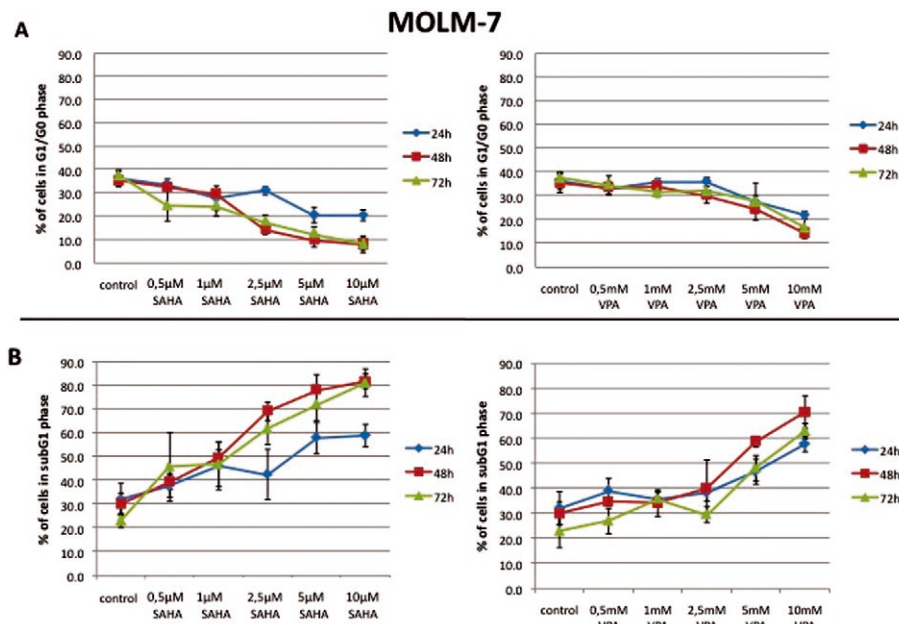


Figure 6. Cell cycle analysis of MOLM-7 by flow cytometry. The MOLM-7 were treated with HDACi in concentrations (0,5-10 µM for SAHA and 0,5-10 mM for VPA) for 24, 48 and 72 hours (A) Data indicated the percentage of cells in G1/G0 phase. (B) Data indicated the percentage of cells in subG1 phase. Data are reported as mean±SD of three independent experiments.

can induce the cellular senescence of MOLM-7, HL-60 and JURL-MK1 leukemic cell lines. As biomarker for the cellular senescence we used the senescence-associated-β-galactosidase (SA-β-gal) activity [27]. MOLM-7, HL-60, JURL-MK1 cells were cultured for 24h, 48h, 72h, 96h and 120h in 1; 2,5; 5 mM VPA and 1; 2,5; 5 µM SAHA containing medium. The JURL-MK1, HL-60 and MOLM-7 cells cultured for 24h, 48h, 72h, 96h in the presence of SAHA or VPA did not express SA-β-gal activity. However, after 120h (5 days) JURL-MK1, HL-60 and MOLM-7 cells treated by HDAC inhibitors acquired the perinuclear staining for SA-β-gal activity and morphology associated with senescent cells (Fig.7). Untreated MOLM-7, HL-60 and JURL-MK1 cells had insignificant SA-β-gal activity.

## Discussion

Epigenetic mechanisms may play an important role in the initiation of tumors by dysregulation of the expression of specific genes [28,29]. Evidence suggests, however, that histone deacetylase inhibitors (HDACi) can reactivate the gene expression and inhibit the growth and survival of tumor cells [30]. Chromatin remodeling by HDACi can induce a DNA damage-like response by the activation of DNA damage kinase ATM [31] and by the formation of DNA strand breaks [32]. The initiation of senescence or apoptosis can be the cellular answer to the DNA damage induced by HDACi [32,33].

Senescent cells appear typically flattened, enlarged, with the increasing cytoplasmic granularity and display an enhanced

activity of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) when assessed in acidic pH [27,34]. Senescent cells remain viable, metabolically active, possess the typical transcriptional profile which distinguishes them from quiescent cells [35]. Such cells can be easily eliminated by the innate immune system, particularly, by natural killer (NK) cells [36].

Apoptosis is characterized by cellular blebbing, exposure of phosphatidylserine at the cell surface, shrinkage of the cell core, DNA condensation and formation of apoptotic bodies, which can be rapidly phagocytized and digested by macrophages or neighbouring cells [37].

In the present study, we evaluated the effects of dosage of HDAC inhibitors SAHA and VPA in series of leukaemia cell lines. We investigated what concentration of SAHA or VPA can optimally induce the cell cycle arrest and what concentration of either compound is able to induce apoptosis or senescence. The mechanism which decides whether cells are driven to senescence or to apoptosis is not known. It has been shown by others that during the apoptotic treatment of tumors the resistance to the particular agent can occur. Some senescent tumor cells can however produce cytokines that may paradoxically initiate the tumor growth of other cells. Nevertheless such senescent cells may also initiate the immune response to cancer cells. From this point of view it is important to select the anticancer agent which will be able to induce both apoptosis and senescence of cancer initiating cells.

Inhibitory effect of HDACi on cell proliferation has been described in both normal and transformed cells [38]. In our study the growth inhibition was observed in all leukemic cell

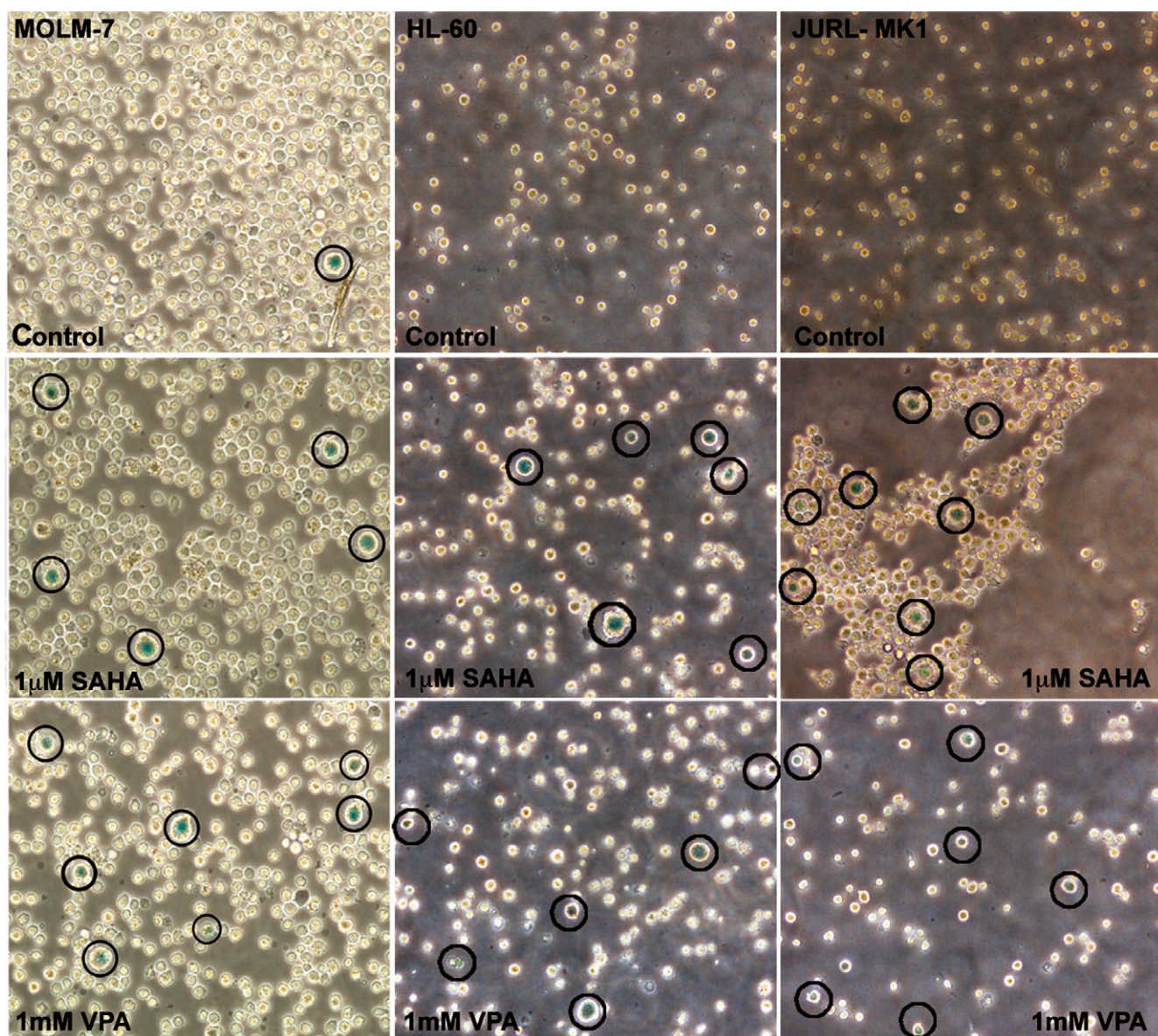


Figure 7. Effects of HDACi on cell senescence-like growth arrest in MOLM-7, HL-60 and JURL-MK1 cells. After 5 days, cells were fixed, analysed for SA- $\beta$ -gal staining (a senescence marker) using a phase-contrast microscope and photographed, after 24h, at x 200 magnification. The level of SA- $\beta$ -gal staining was also determined in untreated MOLM-7, HL-60 and JURL-MK1 cells propagated in parallel (controls).

lines tested and was dose-dependent. The most inhibitory concentration range on the proliferation of leukemic cell lines was 2,5-10  $\mu$ M SAHA and 2,5-10 mM VPA. We also revealed IC<sub>50</sub> at a range of 0,2-3,8  $\mu$ M of SAHA and 0,3-1,6 mM of VPA during the 72h incubation.

