

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

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

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Autor: Mgr. Darina Zášková**

Školitel: doc. MUDr. Martina Řezáčová, PhD.

Ústav lékařské biochemie

Hradec Králové 2008

Úvodem této práce bych ráda poděkovala všem těm, kteří větší či menší měrou přispěli nejen přímo ke vzniku tohoto spisu, ale obecně se podíleli na výsledcích v naší laboratoři, kolegům, se kterými jsem měla možnost spolupracovat a konzultovat svoji práci. A v neposlední míře všem, kdo se podíleli na vytvoření příjemného pracovního prostředí, které mě provázelo celým postgraduálním studiem, ať už na Ústavu lékařské biochemie LFHK nebo na Katedře radiobiologie a pracovištích ÚMP a CPS Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Brně.

Především děkuji

- mojí rodině, za pochopení, toleranci a neutuchající podporu v mojí práci,
- školitelce doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD. za jasnou koncepci a směřování doktorandského studia, za ochotu a pomoc při řešení problémů, za cenné rady a připomínky,
- prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. za umožnění dlouhodobé stáže na pracovišti Katedry radiobiologie FVZ UO v Brně a za konzultace především v oblasti radiobiologie,
- PharmDr. Aleši Tichému, PhD. za zasvěcení do tajů elektroforézy,
- laborantkám Nadě Mazánkové a Jaroslavě Prokešové za starost a péči o buňky a přípravu pokusů,
- laborantce Evě Vodákové za spolupráci na elektroforézách a především za vytváření příjemného pracovního prostředí a nálady v naší laboratoři,
- PharmDr. Doris Vokurkové, PhD. za flow-cytometrické analýzy,
- doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi, CSc. a doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc, oběma za lidský přístup, ochotu a snahu pomoci při konzultacích či řešení problémů,
- a celé řadě dalších kolegů a kamarádů z Ústavu lékařské biochemie, z Katedry radiobiologie, ÚMP a CPS.

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>7</b>
<b>3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY .....</b>	<b>8</b>
3.1. GENETICKÝ A EPIGENETICKÝ APARÁT BUŇKY .....	8
3.2. HISTONACETYLTRANSFERASY A HISTONDEACETYLASY .....	10
3.3. VNĚJŠÍ A VNITŘNÍ CESTA APOPTÓZY, PROTEINY p53 a p21 .....	12
3.5. ZMĚNY V HDAC U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	20
3.6. KYSELINA VALPROOVÁ JAKO INHIBITOR HISTONDEACETYLAS.....	21
3.7. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI .....	23
3.8. KYSELINA VALPROOVÁ V KLINICKÉ PRAXI .....	24
<b>4. MATERIÁL A METODIKY .....</b>	<b>27</b>
4.1. BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY.....	27
4.1.1. MOLT - 4 .....	27
4.1.2. HL-60.....	27
4.1.3. U-937 .....	27
4.2. FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ .....	28
4.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ .....	28
4.2.2. KYSELINA <i>ALL-TRANS</i> -RETINOVÁ .....	28
4.3. OZAŘOVÁNÍ .....	28
4.4. IN VITRO ZKOUŠKA KLONOGENITY.....	29
4.5. FLOW-CYTOMETRICKÉ ANALÝZY .....	29
4.6. IMUNOCYTOCHEMIE.....	30
4.7. ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING .....	30
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>32</b>
5.1. MOLT-4.....	32
5.1.1. KYSELINA VALPROOVÁ .....	32
5.1.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM.....	37
5.2. HL-60.....	40
5.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ .....	40
5.2.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM.....	44
5.3. U-937 .....	48

5.3.1.	KYSELINA VALPROOVÁ .....	48
5.3.2.	KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S KYSELINOU ALL-TRANS-RETINOVOU	50
<b>6.</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
6.1.	KYSELINA VALPROOVÁ.....	51
6.2.	KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI .....	54
<b>7.</b>	<b>SHRnutí NEJDůLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>60</b>
7.1.	MOLT-4.....	60
7.2.	HL-60 .....	60
7.3.	U-937 .....	61
<b>9.</b>	<b>ZKRATKY.....</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>64</b>
<b>11.</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>70</b>

## 1. ÚVOD

Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) je každému třetímu Evropanovi v průběhu jeho života diagnostikováno nádorové onemocnění a každý čtvrtý na něj umírá. V roce 2006 bylo zjištěno téměř 2,3 milionu nových případů rakoviny a více než milion lidí v EU této nemoci podlehl.

V České republice představují nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinu úmrtí, podle statistických údajů onemocní zhoubným nádorem každý pátý občan. Přesto se v současné době úmrtnost na nádorová onemocnění poněkud snižuje, což lze vysvětlit jednak rozvojem protinádorové léčby, jednak dokonalejší diagnostikou, která umožňuje včasné odhalení nemoci. V léčbě nádorových onemocnění se uplatňují 4 terapeutické přístupy: chirurgická léčba, radioterapie, chemoterapie a biologická léčba. Jedna léčebná metoda však často nezaručuje úplné vyléčení, a proto se přistupuje ke kombinované terapii. Základním prostředkem systémové léčby je chemoterapie, kdy i přes intenzivní výzkum nových cytostatik zůstává klasická chemoterapie nepostradatelná a pro některé typy nádorových onemocnění zcela nenahraditelná.

Pokroky v molekulární biologii umožnily lépe chápat patogenezi nádorového procesu a upřesnily naše vědomosti o pochodech vedoucích k transformaci normálních buněk v buňky nádorové. Tím vedly k objevu nových látek s odlišnými mechanismy protinádorového účinku. Růst nádoru je výsledkem celé řady schopností, které buňky získávají během procesu maligní transformace a díky nimž jsou odolné vůči stresovým faktorům okolí, které normální buňky zabíjí. Nádorové buňky se vyznačují zvýšenou proliferací, nedokonalou diferenciací, sníženou citlivostí k indukci apoptózy, invazivitou, změnami v metabolismu a podporou angiogeneze.

Maligní nádor je genetické onemocnění, u kterého dochází ke změnám jak v genomu, tak v epigenomu. Nejčastěji se vyskytující epigenetické změny v nádorových buňkách jsou alterace v methylaci DNA a deacetylaci histonů, které mají za následek utlumení exprese genů. Na rozdíl od genetických aberací je možné epigenetické změny farmakologicky zvrátit a přispět k obnovení funkce postižených genů. Proto epigenetické alterace představují v současnosti jednu z nejvíce zkouma-

ných oblastí v klinickém a preklinickém výzkumu především leukemií, a jejich hlubší pochopení je nutné pro rozvoj nových strategií epigenetické terapie.

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

## **2. CÍL PRÁCE**

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

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

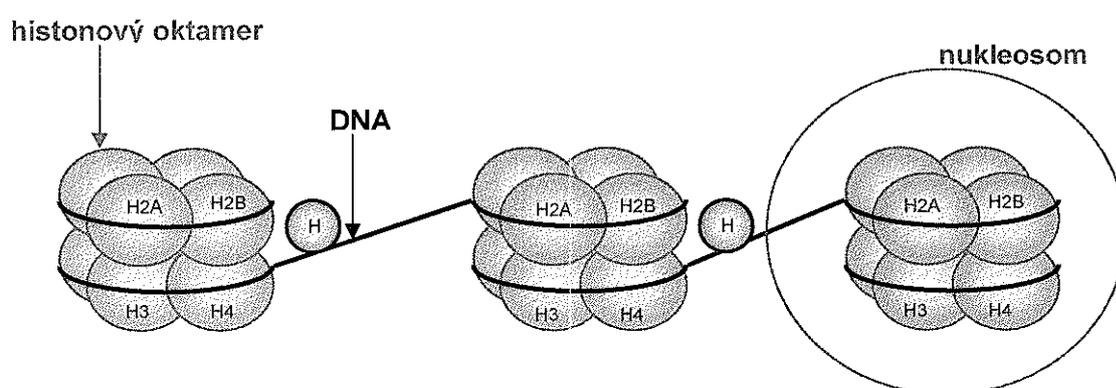
Zajímalo nás, zda se antitumorózní působení kyseliny valproové projeví na nádorových buňkách v terapeutických koncentracích používaných při léčbě epilepsie, jakým způsobem je ovlivněna diferenciace, proliferace, buněčný cyklus nádorových buněk a především jsme se zaměřili na aktivaci proteinů klíčových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

### **3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY**

#### **3.1. GENETICKÝ A EPIGENETICKÝ APARÁT BUŇKY**

Schopnost buňky reagovat na změny ve vnějším a vnitřním prostředí je dána souhrou genetického a epigenetického aparátu. Genetický aparát tvoří sekvence nukleotidů v DNA – DNA kód. Epigenetický aparát je tvořen histonovým kódem, tj. souborem minimálně osmi specifických kovalentních modifikací na histonových koncích, a methylací DNA. Epigenetický aparát řídí strukturu chromatinu bez změny sekvence DNA a tím ovlivňuje expresi genů (Smith et al, 2007), zejména těch, které hrají důležitou roli při transkripci, replikaci a reparaci DNA (Turner, 2000).