Several HDAC inhibitors have been reported to induce apoptosis in many tumor cell types. In our experiments, the induction of apoptosis of individual cell types by SAHA and/or VPA was variable. MOLM-7 cells undergo extensive and fast concentration dependent apoptosis. These results were confirmed by the cell cycle analysis (Fig. 6), where the

cell cycle arrest in G1/G0 phase was not detected. During the treatment, however, the increasing number of cells accumulated in the sub-G1 region of the cell cycle was detected. In contrast to MOLM-7 cells, JURL-MK1 cell line undergoes slower apoptosis in a lower number of cells, as is shown on the Tunel-positive cell fraction (Fig. 3.A). Probably, they undergo other forms of cell death (necrosis or autophagy) as is indicated by the higher fraction of Trypan-blue positive cells during the treatment (Fig. 2). At higher concentration range of SAHA and the highest concentration of VPA JURL-MK1 cells triggered apoptosis as judged from the high cell number accumulated in

the sub-G1 phase. However, at lower concentration of SAHA the JURL-MK1 cells underwent G1/G0 arrest

We also tested the activity of the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) that distinguished the senescent cells from other living cells. The senescence phenotype can be induced by doxorubicin, aphidicolin, cisplatin, ionizing radiation, cytarabine, etoposide, depending on the cellular context and concentration [39]. Tumor cell senescence is also induced by differentiating agents including sodium butyrate and retinoids [40]. Our results indicate, that after 24h, 48h, 72h, 96h HDAC inhibitors did not cause senescence-like arrest process of JURL-MK1, HL-60 and MOLM-7 cells. However, after 5 days of treatment SAHA at concentrations 1 and 2,5  $\mu$ M and VPA at 1 and 2,5 mM induced senescence-like phenotype of JURL-MK1, HL-60 and MOLM-7 cells as shown by the staining of SA- $\beta$ -Gal (Fig. 7). In contrast, the higher doses of HDACi induced more apoptosis than senescence, and this observation is in accordance with the finding of Schwarze et al [38].

These findings indicate that the mechanism of SAHA/VPA action is complex and the resulting effect depends on the individual cell context. In conclusion our data demonstrate that the effect of SAHA is stronger than VPA even in the 1000x lower concentration of SAHA used in the induction of apoptosis and inhibition of proliferation. Nevertheless, the effect of VPA action is moderate and it induces predominantly the proliferation arrest, but after the prolonged treatment apoptosis was induced. HDAC inhibitors induce more strongly and quickly apoptosis than senescence. Longer incubation time (5 days) and lower concentration of HDACi is needed for induction of senescence while apoptosis appeared already after 24h by higher doses of HDACi (mainly by SAHA). The ideal induction doses are 2,5-5  $\mu$ M SAHA and 2,5-5 mM VPA. Both agents induce apoptosis and senescence.

**Acknowledgement:** We gratefully acknowledged the skilful technical assistance of Mrs. G. Lindnerová and Mrs. J. Němcová. We also acknowledge many helpful ideas and comments of Dr. K. Kuželová, Ph.D. The study was supported by grant MZO 0002373601 of the Internal Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

## References

- [1] MEHNERT JM. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *The Cancer Journal* 2007, 13: 23–29. [doi:10.1097/PPO.0b013e31803c72ba](https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31803c72ba)
- [2] MINUCCIS, PELICCI PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat rev Cancer* 2006, 6: 38–51. [doi:10.1038/nrc1779](https://doi.org/10.1038/nrc1779)
- [3] STRAHL BD, ALLIS CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000, 403: 41–45. [doi:10.1038/47412](https://doi.org/10.1038/47412)
- [4] STRUHL K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanismus. *Genes Dev.* 1998, 12: 599–606. [doi:10.1101/gad.12.5.599](https://doi.org/10.1101/gad.12.5.599)
- [5] CLAUS R, LUBBERT M. Epigenetic target in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2003, 22: 6489–6496. [doi:10.1038/sj.onc.1206814](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206814)
- [6] KELLY WK, MARKS PA. Drug insight: histone deacetylase inhibitors- development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol* 2005, 2: 150: 157.
- [7] VIGUSHIN DM, COOMBES. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs.* 2002, 12: 599–606.
- [8] MARKS PA, RICHON VM, BRESLOW R, RIFKIND RA. Histone deacetylase inhibitors as a new cancer drugs. *Curr Opin Oncol.* 2001, 13: 477–483. [doi:10.1097/00001622-200111000-00010](https://doi.org/10.1097/00001622-200111000-00010)
- [9] MARKS PA, RICHON VM, RIFKIND RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000, 92: 1210–1216. [doi:10.1093/jnci/92.15.1210](https://doi.org/10.1093/jnci/92.15.1210)
- [10] ROMANSKIOMANSKI A, BASIC B. Use a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2004, 89: 419–426.
- [11] KNEFER R, HOFER MD, ALTUG V, ZORN C, GENZE Fet al. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004, 90: 535–541. [doi:10.1038/sj.bjc.6601510](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601510)
- [12] KIM YB, KI SW, YOSHIDA M, HORINOUCHE S. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot (Tokyo).* 2000, 53: 1191–1200.
- [13] SANDOR V, BAKKE S, ROBEY RW, KANG MH, BLAGOSK-LONNY MV et al. Phase I. trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2002, 8: 718–728.
- [14] MARKS PA, RIFKIND RA. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature.* 2001,1: 194–202.
- [15] PIEKARZ RL, ROBEY RW, ZHAN Z, KAYASTHA G, SAYAH A et al. T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. *Blood* 2004, 12: 4636–4643.
- [16] CINATL J Jr, CINATL J, DRIEVER PH, KOTCHEKOV R, POUCKOVA P et al. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs.* 1997, 8: 958–963. [doi:10.1097/00001813-199711000-00007](https://doi.org/10.1097/00001813-199711000-00007)
- [17] OLSEN CM, MEUSSSEN-ELHOLM ET, ROSTE LS, TAUBOLL E. Antiepileptic drugs inhibits cell growth in the human breast cancer cell line MCF7. *Mol Cell Endocrinol.* 2004, 213: 173–179. [doi:10.1016/j.mce.2003.10.032](https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.032)
- [18] TANG R, FAUSSAT AM, MAJDAK P, PERROT JY, CHAOUI D et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells expressing P-pg and MRP1. *Leukemia.* 2004, 18: 1246–1251. [doi:10.1038/sj.leu.2403390](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403390)
- [19] REBBAA A, ZHENG X, CHOU PM, MIRKIN BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene.* 2003, 22: 2805–11. [doi:10.1038/sj.onc.1206366](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206366)
- [20] KIM R, EMI M, TANABE K, UCHIDA Y, ARIHIRO K. The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining

- cellular response to anticancer treatment. *Eur J Surg Oncol*. 2006; 32: 269–77. [doi:10.1016/j.ejso.2005.12.006](https://doi.org/10.1016/j.ejso.2005.12.006)
- [21] Narita M, Nunez S. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003; 113: 703–16.
- [22] Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005; 120: 513–22.
- [23] LEE BY, HAN JA, IM JS, MORRONE A, JOHUNG K et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006; 5: 187–95. [doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x](https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x)
- [24] XUE W, ZENDER L, MIETHING C, DICKINS RA, HERNANDEZ E et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007; 445: 656–60. [doi:10.1038/nature05529](https://doi.org/10.1038/nature05529)
- [25] MUNRO J, BARR NI, IRELAND H, MORRISON V, PARKINSON EK. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res*. 2004; 295: 525–38. [doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.017](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.01.017)
- [26] OGRYZKO VV, HIRAI TH, RUSSANOVA VR, BARBIE DA, HOWARD BH. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 5210–8.
- [27] DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT GET al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 9363–7. [doi:10.1073/pnas.92.20.9363](https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363)
- [28] LI LC, CARROLL PR, DAHIYA R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 103–15. [doi:10.1093/jnci/dji010](https://doi.org/10.1093/jnci/dji010)
- [29] AHN MY, JUNG JH, NA YJ, KIM HS. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammoplanin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2008; 108: 27–33. [doi:10.1016/j.ygyno.2007.08.098](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.098)
- [30] KOURAKLIS G, THEOCHARIS S. Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy. *Oncol Rep*. 2006; 15: 489–94.
- [31] BAKKENIST CJ, KASTAN MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003; 421: 499–506. [doi:10.1038/nature01368](https://doi.org/10.1038/nature01368)
- [32] GAYMES TJ, PADUA RA, PLA M, ORR S, OMIDVAR N et al. Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol Cancer Res*. 2006; 4: 563–73. [doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0111](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0111)
- [33] TE POELE RH, OKOROKOV AL. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2002; 62: 1876–83.
- [34] KAHLEM P, DORKEN B, SCHMITT CA. Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe? *J Clin Invest*. 2004; 113: 169–74.
- [35] SHELTON DN, CHANG E, WHITTIER PS, CHOI D, FUNK WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*. 1999; 9: 939–45.
- [36] REN JL, PAN JS, LU YP, SUN P, HAN J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cell Signal*. 2009; 21: 378–83.
- [37] LAUBER K, BLUMENTHAL SG, WAIBEL M, WESSELBORG S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*. 2004; 14: 277–87. [doi:10.1016/S1097-2765\(04\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00237-0)
- [38] SCHWARZE SR, FU VX, DESOTELLE JA, KENOWSKI ML, JARRARD DF. The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia*. 2005; 7: 816–23. [doi:10.1593/neo.05250](https://doi.org/10.1593/neo.05250)
- [39] CHANG BD, BROUDE EV, DOKMANOVIC M, ZHU H, RUTH A et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999; 59: 3761–7.
- [40] SHAY JW, RONINSON IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004; 23: 2919–33. [doi:10.1038/sj.onc.1207518](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207518)

## Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) at Subtoxic Concentrations Increases the Adhesivity of Human Leukemic Cells to Fibronectin

Kateřina Kuželová,\* Michaela Pluskalová, Barbora Brodská, Petra Otevřelová, Klára Elknerová, Dana Grebeňová, and Zbyněk Hrkal

*Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic*

### ABSTRACT

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) is an inhibitor of histone deacetylases (HDACs) which is being introduced into clinic for the treatment of hematological diseases. We studied the effect of this compound on six human hematopoietic cell lines (JURL-MK1, K562, CML-T1, Karpas-299, HL-60, and ML-2) as well as on normal human lymphocytes and on leukemic primary cells. SAHA induced dose-dependent and cell type-dependent cell death which displayed apoptotic features (caspase-3 activation and apoptotic DNA fragmentation) in most cell types including the normal lymphocytes. At subtoxic concentrations (0.5–1  $\mu$ M), SAHA increased the cell adhesivity to fibronectin (FN) in all leukemia/lymphoma-derived cell lines but not in normal lymphocytes. This increase was accompanied by an enhanced expression of integrin  $\beta$ 1 and paxillin, an essential constituent of focal adhesion complexes, both at the protein and mRNA level. On the other hand, the inhibition of ROCK protein, an important regulator of cytoskeleton structure, had no consistent effect on SAHA-induced increase in the cell adhesivity. The promotion of cell adhesivity to FN seems to be specific for SAHA as we observed no such effects with other HDAC inhibitors (trichostatin A and sodium butyrate). *J. Cell. Biochem.* 109: 184–195, 2010. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** SUBEROYLANILIDE HYDROXAMIC ACID; ADHESION; HEMATOPOIETIC CELL; APOPTOSIS; INTEGRIN; PAXILLIN

The acetylation status of core histones resulting from the antagonistic activities of histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HATs) represents an important regulatory element of gene transcription [Monneret, 2005]. HDACs are recruited to target genes via their association with transcription activators and repressors, as well as their incorporation into large multiprotein complexes. Although diminished histone acetylation at promoter regions generally correlates with gene silencing, there is also evidence that HDACs can activate some genes [Haberland et al., 2009]. Deletion or inhibition of HDACs often results in the upregulation or downregulation of approximately equivalent percentages of genes. In addition to histones, at least 50 other proteins with known biological function are substrates for HDACs. The mammalian nonhistone HDAC substrates comprise transcription factors with DNA-binding affinity (e.g., p53, c-Myc, E2F, BCL-6, GATA), other transcription regulators (e.g., Rb protein), signal transmitters, DNA repairing enzymes, chaperones (e.g., HSP90), or cytoskeletal proteins ( $\alpha$ -tubulin).