DNA eukaryotického jádra je kondenzována do vysoce organizovaného chromatinu. Základní strukturální jednotkou chromatinu je kulovitá částice – nukleosom – o průměru 10 nm. Obsahuje 146 párů bazí, které vytváří 1,75 levotočivých nadšroubovicových závitů DNA kolem proteinového jádra (Marks et al, 2000; Kouzarides, 2007). Jádro má strukturu oktameru, skládá se vždy ze dvou stejných molekul čtyř různých typů jaderných bílkovin – histonů.



**Obr. 1: Struktura nukleosomu, základní strukturální jednotky chromatinu**

Histony H2A a H2B jsou bohaté na lysin a vytváří dimery, které se spojují ve větší oligomerní komplexy. Histony H3 a H4 s vysokým obsahem argininu vytváří tetramery. Struktura histonů je sice mezidruhově značně konzervativní a jejich funkce u všech eukaryontů stejná, ale chromozomální distribuce jednotlivých modifikací se může měnit jak během buněčného cyklu, tak mezi skupinami eukaryont (Fuchs et al, 2006). Histon H1 je obsažen v chromatinu v přibližně polovičním množství než ostatní typy histonů a není součástí centrálního oktameru, nachází se ve vnější části

nukleosomů. K chromatinu se váže nejslaběji, lze ho snadno extrahovat solným roztokem a chromatin se pak stává rozpustným. Sestavení nukleosomu je pravděpodobně zprostředkováno aniontovým jaderným proteinem nukleoplasminem. Nukleosomy se dále skládají do vyšších struktur chromatinu, které jsou poměrně dynamické – prochází značnými změnami, které vedou k aktivaci nebo represi transkripce (Murray et al, 2002).

Na silně bazických amino-terminálních částech histonů probíhá celá řada různých modifikací: acetylace, fosforylace, methylace, ADP-ribosylace, ubikvitinylace, sumoylace, karbonylace, glykosylace (Fuchs et al, 2006), deiminace a isomerizace prolinu (Kouzarides, 2007). Vazebných míst, kde tyto modifikace probíhají, je několik desítek a jejich funkce se vysvětluje dvěma způsoby. Prvním je prosté narušení kontaktu mezi nukleosomy, což vede k rozvolnění struktury chromatinu, druhým pak zprostředkování vazby nehistonových proteinů přes specifické domény; konkrétně u acetylace je to přes bromodomény (Kouzarides, 2007).

Z uvedených modifikací je nejlépe prozkoumaná acetylace – probíhá na lysinových zbytcích, např. lysin 8, 12 a 16 na histonu H4, lysin 9, 14 a 23 na histonu H3 (Luo et Dean, 1999), a to pomocí tří hlavních skupin acetyltransferas (GNAT, MYST, CBP/p300). Ze všech modifikací právě acetylace má největší schopnost rozvolňovat chromatin, protože neutralizuje kladný náboj bazických lysinů. Navíc je rychle reverzibilní, s poločasem v řádu minut, což umožňuje rychlé změny v genové expresi v závislosti na signálech (Liu et al, 2005).

Stupeň acetylace jaderných histonů je dán poměrem aktivit opačně působících enzymů ze skupiny histonacetyltransferas – HAT a histondeacetylasy – HDAC (Blaheta et Cinatl, 2002). Oba typy enzymů působí na cílové geny v komplexu se sekvencí specifickými transkripčními faktory a jejich kofaktory, např. N-CoR, Sin3, SMRT u HDAC (Göttlicher et al, 2001; Glaser 2007) a methyl vazebnými proteiny jako MeCP2 (Gurvich et al, 2004). Zvýšení acetylace histonů je spojeno s vyšší transkripční aktivitou a obecně je acetylace důležitým mechanismem, kontrolujícím uspořádání chromatinu a genové regulace.

### **3.2. HISTONACETYLTRANSFERASY A HISTONDEACETYLASY**

Jako acetylom označujeme komplex v buňce přítomných HDAC, které regulují řadu procesů a přispívají k udržení specifických buněčných funkcí (Menegola et al, 2007). HDAC katalyzují deacetylaci aminoskupiny lysinů v N-terminální části jaderných histonů. V současné době je známo 18 histondeacetylas, které rozdělujeme do 3 skupin na základě jejich homologie s proteiny kvasinek.

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, která putuje mezi jádrem a cytoplazmou, je homologní s HDA1 v kvasinkách a zahrnuje HDAC 4, 5, 6, 7, 9 a 10. Podle struktury deacetylační domény rozdělujeme tuto skupinu na 2 potřídy IIa a IIb. Podtřída IIa zahrnuje HDAC s jednou hlavní deacetylační doménou, zatímco deacetylas potřídy IIb mají dvě domény s různou afinitou k substrátům. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje od 120 do 130 kDa. Zjistilo se, že HDAC 4, 5 a 7 hrají klíčovou úlohu v regulaci proliferace a diferenciaci svalových buněk (Zhang et al, 2002, de Ruijter et al, 2003). Před diferenciací těchto buněk se uvedené HDAC nacházejí v jádře. Během procesu diferenciaci dochází k jejich přemístění do cytosolu a po diferenciaci se HDAC4 vrací znovu do jádra.

Skupina HDAC III zahrnuje NADH závislou Sir rodinu deacetylas, která je rezistentní vůči inhibici trichostatinem A, suberoylanilid hydroxamovou kyselinou (SAHA) a kyselinou valproovou (VA).

Naopak třídy I a II HDAC obsahují v katalytické doméně  $Zn^{2+}$  a vůči jmenovaným agens jsou citlivé (Gui et al, 2004; Dokmanovic et Marks, 2005; Kim et al, 2006). Vysoce specifický inhibiční účinek na histondeacetylasy je dán schopností těchto sloučenin zapadnout do enzymové kapsy HDAC třídy I a II a tvorbou komplexů se  $Zn^{2+}$  ionty (Deubzer et al, 2006).

Knock-out analýzy různých typů HDAC ukazují, že HDAC ze skupiny I hrají roli v buněčném přežití a proliferaci, zatímco HDAC skupiny II mají tkáňově specifickou roli.

Samostatnou skupinu pak vytváří HDAC 11 (skupina IV), ta má v katalytickém centru znaky jak třídy I, tak třídy II histondeacetylas.

HDAC 1, 2, 3, 5, 6, 7 a 10 se víceméně nachází ve všech zkoumaných tkáních, zatímco HDAC 4, 8 a 9 jsou přednostně exprimovány v nádorových buňkách. Různé inhibitory se liší svou afinitou vůči jednotlivým podtypům HDAC, zatím se neprokázalo, zda je výhodnější používat specifický inhibitor spíše než pan-inhibitor (Khan et al, 2007).

Inhibitory histondeacetylasy (HDACi) na základě chemické struktury rozdělujeme do 4 základních skupin (Rosato et Grant, 2004):

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

Inhibitory HDAC regulují přibližně 2 % genů, a to především geny ovlivňující buněčný cyklus, apoptózu a DNA syntézu (Marks et al, 2000; Blagosklonny et al, 2002; Rosato et Grant, 2004). V zástavě buněčného cyklu a růstu, diferenciaci a apoptóze hraje hlavní roli regulace transkripce, která je proto ovlivňována velkým množstvím faktorů. Jedním z nich je právě terciární struktura DNA, která je určující pro přístup transkripčních faktorů k jejich cílovým segmentům a tím pro průběh transkripce. HDAC jsou klíčové pro procesy jako je buněčné přežití, proliferace a diferenciace.

HDACi v nádorových buňkách indukují zástavu buněčného cyklu, zástavu růstu, diferenciaci a/nebo apoptózu. Jsou spojovány s inhibicí jak vaskulární, tak lymfatické angiogeneze a inhibicí reparace DNA poškození po chemoterapii a radioterapii. Všechny tyto účinky zaznamenané na nádorových buňkách jsou minimální u buněk zdravých. Účinnost HDACi se předpokládá pro celou řadu solidních nádorů i hematologických malignit (Menegola et al, 2006).