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, other names: Vorinostat, Zolinza) is the first member of the group of HDAC inhibitors which has received Food and Drug Administration approval for treating patients with cutaneous T-cell lymphoma in the USA [Duvic and Vu, 2007; Marks and Breslow, 2007]. While it is also evaluated in clinical trials for the treatment of other oncological and hematological diseases [O'Connor et al., 2006; Crump et al., 2008; Modesitt et al., 2008; Richardson et al., 2008], the mechanism of its action is largely unexplained [Xu et al., 2007]. This is equally true for other HDAC inhibitors which can be divided into several structural classes including short-chain fatty acids (e.g., sodium butyrate, valproic acid, . . .), hydroxamates (SAHA, trichostatin A, . . .), cyclic peptides (trapoxin A, depsipeptid, . . .), and benzamides (MS275, . . .) [Dokmanovic et al., 2007].

In a general way, HDAC inhibitors can induce proliferation arrest, terminal differentiation, or death of transformed cells. The latter process can resemble apoptosis, mitotic catastrophe, autophagy, senescence, or reactive oxygen species-mediated cell death [Ruefli

Grant sponsor: Grant Agency of the Czech Republic; Grant number: 301/09/1026; Grant sponsor: Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic; Grant number: NR/9243-3.

\*Correspondence to: Dr. Kateřina Kuželová, Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic. E-mail: kuzel@uhkt.cz

Received 4 September 2009; Accepted 30 September 2009 • DOI 10.1002/jcb.22397 • © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Published online 12 November 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

et al., 2002; Mitsiades et al., 2004; Rosato and Grant, 2004; Shao et al., 2004; Yu et al., 2005; Lindemann et al., 2007]. The cell response to the treatment with a HDAC inhibitor is variable depending on the individual inhibitor, the dose, the treatment time, and on the cell type. In any case, the effects are pleiotropic and include activation or inactivation of multiple signaling pathways. SAHA binds to Zn<sup>2+</sup> in the active site of individual HDACs belonging to classes I and II and often induces mitochondrial apoptosis governed by Bcl-2 protein family. It has been suggested that the apoptosis can be triggered as a result of DNA damage caused by HDAC inhibitors [Gaymes et al., 2006]. Activation of the extrinsic apoptotic pathway has also been reported [Gillenwater et al., 2007]. The changes in the gene expression upon treatment of cell lines or patient primary cells with SAHA have been studied prevalently using DNA microarrays [Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005; Desmond et al., 2007; Tavares et al., 2008; Kumagai et al., 2009]. In the individual reports, the transcription rate was found to be altered in 2–10% of all expressed genes. However, the attempts to identify the altered genes on both RNA and protein levels [Tong et al., 2008] have given only moderate overlap among different cell systems. The most consistent change occurring after SAHA treatment seems to be the induction of the cell cycle regulators p21 and p27 resulting in cell cycle arrest which protects the cell against the toxic effects of the drug [Gui et al., 2004]. At higher SAHA concentration or as a result of simultaneous inhibition of MEK/ERK and Akt transduction pathways, mitochondrial apoptosis is usually triggered. The mechanism of cell death often, but not systematically, involves the production of reactive oxygen species [Marks and Jiang, 2005; Xu et al., 2007; Brodská et al., 2009].

In this work, we report on changes in cellular adhesivity to fibronectin (FN), an essential component of bone marrow extracellular matrix (ECM), which were induced by SAHA in human hematopoietic cells. We describe the effects of SAHA on the expression of integrin  $\beta$ 1 on the cell surface as well as on the expression level of paxillin, a characteristic member of focal adhesions, that is, the protein complexes which are assembled around the cytoplasmic parts of integrins upon cell binding to the ECM. We also studied the role of the proteins ROCK in these processes and concluded that this regulators of actin cytoskeletal structure are not essentially involved in the observed SAHA-induced increase of cellular adhesivity to FN.

## MATERIALS AND METHODS

### CHEMICALS

SAHA was supplied by Alexis (San Diego, USA). Human FN (alpha-chymotryptic fragment, 120K) was purchased from Chemicon International (CA, USA), anti-paxillin antibody (clone 5H11) from Millipore (Upstate). The labeled antibodies against integrins  $\beta$ 1 (CD29) and  $\beta$ 2 (CD18) were from Chemicon International and Exbio (Prague, Czech Republic), respectively. Anti-actin antibody, FITC-labeled phalloidin, and the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC were obtained from Sigma (Prague, Czech Republic). The inhibitor Y-27632 which inhibits ROCK1 and ROCK2 was from Calbiochem.

### CELL CULTURE AND LYMPHOCYTE PREPARATION

JURL-MK1, CML-T1, and Karpas-299 cells were purchased from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany), K562 and HL-60 cell lines from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK). The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

Blood samples were prepared from buffy coats taken from healthy volunteers or from the whole blood of patients with chronic myelogenous leukemia (CML) or acute myeloid leukemia (AML) following their written informed consent. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by standard density gradient centrifugation using Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma). Monocytes were depleted by overnight culture in plastic flasks and by harvesting of nonadherent cells. The lymphocytes were further maintained in RPMI 1640 medium as described above for the cell lines. The fraction of CD34-positive cells in the bone marrow of CML patients was from 1% to 3%.

### ADHESION ASSAY

The extent of cell adhesivity to FN was assessed by fluorometric quantitation of cells attached to FN-coated wells of a microtitration plate. The fraction of adherent cells was determined by comparing the fluorescence signal arriving from FN-coated plate with that from a reference plate containing the total cell amount. To prepare the coated plate, 50  $\mu$ l of FN solution (20  $\mu$ g/ml in distilled water) was added to each well of a Nunc Maxisorp microtitration plate which was subsequently incubated overnight in the cold. Then, the wells were washed three times in PBS and the remaining protein adherence sites were blocked by 200  $\mu$ l 1% BSA in PBS for at least 30 min at room temperature. The plate was washed once again in PBS and 100  $\mu$ l of cell suspension at a density of  $1 \times 10^5$  cells/ml was added to the wells in quadruplicates. The cell density used in the assay was determined as a good compromise between the need to obtain sufficiently high fluorescent signal and the effort to minimize the effects of cell–cell interactions on the results of the assay. The same amount of cells was added in quadruplicates to the reference plate. A special care was taken of frequent gentle mixing to assure high homogeneity of the suspension. The FN-coated plate was shortly centrifuged (350g for 2 min) and incubated for 1 h at 37°C. Then, the culture medium was uniformly aspirated using a multichannel adaptor to the suction-pump (Sigma), the wells were filled with 200  $\mu$ l PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PBS, pH 7.4, supplemented with 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 1 mM Mg<sup>2+</sup>) using a multichannel pipette, the plate was re-aspirated and frozen at –70°C. In the meantime, the reference plate was centrifuged at 400g for 10 min to pellet the cells, gently inverted (bottom-up), the medium was tapped-out, the plate was shortly blotted onto a paper towel and frozen at –70°C.

Cy-Quant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes) was used to quantitate the samples according to manufacturer's instructions. Briefly, the plates were thawed (10 min at room temperature), 200  $\mu$ l of dye/cell lysis solution was added to each well including four blanks (without cells) and the plates were incubated for 10 min in the dark. The well fluorescence (excitation at 485 nm, emission at 520 nm) was measured, the quadruplicates were

averaged and the adherent cell fraction (ACF) was calculated as follows:

$$\text{ACF} = \frac{F_{\text{FN}} - F_{\text{B}}}{F_{\text{REF}} - F_{\text{B}}} \times 100\%$$

where  $F_{\text{FN}}$ ,  $F_{\text{REF}}$ , and  $F_{\text{B}}$  are the average fluorescence intensities of the wells from FN-coated plate, reference plate, and blanks, respectively.

The standard error of quadruplicates was typically of 3–8% of the measured value.

### CASPASE-3 ACTIVITY ASSESSMENT

The activity of caspase-3 was determined by fluorometric measurement of the kinetics of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC) release from the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC in the presence of cell lysates. The method was described in detail in Kuželová et al. [2007]. After the incubation with 0.5 or 2  $\mu\text{M}$  SAHA the cells were washed and lysed and aliquots of cytosolic fractions were incubated for 30 min at 37°C with the fluorogenic substrate. The linear increase of fluorescence intensity at 520 nm was monitored during this incubation time using Fluostar Galaxy microplate reader (BMG Labtechnologies, Germany).

### FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

Flow cytometry measurements were performed on Coulter Epics XL flow cytometer.

The fraction of cells containing apoptotic DNA breaks was measured by TUNEL assay using the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) following the standard manufacturer's protocol.

To analyze the expression level of integrins on the cell surface, the cells ( $5 \times 10^5$ ) were washed in PBS and stained with 5  $\mu\text{l}$  PE-conjugated anti-integrin  $\beta 1$  or 10  $\mu\text{l}$  FITC-conjugated anti-integrin  $\beta 2$  antibody. After 40 min incubation at room temperature, the cells were washed twice in PBS and the fluorescence histograms of red or green fluorescence were recorded using the flow cytometer.

To stain the actin polymers, the cells were washed in PBS and fixed and permeabilized using FIX&PERM cell permeabilization kit from An Der Grub (Kaumberg, Austria). Washing steps were performed in PBS supplemented with 1% BSA using short centrifugation times (2 min at 350g). FITC-labeled phalloidin (3  $\mu\text{l}$ ) was added to cells suspended in 50  $\mu\text{l}$  PERM solution. The samples were incubated for 40 min at room temperature, washed in PBS + 1% BSA and the green fluorescence was measured using the flow cytometer.

### RNA EXTRACTION AND RT-PCR

The extraction of RNA from cells cultured in the absence or presence of 0.5  $\mu\text{l}$  SAHA was carried out using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The purified RNA was stored at  $-75^\circ\text{C}$  until use. Semi-quantitative RT-PCR was performed using 2  $\mu\text{g}$  of total RNA and One-Step RT-PCR kit (Qiagen). The sequences of specific primers (Invitrogen) were designed using the Primer-BLAST software available in NCBI database as follows: integrin  $\beta 1$ —GCGCGAAAAGATGAATTT (forward) and CCCCTGATCTTAATCG-

CAAA (reverse); paxillin transcription variant 2—CCATCACTGT-GAACCAGGG (forward) and TTTCACAGTAGGGCTGTCCA (reverse). The RT-PCR program applied on Techne Cyclogene thermocycler (Techne, Cambridge, UK) was: 30 min at 50°C for reverse transcription, 15 min at 95°C for HotStarTaq DNA polymerase activation, Omniscript and Sensiscript reverse transcriptases inactivation and the cDNA template denaturation followed by 20–30 cycles consisting of 1 min denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 60°C, and 2 min of extension at 72°C. The program was terminated by a final extension of 10 min at 72°C. Amplified products were detected on electrophoretic agarose gels containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ethidium bromide. The integrated intensities of fluorescent bands were obtained using the Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) and analyzed using AIDA 1D v. 4.08 evaluating software (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany). In all experiments,  $\alpha$ -actin was used as the loading standard and the integrated fluorescent intensities of studied bands were corrected to small differences in the amount of total RNA loaded using the values from actin bands.

### ELECTROPHORESIS AND WESTERN BLOTTING

The SDS electrophoresis and Western blotting were performed using the protocols which were described previously [Kuželová et al., 2007]. The protein concentration was measured using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories). As a rule, 15  $\mu\text{g}$  total protein was applied to each well. Actin band was used as a control of equal protein loading.

## RESULTS

We studied the effects of SAHA on different leukemic cell lines as well as on lymphocytes from healthy donors. The cell lines included three lines derived from patients with CML (JURL-MK1, K562, and CML-T1) and lines derived from human AML (HL-60) and human T-cell lymphoma (Karpas-299). Treatment with SAHA induced a decrease of the cell proliferation rate, which was similar for all the studied cell lines (data not shown) and cell death. The cytotoxic effects were strongly dose-dependent and cell type-dependent. Figure 1 shows the extent of DNA fragmentation, a characteristic marker of apoptosis, after 48 h treatment of cells with SAHA at different concentrations. DNA from control and treated cells was analyzed using TUNEL method which consists in fluorescent labeling of apoptotic DNA breaks. We also assessed the activation of caspase-3, another hallmark of apoptosis, using the fluorogenic caspase-3 substrate, Ac-DEVD-AFC. Figure 2A shows the kinetics of caspase-3 activation in JURL-MK1 cells treated with 0.5 or 2  $\mu\text{M}$  SAHA. Similar kinetics was seen in the other cell lines. The values of caspase-3 activity in different cell lines after 28–30 h treatment (i.e., time of maximal activity) with 0.5 or 2  $\mu\text{M}$  SAHA are given in Figure 2B.

Although SAHA triggers apoptosis in many cell types including normal lymphocytes, other forms of cell death are also likely to be induced by the treatment. Figure 3 shows the fraction of dead cells (i.e., cells not able to exclude the Trypan-blue dye) resulting from 48 h treatment of different cell lines with 0.5 or 2  $\mu\text{M}$  SAHA. The cell



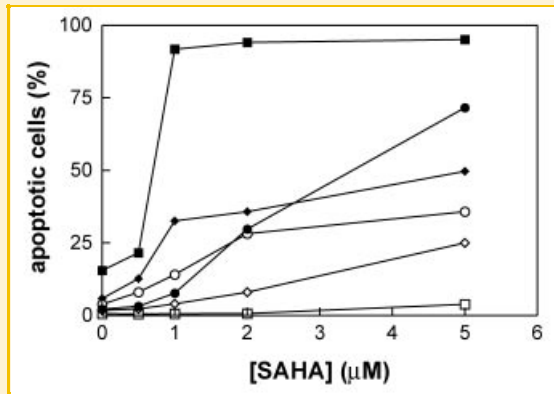


Fig. 1. Apoptotic DNA fragmentation induced by SAHA in different leukemic cell lines and donor lymphocytes. Cells were treated with SAHA at different concentrations for 48 h, harvested and stained with fluorescein-dUTP using TUNEL method to obtain the fraction of cells with apoptotic DNA breaks. Different symbols correspond to different cell lines: K562 (open squares), HL-60 (closed squares), JURL-MK1 (closed circles), Karpas-299 (open diamonds), CML-T1 (closed diamonds), and donor lymphocytes (open circles).

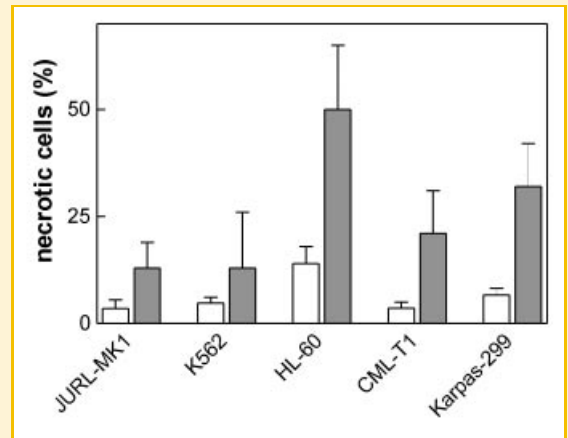


Fig. 3. Cell death induced by SAHA in different cell lines. The cells were treated with 0.5  $\mu$ M (clear bars) or 2  $\mu$ M (dark bars) SAHA for 48 h and the fraction of Trypan blue-positive cells was determined by cell counting. The results are means and standard deviations from 4 to 15 independent experiments.

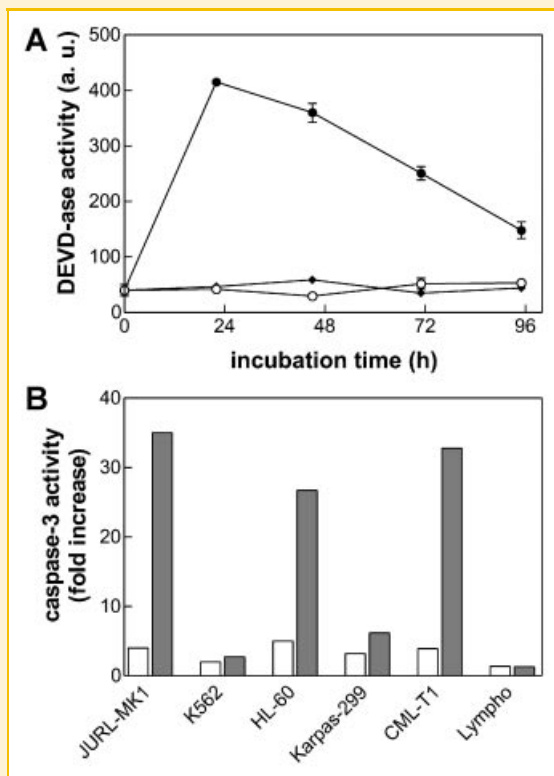


Fig. 2. Caspase-3 activation in SAHA-treated leukemic cells and donor lymphocytes. The cells were treated with 0.5 or 2  $\mu$ M SAHA for different time intervals and the activity of caspase-3 in cell lysates was assessed using the fluorogenic caspase-3 substrate Ac-DEVD-AFC. Panel A: The kinetics of caspase-3 activation in JURL-MK1 cells treated with SAHA at 0.5  $\mu$ M (diamonds) or 2  $\mu$ M concentration (closed circles). Open circles: JURL-MK1 cells without treatment. Panel B: The maximal values of caspase-3 activity after treatment with SAHA 0.5  $\mu$ M (clear bars) or 2  $\mu$ M (dark bars) for different cell lines and donor lymphocytes. The results are expressed as ratios of caspase-3 activity in treated cells and in the controls.

lines Karpas-299 and K562, which are relatively resistant to SAHA-induced apoptosis, are also damaged by 2  $\mu$ M SAHA treatment. On the other hand, no significant toxicity was observed when SAHA was used at 0.5  $\mu$ M concentration. Although HL-60 cells are more sensitive to SAHA-induced cell death in comparison with the other cell types, the difference between controls and samples treated with 0.5  $\mu$ M SAHA is not large (HL-60 cells display relatively high level of spontaneous apoptosis even without treatment and the fraction of Trypan blue-positive cells in controls is also higher compared to controls from other cell types).