Antitumorózní aktivita HDACi nevychází pouze z jejich schopnosti regulovat acetylaci histonů, ale zahrnuje i jiné funkce včetně acetylace nehistonových proteinů, jako jsou p53, E2F, retinoblastoma protein a další. Do dnešní doby bylo identifikováno více než 50 nehistonových proteinů, které jsou substráty pro HDAC (Dokmanovic et Marks, 2005). Rovněž modifikace těchto substrátů jsou zahrnuté v rozličných procesech jako je regulace transkripce, proteinová degradace, umlčení genů, DNA oprava a průběh buněčného cyklu (Fu et al, 2004). Další z hypotéz je, že HDACi mo-

hou reaktivovat tumorsupresorové geny, jejichž aktivita byla v průběhu neoplastických transformací utlumena, např. gen CDKN1A, který kóduje CDK inhibitor p21 (Rosato et Grant, 2004).

### **3.3. VNĚJŠÍ A VNITŘNÍ CESTA APOPTÓZY, PROTEINY p53 a p21**

#### **3.3.1. APOPTÓZA**

Je snahou ovlivňovat citlivost nádorů a normálních buněk k protinádorovým látkám tak, aby došlo ke zvýšení účinnosti léčby a snížení toxicity na normální tkáň. Snížená schopnost nádorových buněk umírat v určitém čase apoptózou je jeden z faktorů, který se podílí na vzniku nádorů. Apoptóza je řízená buněčná smrt, která nevyvolává destruktivní zánětovou reakci. Její podstatou je proteolýza intracelulárních bílkovin pomocí kaspas "cytosolic aspartate-specific cystein proteases" (Masopust, 2003). Kaspasy jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy a samy mohou být aktivovány proteolytickým štěpením na specifických aspartátových residuích. Dělíme je na kaspasy iniciátorové (8, 9 a 10) a efektorové (3, 6 a 7). Iniciátorové kaspasy mohou být aktivovány pomocí dvou odlišných cest – tzv. vnitřní a vnější apoptotické cesty.

Vnější cesta se spouští aktivací receptorů smrti (CD 95; CD 120 a TRAIL), které patří do rodiny receptorů TNF. Navázání ligandu na povrchový receptor je spojeno s funkčními a morfologickými změnami. Dochází ke konformačním změnám C-konců receptorových molekul, které vedou k oligomerizaci a vzniku makromolekulárních komplexů. Na tyto komplexy se přímo váže iniciační proteínasa kaspázové kaskády vnější cesty, kaspasa 8. Aktivní kaspasa 8 pak štěpí mnoho dalších substrátů, především prokaspasu 3, která je hlavní efektorovou proteínasou apoptózy.

Vnitřní cesta apoptózy je spouštěna na základě signálů z vnitřního prostředí buňky jako jsou např. volné radikály, anoxie, působení virů a cytostatik. Nejčastějším iniciátorem je ovšem poškození DNA a následná aktivace proteinu p53. Klíčovým momentem vnitřní cesty je zvýšení permeability mitochondriálních membrán. Pro transmembránový potenciál mitochondriální membrány je určující poměr anti- a proapoptoticky působících proteinů. Proapoptotické faktory patří k rodině Bcl-2 (Bax, Bad, Bim, Bid) a nachází se v cytosolu. Na mitochondriální membráně jsou pak kanálové antiapoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-x a Mcl-1. Po přijetí smrtícího signálu dojde ke strukturním změnám, pro- a antiapoptotických členové se setkávají na povrchu mito-

chondrií a tvoří homo- a heterodimery. Při převládnutí proapoptotických faktorů se změni permeabilita membrány, což způsobuje nabobtnání mitochondrií. Nabobtnání je výraznější u vnitřní membrány, která následně způsobí ruptury vnější membrány a porušení respiračního řetězce s uvolněním cytochromu c z intermembránového prostoru. V cytosolu cytochrom c vytváří spolu s Apaf-1 a kaspasou 9 komplex apoptosom, který aktivuje hlavní efektorovou kaspasu 3.

Aktivace kaspasy 3 je sjednocujícím bodem vnitřní a vnější cesty apoptózy. Aktivní kaspasa 3 je zodpovědná za vlastní apoptotický proces. Amplifikuje činnost iniciačních proteinů a podílí se významně zejména na jednom z prvních jevů apoptózy, na fragmentaci DNA (Masopust, 2003; Krejsek a Kopecký, 2004; Řezáčová, 2004).

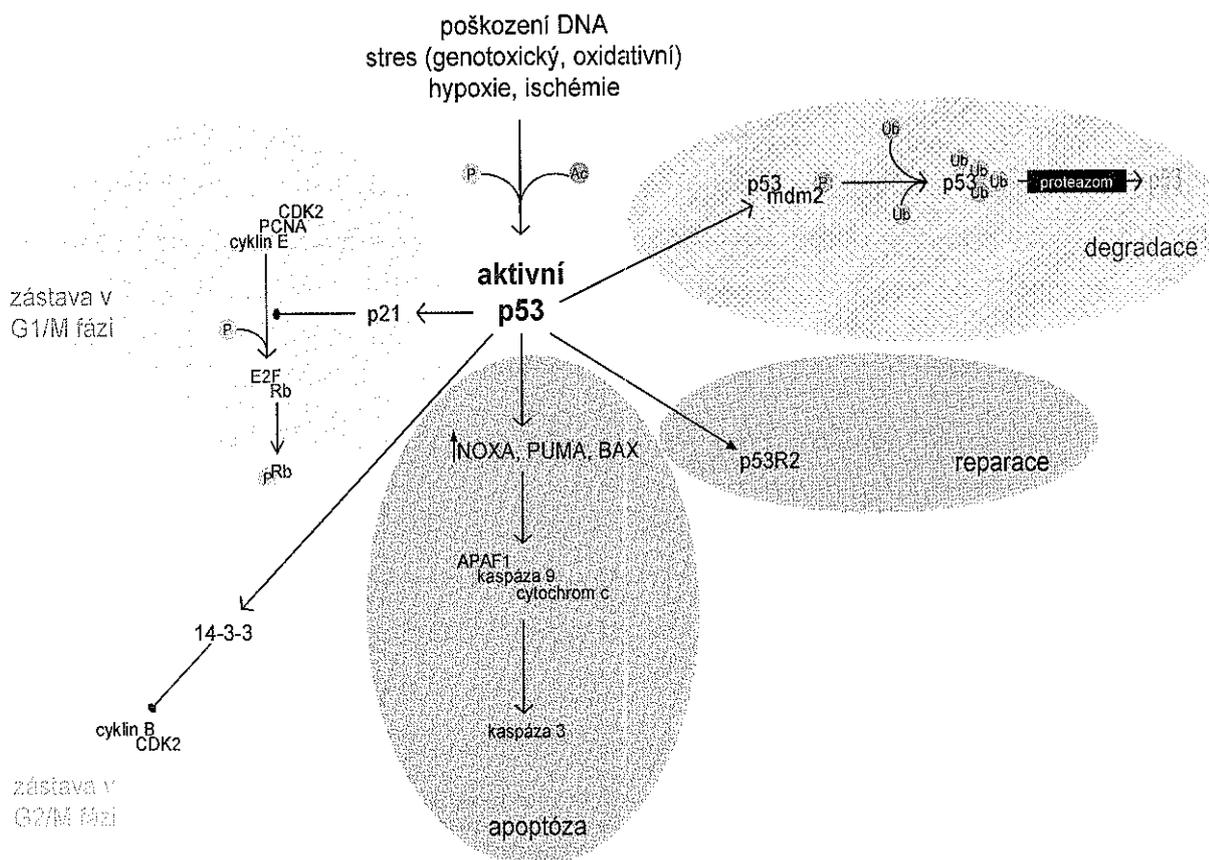
### 3.3.2. PROTEIN p53

Hlavní aktivátor vnitřní apoptotické cesty, protein p53, je transkripční faktor a tumor supresorový protein, tzv. strážce genomu. Je lokalizovaný v jádře, kde kontroluje proliferaci a smrt buňky. Ztráta funkce p53 se považuje za klíčovou v rozvoji rakoviny. Zabraňuje buňkám s poškozenou DNA, aby se dělily se a tak udržuje stabilitu genetické informace. Hladina p53 významně vzrůstá v odpovědi na poškození DNA, aktivaci onkogenů a hypoxii. Ovlivňuje transkripci celé řady proteinů, hlavními výsledky jeho aktivace jsou

- zástava buněčného cyklu v G1/S fázi (přes protein p21),
- zástava buněčného cyklu v G2/M fázi (přes 14-3-3),
- indukce apoptózy při neschopnosti buňky opravit poškození (aktivací proteinů BAX, PUMA, NOXA).

Zástava buněčného cyklu poskytuje čas pro reparaci DNA poškození. Při něm dochází k aktivaci proteinu p53 fosforylací na různých místech různými kinasami: cyklindependentní kinasy (Cdk) katalyzují fosforylací na serinu 315, kaseinkinasa I (CKI) na serinech 6 a 9, kaseinkinasa II (CKII) na serinu 392, proteinkinasa C (PKC) na serinu 378, mitogeny aktivovaná kinasa (MAPK) na threoninu 73 a 83, Jun-amino terminální kinasa (JNK) na serinu 34, DNA-PK na serinech 15 a 37, ATM na serinu 15 a ATR na serinech 15 a 37 (Lakin et Jackson, 1999). Z posttranslačních modifikací dochází jednak k uvedeným fosforylacím na serinových zbytcích 6, 9, 15, 20, 33, 37 a 392, dále k defosforylací serinu 376 a acetylaci lysinových zbytků 320, 373 a

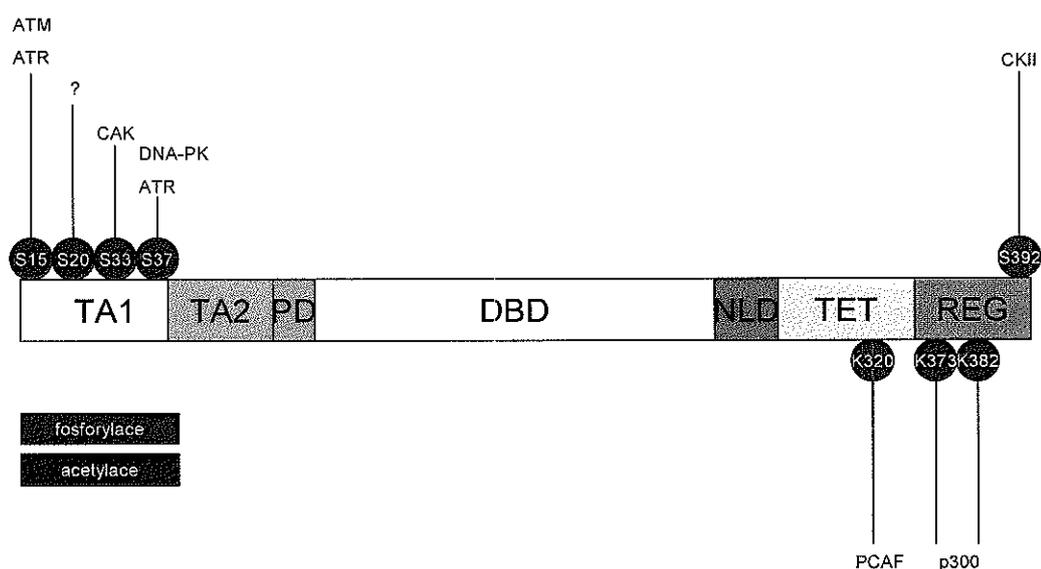
382 (Chehab et al, 1999). Aktivovaný protein p53 zvyšuje expresi proapoptotických cytosolických faktorů PUMA, NOXA a BAX.



**Obr. 2: Nejdůležitější buněčné signální dráhy spuštěné po aktivaci proteinu p53**

Protein p53 je důležitý transkripční faktor, jeho aktivací dochází k indukci nebo inhibici exprese více než 150 genů (Appella et Anderson, 2001). Protein je kódovaný genem *TP53* lokalizovaným na chromozomu 17. Skládá se z 393 aminokyselin (AK), které tvoří 7 domén: N-terminální transkripčně-aktivační doména (TA1) aktivuje transkripční faktory. Druhá aktivační doména (TA2) je důležitá pro apoptotickou aktivitu p53, stejně jako třetí doména bohatá na prolin. Největší část tvoří centrální DNA vazebná doména (DBD), tou se protein p53 jakožto transkripční faktor váže na p53-responsivní úseky DNA a spouští transkripci p53 závislých genů. Pro aktivitu p53 *in vivo* je nutná tetramerizace proteinu, zajišťovaná homo-oligomerizační doménou. Cterminální doména snižuje vazbu p53 na DNA.

Přes 50 % všech nádorových onemocnění je spojeno s mutací proteinu p53, přičemž obvykle je postižena DBD doména. K inaktivaci genu p53 dochází zejména v důsledku malých mutací (missense a nonsense mutace, inserce/delece několika nukleotidů), které vedou jednak k expresi mutantního proteinu (90 % případů) nebo nepřítomnosti proteinu (10 %). V mnoha nádorech, zejména sarkomech, je pozorována abnormální akumulace proteinu mdm2 (murine double minute 2 protein). Inaktivace p53 patří ke klíčovým událostem při transformaci buňky DNA viry, např. SV40 se váže do DNA vazebné domény p53 a znemožňuje vazbu na p53 na DNA. Stejně je tomu u Li Fraumeniho syndromu, což je vrozená predispozice ke vzniku nádorových onemocnění způsobená heterozygotní mutací v *TP53*, právě v místě DBD.



**Obr. 3: Struktura proteinu p53, nejdůležitější místa posttranslačních modifikací a působící enzymy**

V jádře je p53 udržován na nízké hladině díky negativnímu regulátoru mdm2, který způsobuje ubikvitinylaci p53 (má E3 ubikvitin ligasovou aktivitu), export p53 z jádra a jeho následnou degradaci pomocí proteasomu. Vzájemnou interakci p53 a mdm2 výrazně ovlivňují posttranslační modifikace obou proteinů. U p53 dochází k modifikacím na minimálně 18 místech a to zejména v N-terminální části, kterou tvoří cca 100 AK a v C-terminální části (cca 90 AK). N-Konec je především fosforylován, tyto fosforylace jsou důležité pro stabilizaci p53 a klíčové pro acetylaci p53, což v kombinaci vede k plné p53-zprostředkované odpovědi na genotoxický stres. Na C-konci dochází k fosforylacím, acetylacím a sumoylacím. Modifikace na C-konci

inhibují schopnost této domény negativně regulovat sekvenčně specifickou vazbu na DNA, navíc ovlivňují stabilitu, oligomerizaci, jaderný import/export a stupeň ubikvitinylace p53.

Uvedené posttranslační modifikace vznikají v reakci na působení různých faktorů a vedou ke zvýšené stabilitě p53 (brání vazbě s mdm2) a zvýšené transkripční aktivitě. Acetylační místa K373/382 jsou stejná jako vazebná místa pro mdm2, takže p53 acetylace výrazně prodlužuje poločas p53 a snižuje jeho ubikvitinylacii (Zhao et al, 2006). Protein mdm2 interaguje s HDAC1 a dohromady tak zajišťují efektivní spojení deacetylačních a ubikvitinylačních pochodů, které vedou k negativní regulaci funkce p53 (Ito et al, 2002). Acetylace p53 probíhá pomocí p300 a CBP acetylas (Ito et al, 2001).

Dalším důležitým důsledkem acetylace p53 je posílení vazby na p53 cílové geny, včetně p21, což u nich zvyšuje transkripční aktivitu po DNA poškození (Zhao et al, 2006). Deacetylace p53 probíhá pomocí Sir2, který tím pádem slouží jako inhibitor transkripční a proapoptotické aktivity p53 v odpovědi na poškození DNA. Zároveň Sir2 může fungovat jako negativní regulátor procesu stárnutí přes transkripční inaktivaci p53 (Kim et al, 2006). Protein p53 reguluje expresi genů zahrnutých v odpovědi na buněčný stres, v zástavě buněčného cyklu nebo v indukci apoptózy. Má důležitou roli pro aktivaci p21; při indukci p53 pomocí DNA poškozujících agens vyústí v náhradu HDAC1 za tumor supresor na C-konci transkripčního faktoru Sp1, zvýší acetylaci histonů u p21 promotoru a tím vyvolá transkripční aktivaci p21 genu.