We noted during our studies on adhesion properties of leukemic cells that SAHA alters the cell adhesivity to FN. Normal hematopoietic cells are retained in the bone marrow until their maturation and release into the blood circulation. The main contribution to the attachment forces is provided by the interaction of cellular  $\beta$  integrins, transmembrane glycoproteins, with protein components of ECM. We performed the analysis of integrin composition in JURL-MK1 and K562 cells using Beta Integrin-Mediated Cell Adhesion Array kit (Fig. 4A) and compared the interaction of these cells with different ECM proteins using Cytomatrix Screen kit (Fig. 4B). We concluded from these results that the most relevant interaction partners for cell attachment to ECM are integrins  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 and FN. We thus used microtitration plates coated with FN for subsequent study of the effects of SAHA on cell adhesion to ECM. The protocol we adopted allows for sensitive and reproducible determination of the cell fraction which remained attached to FN after the plate washing (ACF). As the ACF varies between different cell types, the results were also expressed as a ratio of ACF values obtained from treated samples and the corresponding controls. This representation is used in Figure 5 which shows the effect of SAHA at different concentrations (48 h treatment) on the adhesion of cell lines and normal lymphocytes to FN. SAHA increased the ACF in all studied cell lines but not in normal lymphocytes. This effect was usually maximal at 0.5–1  $\mu$ M SAHA concentration while higher SAHA doses were less effective. The only

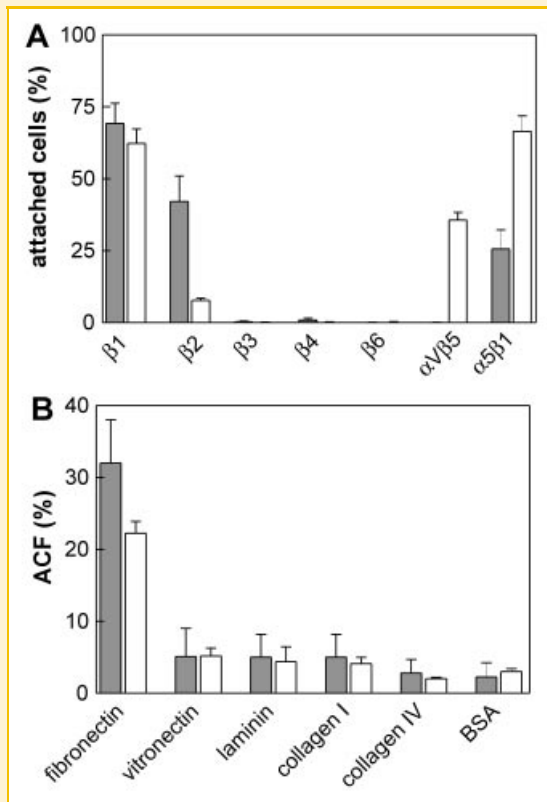


Fig. 4. Analysis of  $\beta$ -integrin expression on the surface of JURL-MK1 and K562 cells and of the cell interaction with different ECM proteins. Panel A: JURL-MK1 (dark bars) and K562 (clear bars) cell attachment to wells coated with antibodies against different  $\beta$ -integrins was studied using Beta Integrin-Mediated Cell Adhesion Array kit. Panel B: The fraction of JURL-MK1 (dark bars) and K562 (clear bars) cells which adhere to wells coated with different ECM proteins was obtained using Cytomatrix Screen kit.

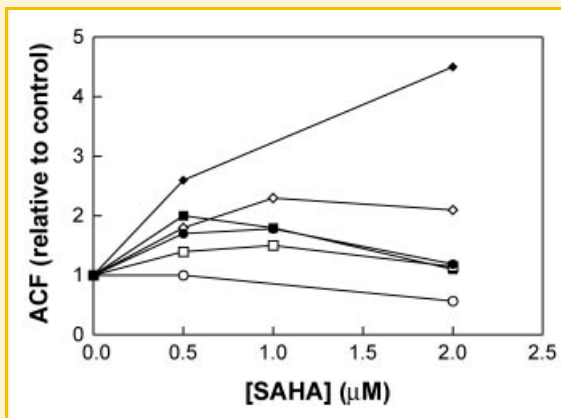


Fig. 5. Effect of SAHA on the extent of cell adhesion to fibronectin. The cells were treated for 48 h with SAHA at different concentrations and the adherent cell fraction (ACF) was determined using fluorometric determination of the quantity of cells which remained attached to fibronectin-coated wells of a microplate after the plate washing. The represented results are expressed as ratios of ACFs from treated cells and ACFs from the appropriate controls. The legend to symbols is the same as in Figure 1: K562 (open squares), HL-60 (closed squares), JURL-MK1 (closed circles), Karpas-299 (open diamonds), CML-T1 (closed diamonds), and donor lymphocytes (open circles).

exception is represented by CML-T1 cells which also distinguishes from other cell lines by markedly lower adhesivity (ACFs in controls are 2–4% compared to about 30–40% for other cell lines). In subsequent experiments, we focused on 0.5  $\mu\text{M}$  SAHA which increased the adhesivity in all cell lines without exhibiting significant toxicity and we collected a large set of data for six cell lines (including the previously specified ones and AML cell line ML-2) and primary lymphocytes (Table I). The treatment time was fixed to 48 h as the maximal effect was achieved at this time, although increase in ACF occurred already after 24 h treatment. It follows from the statistical analysis of these data that SAHA-induced increase in the cell adhesivity is significant and similar for all leukemia cell lines regardless of their origin while no effect is produced in normal lymphocytes under the same experimental conditions. A slight but statistically significant increase in cell adhesivity was also found in primary cells from CML patients. We tested in addition three primary samples from acute myelogenous leukemia (AML) patients, but the results were inconclusive (26% increase due to SAHA in one of them and 36%, resp. 50% decrease in two others).

As the cell interaction with FN appears to be mainly mediated by integrin  $\beta 1$ , we wondered if SAHA alters the expression of this protein on the cell surface. JURL-MK1, K562, Karpas-299, CML-T1, and HL-60 cells were thus treated with 0.5  $\mu\text{M}$  SAHA for 48 h, stained with fluorescently labeled anti-integrin  $\beta 1$  antibody and analyzed using a flow-cytometer. Firstly, we inspected the scattergrams, that is, plots of side-scattered light intensity (SSC), versus forward-scattered light intensity (FSC) which were usually not significantly altered by the treatment with SAHA. This indicates that SAHA at 0.5  $\mu\text{M}$  concentration does not induce changes in the cell size and shape which is in agreement with the lack of toxicity under these conditions (data not shown). In some experiments, especially in those with HL-60 cells, a distinct cell subpopulation was present at lower FSC and higher SSC. This probably reflects apoptotic cell shrinkage and membrane blebbing occurring in a small cell fraction. Subsequently, we analyzed the expression of  $\beta 1$  integrin on the cell surface using PE-conjugated anti- $\beta 1$  integrin antibody. Representative histograms of fluorescence intensities obtained following the cell staining are given in Figure 6. A shift towards higher fluorescence intensities was repeatedly observed after treatment of JURL-MK1, K562, Karpas, and CML-T1 cells with SAHA. The average increase in the mean fluorescence intensity (MFI) from repeated experiments is also indicated in the figure. In the case of HL-60 cells, no consistent change of MFI was observed for the “intact” cells (i.e., those with unchanged scattering properties) while the altered cell subpopulation (lower FSC, higher SSC) displayed slightly decreased staining of  $\beta 1$  integrin (data not shown). We also explored the expression of  $\beta 2$  integrin using a FITC-conjugated antibody, but the fluorescence signal obtained in this case was very weak indicating that the expression of  $\beta 2$  integrin is low in comparison with that of  $\beta 1$  in our model systems.

In adherent cells, the engagement of integrins leads to the formation of large multiprotein complexes, so-called focal adhesions, at the cytoplasmic side of the cell membrane. Antibodies against one characteristic component of these complexes, the protein paxillin, are often used for staining of focal adhesions. We used an anti-paxillin antibody to reveal possible changes in paxillin

TABLE I. Effect of SAHA on the Cell Adhesion to Fibronectin

	ACF in controls (%)	Average increase after SAHA (fold of control)	Number of experiments	P-value	Significant difference ( $P < 0.05$ )
JURL-MK1	38 ± 19	1.7 ± 0.4	17	<0.0001	Yes
K562	38 ± 22	1.5 ± 0.3	11	0.0003	Yes
HL-60	26 ± 21	2.5 ± 1.5	11	0.0003	Yes
Karpas-299	32 ± 22	1.8 ± 0.7	9	<0.0001	Yes
ML-2	32 ± 23	2.0 ± 1.0	6	0.0077	Yes
CML-T1	3.6 ± 3	2.3 ± 0.6	11	0.0012	Yes
Normal lymphocytes	35 ± 8	1.0 ± 0.2	10	0.3188	No
CML lymphocytes	34 ± 16	1.16 ± 0.13	6	0.0214	Yes

The cells were treated with 0.5 μM SAHA for 48 h and subjected to adhesion assay. The values of adherent cell fraction (ACF) and of the average increase in ACF due to SAHA are given as means and standard deviations of repeated experiments. The experiments using primary cells were completely independent (samples obtained from different individuals). Clinical samples were obtained from previously untreated patients with chronic myelogenous leukemia (CML). P values for the difference between controls and SAHA-treated samples were computed using the standard two-tailed paired t-test.

content resulting from the treatment of cells with SAHA. Western blots from cell lysates show an increase in paxillin expression following SAHA treatment for all cell lines that we tested (Fig. 7). Moreover, an additional band at slightly higher MW which is also recognized by anti-paxillin antibody appears as a result of SAHA treatment in some cell lines. No change in paxillin expression was observed in normal lymphocytes treated with SAHA.

In order to get insight into the mechanism of β1 integrin and paxillin protein level increase by SAHA, we searched for potential

changes at the transcriptional level using specific primers and RT-PCR method in JURL-MK1, Karpas, and CML-T1 cell lines. We found that integrin β1 mRNA levels corresponded well to that of protein product and the increase in β1 expression is thus due to an upregulation of the corresponding mRNA transcription (Fig. 8A,B). The used primers for paxillin should primarily detect the transcription variant 2 (product of 417 bp) which is translated into the ubiquitously expressed paxillin isoform α. In addition, these primers are also able to detect the transcription variant 1 (product of

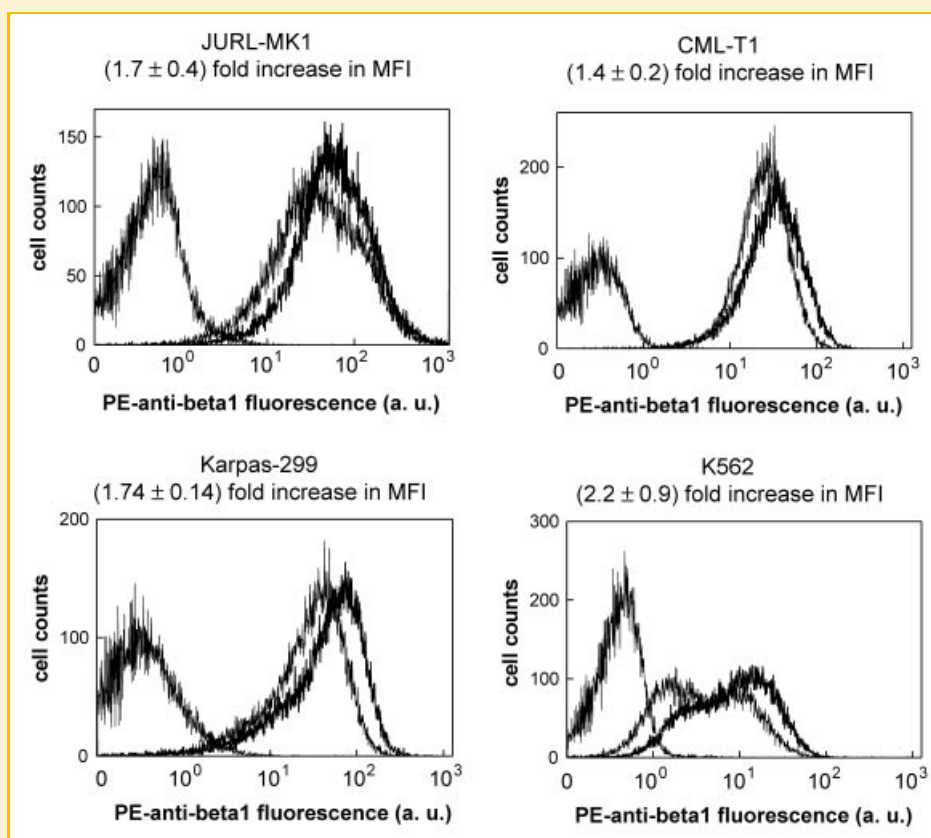


Fig. 6. Effect of SAHA on integrin β1 expression on the cell surface. The cells were treated with 0.5 μM SAHA for 48 h, stained with PE-conjugated anti-β1 integrin antibody and analyzed using a flow-cytometer. The fluorescence intensity from SAHA-treated cells (thicker lines) was higher in comparison with that from control cells. The records on the left side of each panel were from negative controls (no antibody staining). The numbers below the cell line names give the average increase in mean fluorescence intensity (MFI) from four to six independent experiments.

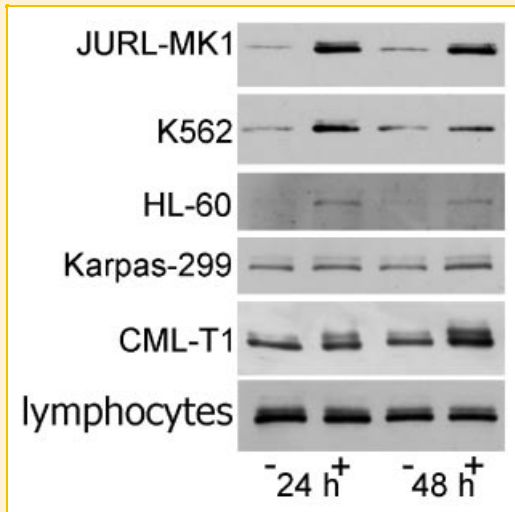


Fig. 7. Changes in paxillin expression induced by SAHA. Cells were incubated for 24 or 48 h as indicated with (+) or without (-) 0.5  $\mu$ M SAHA. No effect of SAHA treatment was detected on anti-actin blots which were performed as loading controls.

519 bp) coding for paxillin isoform  $\beta$  or  $\gamma$ . Indeed, we observed one dominant band whose intensity increased about 1.5-fold after SAHA treatment and, at higher amplification, an additional band displaying two- to threefold increase due to 24 h 0.5  $\mu$ M SAHA treatment (Fig. 8A). It thus seems that the increase in paxillin expression level is at least partly due to an upregulation of both paxillin  $\alpha$  and paxillin  $\beta/\gamma$  mRNA.

Focal adhesions not only assure mechanical attachment of the cell to ECM network but represent also communication points which transmit signals from the inside of the cell to ECM and vice versa. The binding of the extracellular parts of integrins to their ligands leads among others to the activation of small GTPases from Rho family, which are considered to be important regulators of the cytoskeleton dynamics, cell adhesion, and migration. In adherent cells, cell adhesion to FN is regulated through the activity of RhoA and its downstream effectors, proteins ROCK1 and ROCK2. In order to reveal possible involvement of ROCK activity in the increase of cell adhesion induced by SAHA, we used the inhibitor Y-27632 which should specifically block the activity of ROCK1 and ROCK2 at 5–10  $\mu$ M concentration. To confirm the inhibitor efficiency, we tested its effects on the actin polymerization state in the cells using fluorescently labeled phalloidin which binds to actin polymers but not to actin monomers. The treatment of JURL-MK1, K562 or Karpas-299 cells with 10  $\mu$ M Y-27632 induced a moderate, but reproducible decrease of FITC-phalloidin fluorescence intensity which was not further enhanced by increasing the inhibitor dose (data not shown). This observation is in agreement with the known action of ROCK proteins on the stabilization of actin fibers and indicates that 10  $\mu$ M Y-27632 is sufficient to inhibit ROCK activity. No effect on the cell viability in any of the studied cell lines was observed using this concentration of the inhibitor.

The effect of Y-27632 on the cell adhesion to FN was strongly cell type-dependent. In CML-T1 and HL-60 cells, 18 h treatment with Y-27632 significantly reduced ACF (Fig. 9). On the other hand, no effect of Y-27632 on JURL-MK1 or Karpas-299 cell adhesion was observed for up to 24 h treatment. Prolonged incubation (48 h) of

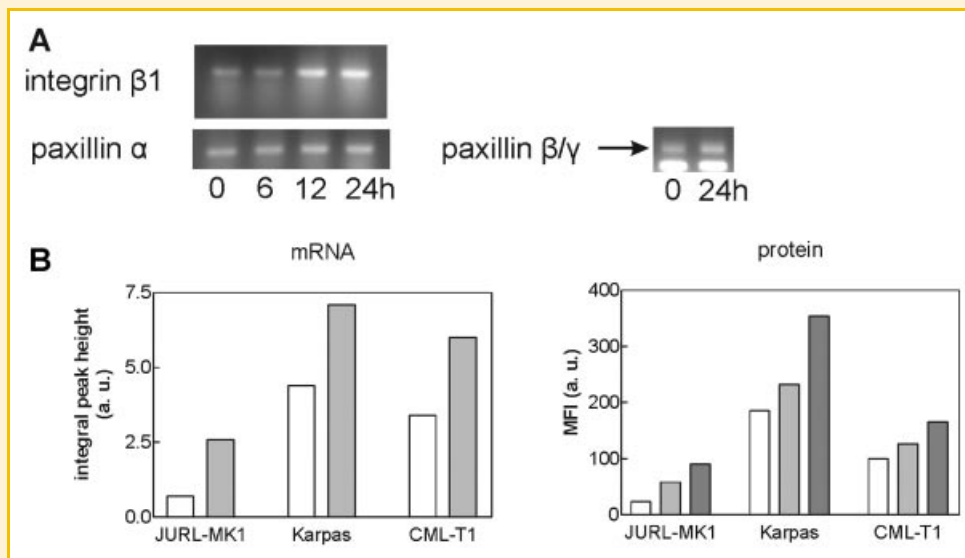


Fig. 8. Changes in mRNA expression levels for integrin  $\beta$ 1 and paxillin induced by SAHA. Panel A: JURL-MK1 cells were treated with 0.5  $\mu$ M SAHA for up to 24 h as indicated and expression levels of integrin  $\beta$ 1 and paxillin mRNA were analyzed using RT-PCR method and specific primers. The use of paxillin-specific primers allowed for the detection of one dominant band and an additional band at higher MW, which probably correspond to transcription variants 2 and 1, the templates for paxillin alpha and beta/gamma, respectively. Actin bands were used as loading controls. Panel B: Comparison of SAHA-induced changes in mRNA and protein levels for integrin  $\beta$ 1 in JURL-MK1, Karpas-299, and CML-T1 cells. Cells were treated with 0.5  $\mu$ M SAHA for up to 48 h (clear bars: controls, gray bars: 24 h, dark bars: 48 h). Integrin mRNA expression level was determined using RT-PCR method and normalized using actin mRNA bands. Protein integrin expression on the cell surface was analyzed in parallel from the same samples using fluorescent antibody and flow-cytometry.

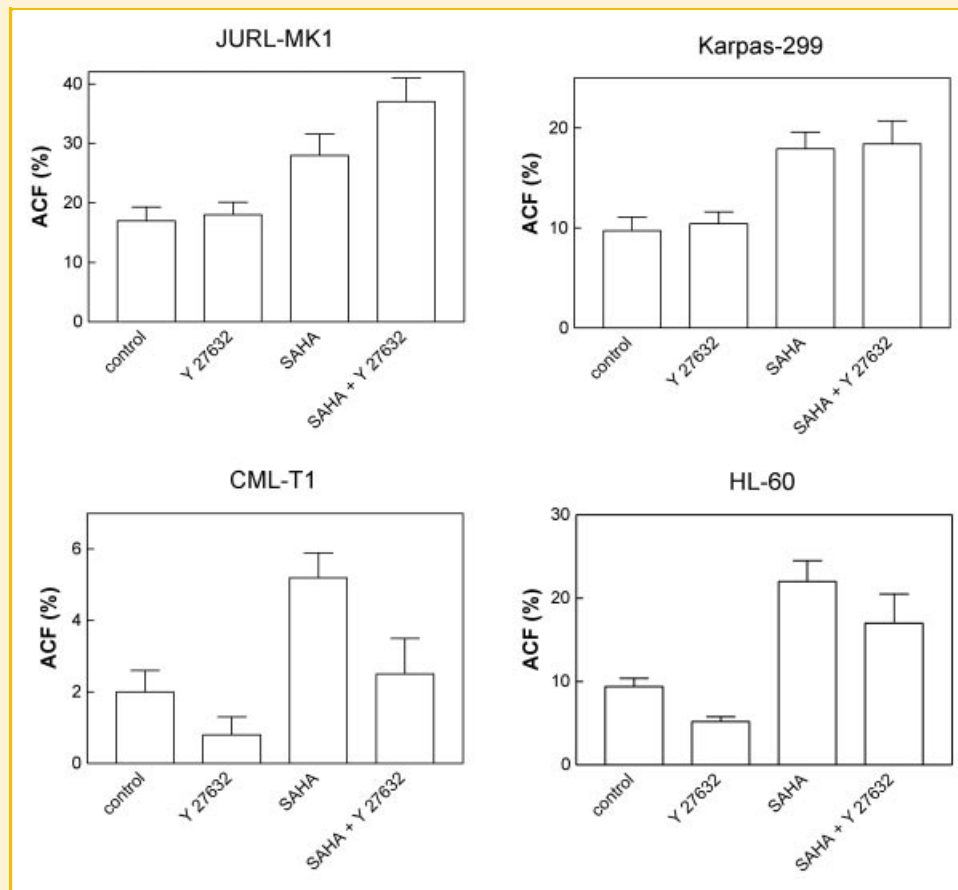


Fig. 9. Representative experiments showing the effects of Y-27632 on cell adhesion to fibronectin. Cells were treated with 0.5  $\mu$ M SAHA alone or in combination with 10  $\mu$ M Y-27632 and the adherent cell fraction (ACF) was measured using the adhesion assay. Legend to bar labels: control: untreated cells, Y-27632: treated for 24 h with Y-27632, SAHA: treated for 48 h with SAHA, SAHA + Y-27632: treated with SAHA for 48 h, Y-27632 was added for the last 24 h. The results from repeated experiments are summarized in Table II.

control JURL-MK1 cells with Y-27632 produced inconsistent effects on the cell adhesion (no change, increase or decrease were observed in multiple experiments) and we thus limited the use of the inhibitor to 24 h treatment as the maximum. To test the influence of Y-27632 on SAHA-induced increase of ACF, the cells were either treated simultaneously with SAHA and Y-27632 for 24 h or, alternatively, the inhibitor was added for the last 24 of 48 h treatment with SAHA. Similarly to the effects in control cells, the ability of Y-27632 to reverse the increase in ACF induced by SAHA depended on the cell type: the simultaneous use of ROCK inhibitor always reduced the effect of SAHA in CML-T1 cells and sometimes in HL-60 cells. No effect of Y-27632 on SAHA-induced increase in cell adhesion was

observed in Karpas-299 cells under the same experimental conditions while the inhibitor even potentiated the effect of SAHA in JURL-MK1 cells in some experiments. The effects of Y-27632 on the cell adhesion to FN are summarized in Table II.