### 3.3.3. PROTEIN p21

Protein p21 (také inhibitor cyklin dependentní kinasy 1A - CDKN1A) inhibuje aktivitu cyklin-CDK2 a cyklin CDK4 komplexů, čímž vyvolává zástavu buněčného cyklu v G1/S fázi a umožní opravu poškození DNA. Inhibitory HDAC indukují transkripci proteinu p21 přes akumulaci acetylovaných histonů spojených s promotorem a kódujícími oblastmi genu *CDKN1A* (Richon et al, 2000). Exprese p21 je kontrolována tumor supresorovým proteinem p53, p21 promotor obsahuje 5 vazebných míst pro p53. Inhibitory HDAC však působí zesílenou expresí p21 jak p53-závislým, tak p53-nezávislým mechanismem (Ocker et al, 2007) a v této aktivaci jsou zahrnuty další četné faktory jako ATM (Ju et Muller, 2003) nebo c-myc (Zhao et al, 2006).

Zdá se, že hlavní cesta indukce p21 po působení HDACi je p53-nezávislá a probíhá aktivací Sp1/Sp3 cesty. Promotor p21 obsahuje 6 Sp1 vazebných míst. Proteinová rodina Sp má u lidí 4 členy: Sp1-Sp4; jedná se o transkripční faktory, které se váží pomocí zinc-finger domén na sekvence DNA bohaté na GC. Při poškození DNA se protein p53 váže přímo na Sp1 místo, na oblast kde kompetuje o vazebné místo s HDAC1. Po terapii HDACi je HDAC1 uvolněna z Sp1 vazebného místa na p21 promotoru, což vede ke ztrátě represe a indukci transkripce p21.

Kromě inhibice komplexů cyklin/CDK p21 zároveň blokuje replikaci DNA, tím že se váže na proliferační jaderný antigen (PCNA). O toto vazebné místo kompetuje s DNMT1, takže zvýšená DNMT1 exprese může vyvolávat disociaci p21 z PCNA (Ocker et al, 2007). Protein p21 je specificky štěpen pomocí CASP3-like kaspas, což vede k dramatické aktivaci CDK2. Má také antiapoptotické účinky, brání vstupu buňky do apoptózy, protože při translokaci z jádra do cytoplazmy tvoří komplex s kinasou regulující signál pro apoptózu 1 (Ask1).

### **3.4. HEMATOPOETICKÉ NÁDOROVÉ LINIE**

Akutní leukemie představují značně heterogenní skupinu zhoubných onemocnění krvetvorby vznikající maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Hlavním defektem patologické buněčné populace je maturační a diferenciací porucha. Podle postižených buněk dělíme akutní leukemie do dvou základních skupin: myeloblastické a lymfoblastické. Kmenová buňka pro myeloidní řadu (CFU-GEMM) se může diferencovat různým směrem a v konečném stádiu dát vznik erytrocytům, granulocytům, monocytům a trombocytům. Z kmenové buňky lymfatické řady vznikají postupnou diferenciací lymfocyty T a B. To vysvětluje značnou fenotypickou pestrost akutních leukemií (Klener et al, 2002).

Akutní promyelocytární leukemie (APL) je cytogeneticky charakterizovaná translokací, která vždy zahrnuje chromozom 17 se zlomem v místě kódujícím receptor kyseliny retinové – RAR (Ruthard et al, 1997). Druhým chromozomem účastnícím se translokace je přibližně v 95 % případů APL chromozom 15 (gen promyelocytární leukemie – PML), ve zbylých případech chromozom 11 – geny PLZF (PML zinc finger), NuMA (nuclear matrix-mitotic apparatus), NPM (nucleophosmin) nebo STAT5b (Melnick et Licht, 1999). Takto vzniklé hybridní geny kódují fúzní proteiny, které u hematopoetických prekurzorových buněk blokuje schopnost podstupovat terminální

diferenciaci. Translokace 15;17 a 11;17 jsou primární chromozomální aberace a často jsou jedinou cytogenetickou abnormalitou u APL. Ačkoliv blasty exprimující PML-RAR $\alpha$  jsou klinicky nerozlišitelné od blastů exprimujících ostatní fúzní proteiny, různí se v jedné důležité vlastnosti, a to v odpovědi na působení retinové kyseliny (Phiel et al, 2001). PML-RAR $\alpha$  APL blasty jsou na rozdíl od ostatních APL blastů vysoce citlivé na farmakologické dávky retinové kyseliny (RA) a u většiny pacientů léčených RA dochází k remisi (Phiel et al, 2001).

Receptory pro kyselinu retinovou patří mezi jaderné receptory typu II. Existují tři typy RAR:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . K vazbě na DNA dochází ve formě heterodimeru s RXR (retinoid receptor x), který opět má tři formy,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Heterodimer RAR-RXR se u některých genů váže na části promotorů, označované jako RARE (retinoic acid response element). V nepřítomnosti ligandu – retinové kyseliny – váže heterodimer RAR-RXR kromě DNA korepresory SMRT a N-CoR, které jsou součástí komplexu dalších korepresorů, včetně histondeacetylasy 1. Tak změnami ve struktuře chromatinu způsobuje utlumení exprese cílových genů. V přítomnosti ligandu dochází k uvolnění korepresorového komplexu a receptor se spojuje s transkripčními kofaktory, které zahrnují proteiny s histonacetyltransferasovou aktivitou. Modifikace struktury chromatinu pomocí RAR/RXR přispívá ke kontrole transkripce. Přesné detaily mechanismu, který přenáší RA signál z jaderných receptorů do transkripčního procesu, nebyly dosud na molekulární úrovni objasněny.

Fúzní protein PML/RAR $\alpha$  zastává v APL blastech dvojí funkci, jednak přispívá k transformovanému fenotypu a zároveň slouží jako mediátor diferenciací indukované retinoidy. Zatímco v přítomnosti téměř fyziologických koncentrací RA fúzní protein PML-RAR tlumí transkripci a blokuje diferenciaci, vysoké dávky RA aktivují jím zprostředkovanou genovou transkripci a buněčnou diferenciaci (Göttlicher et al, 2004). Fúzní protein PML/RAR $\alpha$  antagonizuje funkce wild typu proteinů PML, RAR $\alpha$  a RXR. Fúze zachovává funkční všechny domény RAR $\alpha$  s výjimkou domény A, což je jedna ze dvou domén zodpovědných za transkripční aktivaci. PML/RAR $\alpha$  se tedy může vázat na RARE místa v DNA podobně jako wild typ RAR $\alpha$ , většinou rovněž jako heterodimer s RXR. PML-RAR $\alpha$  váže korepresory SMRT a N-CoR a další asociované proteiny včetně HDAC1, a to silněji než RAR $\alpha$ . V nepřítomnosti ligandu je inhibiční účinek fúzního PML-RAR $\alpha$  vyšší než inhibiční účinek RAR $\alpha$ . Vazebná doména pro retinovou kyselinu je zachována, avšak k uvolnění korepresorů z vazby

na PML/RAR $\alpha$  je zapotřebí zhruba 1000x vyšší koncentrace RA – zatímco pro aktivaci RAR $\alpha$  jsou postačující koncentrace ATRA v řádu nmol/l, u PML-RAR $\alpha$  to jsou  $\mu$ mol/l. Tato fakta jsou v souladu s teorií, že PML-RAR působí při nižších koncentracích retinoidů jako dominantní negativní receptor, který spotřebovává kritické komponenty a zabraňuje jejich intrakci s wild typem RAR $\alpha$ .

Terapeutické dávky ATRA ( $\mu$ mol/l) tedy překonávají zvýšenou afinitu PML-RAR k represorovým proteinům a vedou k aktivaci transkripce genů obsahujících RARE. Dochází rovněž k normalizaci jaderné distribuce ostatních složek komplexu (RXR, wild-type PML, PLZF), ke zvýšené degradaci PML-RAR a ke zvýšení exprese wild-type RAR $\alpha$ . Inhibitory HDAC by měly potlačit aktivitu korepresorového komplexu obsahujícího prokazatelně HDAC1 a tím zvýšit účinek (Melnick et Licht, 1999). Zatímco schopnost blokovat hematopoetickou diferenciaci závisí na neporušené DNA vazebné doméně, RA cílové geny pravděpodobně představují downstream efekty PML-RAR. Fúzní protein blokuje diferenciaci tlumením RA-závislých genů zahrnutých v kontrole diferenciaci hematopoetických prekurzorových buněk. Studie mechanismu, kterým PML-RAR reguluje transkripci, jsou limitovány skutečností, že represe ještě nebyla analyzovaná v nativním chromatinu. V nepřítomnosti RA PML-RAR zvyšuje kondenzaci chromatinu. Protože trichostatin A dokáže tento efekt překonat, předpokládáme, že příčinou je abnormální zvyšování HDAC aktivity (Marks et al, 2000). PML-RAR tedy způsobuje vyšší kondenzaci chromatinu, který pak zůstává méně přístupný dokonce i v přítomnosti RA.

Buněčná linie HL-60 byla odvozená od periferních leukocytů získaných leukoferézou krve 36-leté pacientky s akutní promyelocytární leukemií. Přibližně 10 % HL-60 buněk spontánně diferenciuje (dle European Collection of Cell Cultures), diferenciaci může být stimulována polárními planárními sloučeninami jako je butyrát, hypoxantin, dimethylsulfoxid, aktinomycin D a kyselina retinová (Collins et al, 1978). Buňky nemají *TP53*, mají normální nebo zvýšenou expresi *bcl-2* a minimální expresi *bcl-X<sub>L</sub>*. Jsou relativně radiorezistentní, apoptóza je pozorována podobně jako u T-lymfomových linií bez *TP53* či je s jeho mutovanou formou až po bloku v G2 fázi buněčného cyklu (Vávrová et al, 2002).

Linie MOLT-4 je suspenzní kultura odvozená z periferní krve 19-letého pacienta s akutní lymfoblastickou leukemií v relapsu. Buňky mají protein p53 s bodovou mutací G-> A na kodonu 248 *TP53* (dle American Tissue Culture Collection). Jsou

velmi citlivé k účinkům ionizujícího záření podobně jako buňky HSB-2 pre-T-lymfomové linie s wild typem p53 (Vávrová et al, 2002).

Linie U-937 byla získána z pleurální efuze pacienta s histiocytárním lymfomem. U buněk U-937 může být indukována terminální diferenciace do monocytů pomocí forbolesterů, vitamínem D3, gamma interferonem, TNF a retinovou kyselinou (dle American Tissue Culture Collection).

Velká část chemoterapeutických látek a ionizující záření indukuje u hematopoetických nádorových buněk programovanou buněčnou smrt. Výsledkem působení těchto látek může být aktivace kaspas působením proapoptotických molekul jako je cytochrom c vyplavený z prostoru mitochondriální membrány. U některých buněčných typů protinádorové látky mění expresi receptorů smrti a tímto zvyšují citlivost nádorových buněk k odpovídajícímu ligandu. Obecně hematopoetické linie jsou citlivé k apoptóze a jejich smrt má obvykle typické znaky apoptózy (Vávrová et al, 2002).

### **3.5. ZMĚNY V HDAC U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Strukturální mutace HDAC spojené s rakovinou jsou vzácné, zato častější jsou změny v expresi různých HDAC (Kim, 2003). Abnormální aktivita HDAC ústí v transkripční represí specifických tumor supresorových genů, což přispívá k tvorbě nádorů stejně jako inaktivace HAT (Karagiannis, 2006). Zvýšení exprese odlišných typů histondeacetylasy je charakteristické v odlišných nádorech. HDAC1 je zvýšena v nádorech prostaty a žaludku, HDAC2 v nádorech žaludku, HDAC3 u rakoviny plic. HDAC8 možná přispívá k tumorigenezi tím, že reguluje aktivitu telomeras přes interakci s její katalytickou podjednotkou (Khan et al, 2007). U myeloidní leukemie byla prokázána abnormální aktivita HAT a HDAC; např. acetyltransferasy p300 a CREB vazebný protein, které jsou obecně pokládány za nádorové supresory, mají narušenou funkci. Naopak PML/RAR $\alpha$  fúzní proteiny tvoří komplexy s HDAC, a tak přispívají k útlumu cílových genů (Kuendgen, 2008). U skupiny pacientů s akutní promyelocytárním leukemií je necitlivost vůči kyselině retinové podložena nevhodnou expresí HDAC (Glaser et al, 2003).

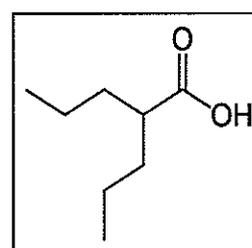
Potenciální terapeutické účinky HDACi mají výjimečnou důležitost, protože dokáží indukovat protein p21 i cestou nezávislou na p53, přičemž právě mutace proteinu p53 je jednou z nejběžnějších změn pozorovaných u nádorů. Mutace

v kódujících oblastech p21 zatím nejsou známe, na rozdíl od epigenetické inaktivace hypermethylovaných GC-bohatých oblastí promotoru v blízkosti iniciačního místa transkripce, která je běžně pozorovaná u lidských nádorů (Ocker et al, 2007).

Inhibitory histonedeacetylasy se zdají být vhodnými kandidáty zejména pro terapii leukemických onemocnění, protože právě u nich dochází ke vzniku specifických onkogenních fúzních proteinů, které umožňují vazbu histonedeacetylasy komplexům na promotory cílových genů a tyto události mohou tvořit hlavní krok v rozvoji leukemií (Gaymes et al, 2006).

### 3.6. KYSELINA VALPROOVÁ JAKO INHIBITOR HISTONDEACETYLAS

Kyselina valproová, 2-propylpentanová kyselina, je v klinické praxi používána již téměř třicet let a je lékem volby v terapii některých druhů epilepsie. Chemicky se jedná o osmiuhlíkatou rozvětvenou mastnou kyselinu s antikonvulzními vlastnostmi, malým distribučním objemem (0,13-0,19 L/kg) a plazmatickým poločasem od 9 do 18 hodin. Biodostupnost po orálním podání je téměř 100%, může být podána i intravenózně a vazba



Obr. 4: Strukturální vzorec kyseliny valproové (2-propylpentanové)

na bílkoviny dosahuje 80-95 % (Kuendgen et Gattermann, 2007). Kyselina valproová potlačuje generalizované a parciální záchvaty, působí jako stabilizátor nálady, využívá se v terapii bipolárních poruch, migrény a neuropatické bolesti. Mechanismus účinku je komplexní, kyselina valproová zvyšuje hladinu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA), potencuje GABAergní funkce, zeslabuje neuronální excitaci indukovanou NMDA-typem receptorů glutamátu a předpokládá se, že alteruje dopaminergní a serotoninergní funkce (Löscher W, 1999; Perucca, 2002). Navíc ovlivňuje aktivitu některých enzymů, souvisejících s metabolismem mozkových buněk, jako je sukcinát-semialdehyddehydrogenasa, GABA-transaminasa a  $\alpha$ -oxoglutarát dehydrogenasa (Johannessen, 2000). Proto je spektrum antikonvulzní aktivity kyseliny valproové velmi široké a působí na celou řadu záchvatů.

V posledních letech se zájem soustředí především na její relativně nedávno objevené antitumorózní vlastnosti (Blaheta et Cinatl, 2002). Mechanismus antitumorózního účinku je zcela odlišný od působení antiepileptického, stejně jako mecha-

nismy vedoucí k hepatotoxicitě. Protinádorovým účinkem se kyselina valproová řadí mezi inhibitory histondeacetylas.

Některé inhibitory HDAC mají omezené terapeutické využití kvůli nízké biodostupnosti *in vivo* a stejně tak kvůli nežádoucím vedlejším účinkům při účinných dávkách. Oproti ostatním mastným kyselinám má VA výhodu, že je již dlouhou dobu používána v klinické praxi, může být aplikována perorálně, nežádoucí účinky jsou vzácné a biologický poločas je přibližně 9-18 hodin oproti 5 minutám u fenylbutyrátu (Blaheta et Cinatl, 2002) nebo 30 minutám butyrátu sodného (Camphausen et al, 2005). Koncentrace VA se pohybuje v ustáleném stavu v rozmezí 50-100  $\mu\text{g/ml}$  (0,35-0,7 mmol/l). Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly stanoveny na 0,5 mmol/l pro buňky neuroblastomu a 1,0 mmol/l pro buňky gliomu, z čehož vyplývá, že terapeutické hodnoty dosahované při léčbě epilepsie jsou dostačující pro vyvolání antitumorózního účinku (Blaheta et Cinatl, 2002).

Při podání v těhotenství může kyselina valproová vyvolat malformace a vrozené vady, jako např. defekty neurální trubice. Mechanismus teratogenity je opět odlišný od antiepileptického působení (Göttlicher et al, 2001) a zřejmě souvisí s inhibicí HDAC (Göttlicher, 2004), neboť podobný teratogenní účinek byl prokázán i po trichostatínu A (Phiel et al, 2001). Dosud všechny používané HDACi vykazují při testování teratogenní účinky (Menegola et al, 2007). Zároveň se předpokládá vazba mezi teratogenitou kyseliny valproové a jejími schopnostmi diferencovat nádorové buňky (Deubzer et al, 2006). Bylo popsáno, že VA může indukovat diferenciaci buněčných linií odvozených od neuroblastomu, gliomu, teratokarcinomu a leukemických blastů izolovaných z pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (Gurvich et al, 2004).