We also tested the effects of other HDAC inhibitors, sodium butyrate and trichostatin A, on JURL-MK1 cell adhesion to FN. It follows from our in vitro measurements of HDAC activity in cell lysates that the efficiency of 0.5 mM sodium butyrate in HDAC inhibition is comparable to that of 0.5  $\mu$ M SAHA (in both cases, the effect of the inhibitor reached the maximum value at this concentration, data not shown). We also previously reported that sodium butyrate induces erythroid differentiation without

TABLE II. Effects of ROCK Inhibition on the Cell Adhesion

Cell line	Effect on ACF in controls	Effect on SAHA-induced increase of ACF
JURL-MK1	No effect	Synergy/no effect
K562	No effect	No effect/synergy
Karpas-299	No effect	No effect
CML-T1	Decrease	Inhibition
HL-60	No effect/decrease	No effect/inhibition

To test the effects of Y-27632 on the adhesion of control cells, the inhibitor was added at 10  $\mu$ M concentration for 16–24 h. To analyze the interference of Y-27632 with SAHA, the cells were treated with SAHA for 24 or 48 h and Y-27632 was added for the last 24 h of SAHA treatment. The adherent cell fraction (ACF) was then determined using the adhesion assay.

significant apoptosis in K562 cells at 0.6 mM concentration while it triggers apoptosis at 2 mM concentration [Grebeňová et al., 2006]. However, no increase in the cell adhesivity to FN could be detected after K562 or JURL-MK1 cell treatment with sodium butyrate at up to 2 mM concentration. Similarly, based on the *in vitro* inhibition constants, 100 nM trichostatin A should have similar effect on HDAC activity as 2 mM sodium butyrate. We found that 500 nM trichostatin-induced cell cycle arrest, cell death, and decrease of cell adhesion to FN in JURL-MK1 cells (data not shown). However, no increase in JURL-MK1 adhesion to FN was detected at lower concentrations of trichostatin A. Thus, it seems that the increase in cell adhesion to FN is specific for SAHA.

## DISCUSSION

We performed the analysis of toxic effects induced by SAHA in different leukemic cell lines and in lymphocytes obtained from healthy donors. The sensitivity of the individual cell types to SAHA was variable: HL-60 cells undergo extensive and fast apoptosis which is strongly concentration-dependent (Fig. 1). Caspase activation (Fig. 2B) and apoptotic DNA fragmentation (Fig. 1) also occur to a large extent in JURL-MK1 and CML-T1 cells, as well as in donor lymphocytes. Karpas-299 cells appear to be relatively resistant to apoptosis as judged from limited caspase-3 activation and TUNEL-positive cell fraction but they undergo other form of cell death as indicated by the high fraction of Trypan blue-positive cells after 48 h treatment with SAHA (Fig. 3). On the other hand, K562 cells resist well to SAHA at up to 2  $\mu$ M concentration. These findings support the view that the mechanism of SAHA action is complex and the resulting effect greatly depends on the individual cell context. It appears that the variability in the responses to SAHA is not related to the cell line origin (type of disease) as three CML-derived cell lines (JURL-MK1, CML-T1, and K562) behave quite differently.

Despite of this different sensitivity of the individual cell types to SAHA-induced cell death, SAHA had consistent effects on the cell adhesion to FN when it was added at subtoxic concentration (0.5  $\mu$ M). The protocol we used to determine the ACF allows for reliable detection of changes as small as several percent and we show that 48 h treatment with 0.5  $\mu$ M SAHA increases 1.5- to 2.5-fold the cell adhesion to FN in six different leukemia/lymphoma-derived cell lines but not in normal lymphocytes (Table I). For comparison, JURL-MK1 cell treatment with phorbol-myristoylacetate (PMA, 50 nM, 30 min), an activator of protein kinase C which is known to enhance the cellular adhesivity to ECM, induced (1.8  $\pm$  0.7) fold increase in the cell adhesivity to FN (mean and standard deviation from eight experiments, data not shown) under our experimental conditions. A slight increase in the cell adhesivity resulting from 0.5  $\mu$ M SAHA treatment was also observed in primary samples from CML patients. The effect was weaker than for the cell lines, probably because the peripheral blood of patients in early stage of CML contains a mixture of normal (prevalent) and transformed cells [Kuželová et al., 2006].

Increasing SAHA concentration to toxic doses usually led to the loss of elevatory effect on ACF (Fig. 5). It is known that the early stages of apoptosis include cell rounding and detachment from the

ECM and surrounding cells [Shi and Wei, 2007; Taylor et al., 2008]. Although the mechanism of these processes is not fully elucidated, the positive effect of SAHA on the cell adhesivity can be counteracted by the changes related to apoptosis or other form of cell death which is induced by SAHA at higher concentration (Figs. 1 and 3).

SAHA-induced increase in the cell adhesivity to FN can be at least in part mediated by an increase in the expression level of integrin  $\beta$ 1 on the cell surface which was observed in four out of five cell lines tested (Fig. 6). The only exception is represented by HL-60 cells and it could be due to the fact that in these cells SAHA triggers apoptosis already at 0.5  $\mu$ M concentration. This can oppose some of the effects promoting the cell adhesion to FN. The surfacial density of integrin molecules is not the only parameter involved in the regulation of cellular adhesivity to FN: for example, the ability of integrins to cluster and to initiate the formation of functional focal adhesion complexes is of crucial importance. Nevertheless, our results suggest that SAHA can enhance the cell adhesion to FN through the upregulation of integrin  $\beta$ 1 expression, which we observed both on the transcriptional and translational level (Fig. 8).

Paxillin is an adaptor protein which directly binds to integrins and serves as a scaffold for many other components of focal adhesion complexes (e.g., focal adhesion kinase, FAK, or vinculin). It can be phosphorylated at several sites, for example, by Src kinase, and enhanced paxillin phosphorylation on tyrosines 31 and 118 is observed upon the cell adhesion to ECM [Schaller and Schaefer, 2001]. We found that the treatment of leukemic cells with 0.5  $\mu$ M SAHA elevates the expression level of paxillin (Fig. 7). The upregulation of paxillin was confirmed also at the transcriptional level (Fig. 8A) although the increase in paxillin mRNA is less marked in comparison with that of the protein level. Thus, SAHA treatment probably also results in higher stability of paxillin protein product. The increased availability of this essential constituent of focal adhesions after cell treatment with SAHA can contribute to a more efficient cell adhesion to FN. Paxillin was also shown to be cleaved by caspases during cell apoptosis [Chay et al., 2002]. This can result in focal adhesion disassembly and may explain the loss of SAHA effect on the cell adhesivity at higher concentrations of the drug. In keeping with the absence of SAHA effects on the adhesion of normal cells, no change in paxillin expression occurred upon SAHA addition to normal lymphocytes.

Firm adhesion of adherent cells to ECM involves the formation of actin stress fibers, which consists of 10–30 filaments of polymeric actin cross-linked by alpha-actinin, nonmuscle myosin, and tropomyosins [Pellegrin and Mellor, 2007]. These cytoskeletal structures are connected to ECM network through the focal adhesions and help to maintain mechanical resistance of the cell to detachment from ECM [Butler et al., 2006]. Integrin engagement leads to the activation of small GTPase RhoA which stimulates the formation of stress fibers and focal adhesions [Kabuyama et al., 2006; Villalonga and Ridley, 2006]. Among the main effectors of RhoA, the proteins ROCK1 and ROCK2 activate LIM kinase which in turn inactivates by phosphorylation the actin depolymerizing factor cofilin and thereby provides stabilization of actin structures [Bernard, 2007]. On the other hand, phosphorylation of myosin light chain also induced by ROCK proteins stimulates the

contractility of actin–myosin fibers. ROCK is required for the maturation of focal adhesions [Nagamatsu et al., 2008] and the inhibition of ROCK function using pharmacological inhibitors or expression of dominant-negative mutant results in disassembly of stress fibers and of focal adhesions in fibroblasts and epithelial cells. The function of RhoA/ROCK is less clear in hematopoietic cells which do not form robust actin fibers and the relation between the cytoskeletal arrangement and the cellular adhesivity to ECM is less obvious. Nevertheless, the adhesion of hematopoietic cells to FN is accompanied by changes in conformation and in lateral motility of  $\beta$  integrins and their clustering. As in the adherent cells, the intracellular parts of integrins become the base of complex protein structures which include small Rho GTPases and actin structure-forming proteins [Gao et al., 2005; Butler et al., 2006]. However, several reports indicated that RhoA and ROCK activity rather impedes the adhesion of hematopoietic cells to ECM [Aepfelbacher, 1995; Lai et al., 2003; Lee and Chang, 2008].