Kyselina valproová je selektivní inhibitor, svým účinkem postihuje třídy I a II HDAC, s výjimkou HDAC 6 a 10 ze třídy II, jejichž aktivitu neovlivňuje, a zároveň vyvolává proteasomální degradaci HDAC třídy II (Kramer et al, 2003; Kostrouchová et al, 2007). Kyselina valproová dávkově závislým způsobem inhibuje proliferaci, indukuje protein p21 a tím zvyšuje procento buněk v G0/G1 fázi (Kaiser et al, 2006).

### 3.7. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI

Kyselina valproová ovlivňuje celou řadu signálních cest, má četné biologické účinky a působí synergicky nebo aditivně s různými protinádorovými agens, jako je radiační terapie, chemoterapie, terapie diferenciacními agens a mnoho dalších.

Radioterapie je široce používanou metodou pro léčbu různých typů nádorů, celosvětově se předpokládá, že 50 % pacientů s nádorovým onemocněním je ozařováno (Karagiannis et al, 2006). Látka, která by zvýšila citlivost nádorových buněk vůči ionizujícímu záření bez ovlivnění zdravých buněk, by byla velmi vítaným příspěvkem v terapii. Doposud žádná taková látka nebyla schválena, i když mnohé sloučeniny se v preklinických studiích jeví nadějně. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem *in vitro* zvýšily citlivost nádorových buněk tím, že ovlivňují jejich schopnost reparovat poškození DNA vyvolané ionizujícím zářením. Jiné inhibitory HDAC pak zesilují radiací indukovanou apoptózu, zeslabují funkci DNA reparačních proteinů a zkracují G2/M blok vyvolaný radiací, což vede také ke zvýšené indukci apoptózy. Trichostatin A aplikovaný před ozářením snižuje přežití buněk, zvyšuje apoptózu a zvyšuje fosforylaci H2AX (Karagiannis et al, 2005). Fosforylace histonu H2AX může být použita jako prediktivní marker odpovědi na poškození ionizujícím zářením (Kim et al, 2006).

Ionizující záření vyvolává celou řadu poškození v buňce. Z nich nejzávažnější představují dvojité zlomy DNA (DSB). Pokud selže jejich oprava, tak dochází k chromozomové nestabilitě a akumulaci mutací. Při normálně fungujících kontrolních bodech buňka zastavuje svůj cyklus, čímž získá čas pro reparaci nebo pokud je poškození neopravitelné, tak se spouští apoptóza. Při dalších defektech (např. mutaci p53) dochází postupně k akumulaci mutací a nádorovému zvrhnutí buňky.

Mechanismus odpovědi na poškození DNA zahrnuje senzor, který rozpozná poškození, transdukční kaskádu a efektorové molekuly. Na počátku v odpovědi na dvojité zlomy DNA stojí ATM kinasa, která je aktivována přímo poškozením DNA. Je produktem *ATM* genu, který je mutovaný u lidského onemocnění ataxia-telangiectasia. Jedná se o komplexní multisystémové onemocnění s predispozicí k malignitám. Hlavními cíli ATM kinasy jsou proteiny p53, mdm2, checkpoint kinasa 1 (ChK1), checkpoint kinasa 2 (ChK2), breast cancer 1 protein (Brca1) a Nijmegen Breakage Syndrome protein (Nbs1). Díky nim aktivace ATM zastavuje proliferaci a

dává čas pro reparaci poškození. Jeden z prvních cílů fosforylovaných pomocí ATM kinasy je histon H2AX, nutný pro účinnou opravu poškození (Vidanes et al, 2005). Kontrolní bod G1/S fáze je řízený přes protein p53, ATM kinasa ho aktivuje a stabilizuje, protože fosforylace p53 na serinu 15 brání vazbě s negativním regulátorem mdm2. Aktivací checkpoint kinas 1 a 2 řídí kontrolní bod G2/M fáze. Aktivace BRCA1 pomocí ATM je nutná pro indukci některých genů, jako např. *CDKN1A* (Khanna et Jackson, 2001).

Základním diferenciacním agens je kyselina *all-trans*-retinová (ATRA) používaná v terapii akutní promyelocytární leukemie, kdy vyvolává terminální diferenciaci APL blastů do zralých granulocytů (Minucci et al, 2001). Fúzní onkoprotein PMLRAR $\alpha$  se váže na promotory RA cílových genů a způsobuje jejich represi. Tyto fúzní proteiny působí ve formě komplexů, které obsahují kromě korepresorů SMRT a N-CoR také HDAC1. V nepřítomnosti RA PML-RAR způsobuje vyšší kondenzaci chromatinu, který pak zůstává méně přístupný. Proto terapie HDACi a RA odvrací blok diferenciaci u APL blastů *in vitro* a indukuje remisi onemocnění *in vivo* tím, že inhibuje resp. uvolňuje HDAC-RAR $\alpha$  fúzní represorový komplex (Ferrara et al, 2001). ATRA receptorový komplex je neschopný vazby na promotory cílových genů kvůli epigenetickým modifikacím, jako hypermethylace CpG ostrůvků, korepresory a deacetylase histonů (Raffoux et al, 2005). Inhibitory HDAC *in vitro* obnovují RA transkripční aktivaci a indukují diferenciaci primárních blastů získaných od pacientů s akutní myeloidní leukemií (He et al, 2001).

Zkoušky *in vitro* i *in vivo* probíhají s celou řadou dalších kombinací chemoterapeutik jako je TRAIL (Rosato et al, 2003), antracyklinová antibiotika a další.

### **3.8. KYSELINA VALPROOVÁ V KLINICKÉ PRAXI**

Epigenetické alterace představují v současnosti jednu z nejvíce zkoumaných oblastí v klinickém a preklinickém výzkumu myeloidních nádorů. Je to především z toho důvodu, že oproti genetickým aberacím je možné epigenetické změny farmakologicky zvrátit a tak obnovit funkci utlumených genů. Studium se zaměřuje především na dvě odlišné skupiny epigeneticky aktivních látek: inhibitory DNA methyltransferas a inhibitory histondeacetylase, které jsme zkoumali v naší laboratoři.

Jako první z inhibitorů HDAC se v praxi použil fenylobutyryát. U pacienta s četnými relapsy po terapii kyselinou retinovou došlo k remisi onemocnění po léčbě

fenylbutyrátem. Nevýhodou je, že fenylbutyrát je po i.v. podání velice rychle odbouráván, a proto se musí podávat ve vysokých dávkách, přesahujících 400 mg/kg/den (Göttlicher et al, 2001). Prvním inhibitorem HDAC, který americký Úřad pro kontrolu léčiv a potravin (Food and Drug Administration, FDA) uznal jako lék, byl v roce 2006 vorinostat neboli kyselina suberoylanilid hydroxamová (SAHA) pro terapii kožního T-buněčného lymfomu. SAHA silně indukuje apoptózu v lidských leukemických buňkách p53 nezávislou cestou, která je částečně regulovaná Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> a p21 (Vrana et al, 1999). SAHA vykazuje antitumorózní aktivitu jak u solidních, tak hematologických malignit.

V současné době je 12 různých inhibitorů histondeacetylasy ve více než stovce klinických studiích. Konkrétně kyselina valproová prochází celou řadou zkoušek jako možné terapeutikum pro léčbu akutní promyelocytární leukemie a myelodysplastického syndromu a to jak samostatně, tak v kombinační terapii např. s ATRA nebo demethylačními agens (Kuendgen et Gattermann, 2007).

Pilotní klinická studie zahrnovala 23 pacientů s akutní myeloidní leukemií a myelodysplastickým syndromem (MDS). Kyselina valproová byla podávána v dávkách pro dosažení sérové koncentrace 50-100 µl/ml a ATRA 80 mg/m<sup>2</sup> (Kuendgen et al, 2005). Všeobecná odpověď (overall response rate) byla 35 %, ale překvapivě u pacientů léčených pouze VA dokonce 44 %. Naopak žádný z 5 pacientů, kteří od počátku měli kombinační terapii, na léčbu neodpovídal. Odpověď na monoterapii kyselinou valproovou se ukázala lepší než na prvořadou kombinační léčbu. Je možné, že pro uvolnění represe signální cesty kyseliny retinové je nutná inhibice HDAC. Proto synergický účinek obou léků pravděpodobně vyžaduje předléčbu pomocí VA (Kuendgen et al, 2004). Následující širší studie se 122 pacienty ukázala response rate 20 %, přičemž odpověď byla opět silnější u pacientů léčených pouze VA oproti kombinaci (Kuendgen et al, 2005).