We thus explored the involvement of ROCK proteins in the increased adhesion of leukemic cells due to SAHA treatment using the inhibitor Y-27632. The effect of Y-27632 on the amount of polymeric actin (detected by phalloidin staining) in control cells confirmed its efficiency in our cell lines (data not shown). The effect of ROCK inhibition on the adhesion of control as well as of SAHA-treated cells to FN was strongly dependent on the cell type (Fig. 9 and Table II). While the inhibitor had no effect on the adhesivity of Karpas-299 cells, it decreased ACF in both control and SAHA-treated HL-60 and CML-T1 cells. On the other hand, the inhibition of ROCK in some experiments with JURL-MK1 and K562 cells potentiated the effect of SAHA on the cell adhesion to FN. In general, ROCK activity is thus not required for the increase of leukemic cell adhesivity to FN induced by SAHA and, in agreement with the above mentioned reports, the inhibition of ROCK can even enhance the cellular adhesivity to FN in some cell types. In HL-60 and CML-T1 cells, the ability of Y-27632 to reduce ACF in SAHA-treated cells does not obviously prove the involvement of RhoA/ROCK pathway in the processes induced by SAHA. The inhibitor reduces ACF also in nontreated CML-T1 and HL-60 cells and ROCK-related and SAHA-related processes may have independent contributions to the cellular adhesivity.

The stimulation of cell adhesivity to FN we describe in this work is not only specific for transformed cells (no increase in ACF was observed in normal lymphocytes) but seems also to be limited to SAHA as we detected no change in ACF after JURL-MK1 and K562 cell treatment with sodium butyrate and even with trichostatin A which belongs to the same structural class as SAHA. Interestingly, both SAHA and sodium butyrate were previously reported to upregulate the expression of proteins involved in the cell–cell adhesion [Bordin et al., 2004]. One of the reports dealing with SAHA effects on the gene expression mentions the integrin alpha 2 (CD49b) among the genes with increased expression due to SAHA treatment [Peart et al., 2005].

Our results are somewhat contradictory to that of Mahlknecht and Schönbein [2008] who found that SAHA downregulated the expression of VLA-4 (i.e., integrin subunit  $\alpha 4$ , CD49d) in cell lines and primary cells derived from patients with AML and decreased the adhesion of KG1a cells (an AML cell line) to mesenchymal stromal

cells. The authors did not observe any change in the expression of integrin  $\beta 1$  (CD29) in AML cells treated with SAHA. It is possible that the response of AML cells to SAHA is different from that of other cell types. Indeed, the only cell line which did not display increased integrin  $\beta 1$  expression after SAHA treatment in our experiments was an AML line (HL-60). Also, an exceptional experimental result, that is, SAHA-induced decrease in the cell adhesivity, was obtained only with primary cells from two (out of three) AML patients. Nevertheless, we found no difference between AML-derived and other cell lines in the adhesion experiments with FN (Table II). The decrease of KG1a cell adhesion to stromal cells due to SAHA reported by Mahlknecht and Schönbein was significant at 2  $\mu$ M SAHA concentration and the authors did not examine the effect of SAHA on KG1a cell viability. Thus, the adhesivity decrease could also be a secondary effect of apoptosis triggered by SAHA treatment.

## CONCLUSIONS

In addition to previously reported effects on the cell proliferation, differentiation, and viability, SAHA also alters adhesion properties of hematopoietic cells. The effects of SAHA on the cell adhesion occur already at low SAHA concentrations in leukemic but not in normal cells and seems to be specific for this particular HDAC inhibitor. On the contrary to the other SAHA-induced processes, which are highly cell type-dependent, the increase in the cell adhesivity occurs consistently in different types of leukemic cells.

The ability of SAHA to increase the adhesivity of transformed hematopoietic cells to FN should be taken into account whenever SAHA is considered for clinical use. The *in vitro* doses used in our study correspond to the lowest concentrations used in patients for clinical studies when SAHA is used as a single agent [Mahlknecht and Schönbein, 2008]. Our results show that low-dose SAHA, possibly used in combination with an anticancer drug, could cause higher retention of malignant cells in the bone marrow. It is known that the bone marrow microenvironment offers protection from many chemotherapeutic agents for normal and malignant hematopoietic cells as well as for disseminating cancer cells from epithelial tumors [Meads et al., 2008; Riethdorf et al., 2008]. Higher fraction of transformed cells thus could escape the effects of the anticancer treatment which would aggravate the residual disease and increase the risk of the disease relapse.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank H. Pilcová for the expert technical assistance.

## REFERENCES

- Aepfelbacher M. 1995. ADP-ribosylation of Rho enhances adhesion of U937 cells to fibronectin via the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *FEBS Lett* 363:78–80.
- Bernard O. 2007. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1071–1076.

- Bordin M, D'Atri F, Guillemot L, Citi S. 2004. Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Mol Cancer Res* 2:692–701.
- Brodská B, Otevřelová P, Kalousek I. 2009. Variations in c-Myc and p21WAF1 expression protect normal peripheral blood lymphocytes against BimEL-mediated cell death. *Cell Biochem Funct* 27:167–175.
- Butler B, Gao C, Mersich AT, Blystone SD. 2006. Purified integrin adhesion complexes exhibit actin-polymerization activity. *Curr Biol* 16:242–251.
- Chay K-O, Park SS, Mushinski JF. 2002. Linkage of caspase-mediated degradation of paxillin to apoptosis in Ba/F3 murine Pro-B lymphocytes. *J Biol Chem* 277:14521–14529.
- Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, Sun L, Ricker JL, Xie H, Frankel SR, Randolph SS, Cheson BD. 2008. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 19:964–969.
- Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann WK, Haferlach T, Koeffler HP. 2007. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia* 21:1026–1034.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. 2007. Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5:981–989.
- Duvic M, Vu J. 2007. Vorinostat: A new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Invest Drugs* 16:1111–1120.
- Gao C, Schaefer E, Lakkis M, Blystone SD. 2005. Beta3 tyrosine phosphorylation and alphaVbeta3-mediated adhesion are required for Vav1 association and Rho activation in leukocytes. *J Biol Chem* 280:15422–15429.
- Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rassool FV. 2006. Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: A mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol Cancer Res* 4:563–573.
- Gillenwater AM, Zhong M, Lotan R. 2007. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 6:2967–2975.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. 2003. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: Defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2:151–163.
- Grebeňová D, Kuželová K, Pluskalová M, Pešlová G, Halada P, Hrkal Z. 2006. The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood Cells Mol Dis* 37:210–217.
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. 2004. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1241–1246.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. *Nat Rev Gen* 10:32–42.
- Kabuyama Y, Langer SJ, Polvinen K, Homma Y, Resing KA, Ahn NG. 2006. Functional proteomics identifies protein-tyrosine phosphatase 1B as a target of RhoA signaling. *Mol Cell Proteomics* 5 (8): 1359–1367.
- Kumagai T, Akagi T, Desmond JC, Kawamata N, Gery S, Imai Y, Song JH, Gui D, Said J, Koeffler HP. 2009. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 124:827–833.
- Kuželová K, Grebeňová D, Pluskalová M, Marinov I, Klamová H, Hrkal Z. 2006. Imatinib mesylate affects tyrosine kinase activity in both leukemic and normal primary mononuclear blood cells. *J Appl Biomed* 4:95–104.
- Kuželová K, Grebeňová D, Hrkal Z. 2007. Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at site(s) different from caspase-3 active site. *Cytometry Part A* 71A:605–611.
- Lai J-M, Hsieh C-L, Chang Z-F. 2003. Caspase activation during phorbol ester-induced apoptosis requires ROCK-dependent myosin-mediated contraction. *J Cell Sci* 116:3491–3501.
- Lee HH, Chang ZF. 2008. Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2. *J Cell Biol* 181:999–1012.
- Lindemann RK, Newbold A, Whitecross KF, Frew LA, Ellis L, Williams S, Wiegmann AP, Dear AE, Scott CL, Pellegrini M, Wei A, Richon VM, Marks PA, Lowe SW, Smyth MJ, Johnstone RW. 2007. Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8071–8076.
- Mahlknecht U, Schönbein C. 2008. Histone deacetylase inhibitor treatment downregulates VLA-4 adhesion in hematopoietic stem cells and acute myeloid leukemia blast cells. *Haematologica* 93:443–446.
- Marks PA, Breslow R. 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: Development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 25:84–90.
- Marks PA, Jiang X. 2005. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell cycle* 4:549–551.
- Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. 2008. The bone marrow micro-environment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 14:2519–2526.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. 2004. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:540–545.
- Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP. 2008. A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 109:182–186.
- Monneret C. 2005. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 40:1–13.
- Nagamatsu Y, Rikitake Y, Takahashi M, Deki Y, Ikeda W, Hirata K, Takai Y. 2008. Roles of Necl-5/poliovirus receptor and Rho-associated kinase (ROCK) in the regulation of transformation of integrin alpha(V)beta(3)-based focal complexes into focal adhesions. *J Biol Chem* 283:14532–14541.
- O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, Richardson S, Willim R, MacGregor-Cortelli B, Curly T, Moskowitz C, Portlock C, Horwitz S, Zelenetz AD, Frankel S, Richon V, Marks PA, Kelly WK. 2006. Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 24:166–173.
- Pearl MJ, Smyth GK, Van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW. 2005. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3697–3702.
- Pellegrin S, Mellor H. 2007. Actin stress fibers. *J Cell Sci* 120:3491–3499.
- Richardson P, Mitsiades C, Colson K, Reilly E, McBride L, Chiao J, Sun L, Ricker J, Rizvi S, Oerth C, Atkins B, Fearen I, Anderson K, Siegel D. 2008. Phase I trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 49:502–507.
- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. 2008. Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 123:1991–2006.
- Rosato RR, Grant S. 2004. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Invest Drugs* 13:21–38.
- Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. 2002. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *Int J Cancer* 99:292–298.
- Schaller MD, Schaefer EM. 2001. Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin. *Biochem J* 360:57–66.



- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. 2004. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 18030–18035.
- Shi J, Wei L. 2007. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp* 55:61–75.
- Tavares TS, Nanus D, Yang XJ, Gudas LJ. 2008. Gene microarray analysis of human renal cell carcinoma: The effects of HDAC inhibition and retinoid treatment. *Cancer Biol Ther* 7:1607–1618.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231–241.
- Tong A, Zhang H, Li Z, Gou L, Wang Z, Wei H, Tang M, Liang S, Chen L, Huang C, Wei Y. 2008. Proteomic analysis of liver cancer cells treated with suberoylanilide hydroxamic acid. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:791–802.
- Villalonga P, Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24:159–164.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. 2007. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanism of action. *Oncogene* 26:5541–5552.
- Yu C, Dasmahapatra G, Dent P, Grant S. 2005. Synergistic interactions between MEK1/2 and histone deacetylase inhibitors in BCR/ABL+ human leukemia cells. *Leukemia* 19:1579–1589.