Warell et al. použili u pacientky s ATRA rezistentní promyelocytární leukemií fenylbutyrát sodný (PB). Leukemické buňky byly eliminovány z kostní dřeně po 23 dnech léčby, kombinací *all-trans*-retinové kyseliny a fenylbutyrátu došlo ke klinické a cytogenetické remisi (Warrell et al, 1998).

Dvacet pacientů s refraktorní AML nebo MDS bylo léčeno kyselinou valproovou v koncentraci 10 mg/kg/den pro dosažení sérové hladiny 45-100 µg/ml. ATRA byla přidána v koncentraci 45 mg/m<sup>2</sup>/den, když VA dosáhla cílené sérové koncentrace. U 30 % pacientů byl pozorován klinický benefit (Pilatrinio et al, 2005). Stejně

uspořádání měla studie s 11 staršími pacienty (medián věku 82 let). Kompletní dřevňová odpověď byla u tří z nich, z toho jedna celková remise, u dalších dvou došlo k hematologickému zlepšení (Raffoux et al, 2005).

Hyperacetylace histonů byla spojena s diferenciací leukemických buněk, i když v různém rozsahu mezi pacienty, jak ukázaly změny v morfologii blastů. Zároveň byl patrný pokles nezralých buněk a současný nárůst buněk se specifickou enzymatickou aktivitou nebo s markery zralých buněk. Předpokládá se, že sekvenční podávání kyseliny *all-trans*-retinové po valproové synergizuje odpověď blastů. Klinická léčba inhibitory histondeacetylasy indukuje hyperacetylaci cílových genů a může obnovit citlivost k antileukemickým účinkům ATRA u akutní promyelocytární leukemie. Podobná terapie by mohla být užitečná u jiných neoplastických onemocnění, která jsou spojena s onkogenní represí genové transkripce vlivem působení histondeacetylasy (Cimino et al, 2006). Ačkoliv VA řadíme mezi první generaci inhibitorů HDAC, pro svoje obrovské výhody jako je perorální aplikace, stabilní sérové koncentrace, málo nežadoucích účinků a dobrá tolerance, je valproová kyselina slibným lékem především pro kombinační léčbu v terapii akutní promyelocytární leukemie (Kuendgen et al, 2004).

## **4. MATERIÁL A METODIKY**

### **4.1. BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY**

#### **4.1.1. MOLT - 4**

Buňky lidské T-lymfocytární leukemie MOLT-4 (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA) byly kultivovány v Iscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR) s 20% obsahem fetálního telecího séra (FBS; PAA Laboratories GmbH, Rakousko), glutaminem a antibiotiky (penicilin, streptomycin), v inkubátoru při 37 °C a kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Kultura byla pasážována každý druhý až třetí den s konečným ředěním 2.10<sup>5</sup> buněk/ml. Buňky jsme počítali pomocí hemocytometru a integritu buněčné membrány jsme určovali trypanovou modří. Použity byly buňky z maximálně dvacáté pasáže.

#### **4.1.2. HL-60**

Buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 (Porton Down, Salisbury, GB) byly kultivovány v Iscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR) s 20% obsahem fetálního telecího séra (FBS; PAA Laboratories GmbH, Rakousko), glutaminem a antibiotiky (penicilin, streptomycin), v inkubátoru při 37 °C a kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Kultura byla pasážována každý druhý až třetí den s konečným ředěním 2.10<sup>5</sup> buněk/ml. Buňky jsme počítali pomocí hemocytometru a integritu buněčné membrány jsme určovali trypanovou modří. Použity byly buňky z maximálně dvacáté pasáže.

#### **4.1.3. U-937**

Buňky lidského histiocytárního lymfomu U-937 byly kultivovány v Iscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma-Aldrich, s.r.o., Praha, ČR) s 10% obsahem fetálního telecího séra (PAA Laboratories GmbH, Rakousko), glutaminem a antibiotiky (penicilin, streptomycin), v inkubátoru při 37 °C a kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Kultura byla pasážována každý druhý až třetí den s konečným ředěním 2.10<sup>5</sup> buněk/ml. Buňky jsme počítali pomocí hemocytometru a integritu buněčné membrány jsme určovali trypanovou modří. Použity byly buňky z maximálně dvacáté pasáže. Kontrolní buňky U-937 bulk byly transfekovány pouze prázdným vektorem PSG-MtNEO, k buňkám

U-937 PML/RAR jsme 24 hodin před experimentem přidali síran zinečnatý 50 mmol/l, protože gen je exprimován pouze v přítomnosti  $Zn^{2+}$ . Buňky byly získány a použity se souhlasem profesora P.G. Pelicciho (European Institute of Oncology, Milan).

## **4.2. FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ**

### **4.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ**

Kyselinu valproovou (Sigma-Aldrich, s r.o., Praha, ČR) jsme rozpustili ve fosfátovém pufru (PBS), čímž byl získán zásobní roztok o koncentraci 100 mmol/l, který byl dále ředěn kompletním médiem na požadovanou koncentraci. Zásobní roztok byl skladován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Exponenciálně rostoucí linie buněk byly suspendovány v koncentraci  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  v kompletním médiu obsahujícím požadovanou koncentraci VA (0,5-10 mmol/l). Buňky byly kultivovány po různé časové intervaly při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ .

### **4.2.2. KYSELINA ALL-TRANS-RETINOVÁ**

Kyselina *all-trans*-retinová (Sigma-Aldrich, s r.o., Praha, ČR) byla rozpuštěna v ethanolu, čímž byl získán zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l, který byl dále ředěn kompletním médiem na požadovanou koncentraci. Zásobní roztok byl do doby použití uchováván při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (nejdéle však 1 měsíc). Exponenciálně rostoucí linie buněk byly suspendovány v koncentraci  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  v kompletním médiu obsahujícím požadovanou koncentraci ATRA (1  $\mu\text{mol/l}$ ). Buňky byly kultivovány po různé časové intervaly při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ .

## **4.3. OZAŘOVÁNÍ**

Exponenciálně rostoucí linie buněk byla suspedována v kompletním médiu na koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk/ml. Suspenze o objemu 10 ml byla ozářena v  $25\text{ cm}^2$  kulti-vační lahvičce (Nunc) při pokojové teplotě použitím  $^{60}\text{Co}$  jako zdroje gama záření s dávkovým příkonem 0,66 Gy/min. Ihned po ozáření byly lahvičky přeneseny do inkubátoru a inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V určených intervalech byla odpovídající část suspenze odebrána a použita k analýze.

#### **4.4. IN VITRO ZKOUŠKA KLONOGENITY**

Pro hodnocení působení kyseliny valproové byly buňky kultivovány v kompletním médiu s různou koncentrací kyseliny valproové. Po 3 dnech jsme buňky vyseli na 0,9% methylcelulózu v Iscově médiu se 30 % obsahem fetálního telecího séra a 14 dní je kultivovali. Pro hodnocení kontinuální expozice kyselině valproové byly buňky kultivovány přímo na 0,9% methylcelulóze v Iscově médiu se 30% obsahem fetálního telecího séra a s rostoucími koncentracemi kyseliny valproové. Všechny pokusy na polotekutých kulturách byly dělány dvakrát. Buňky HL-60 byly navíc stimulovány 10% kondiciovaným médiem z lidské linie buněk 5637 karcinomu močového měchýře a čtyřmi jednotkami erythropoetinu na 1 ml média. Kolonie (obsahující 40 a více buněk) byly počítány za 14 dní po inkubaci v 5% CO<sub>2</sub> a 5% O<sub>2</sub> při 37 °C.

Pro výpočet hodnoty D<sub>0</sub> bylo použito křivek přežití, které byly získány ozářením buněk stoupající dávkou záření v rozmezí 0,5-10 Gy. Pro výpočet hodnoty EC<sub>50</sub> bylo použito křivek přežití, které byly získány kultivací buněk se stoupající koncentrací kyseliny valproové v médiu. Byly provedeny dva nezávislé experimenty (vždy po dvou měření).

#### **4.5. FLOW-CYTOMETRICKÉ ANALÝZY**

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

*Analýza obsahu DNA a buněčného cyklu* – 5.10<sup>5</sup> buněk v buněčné suspenzi bylo dvakrát promyto fosfátovým pufrem a fixováno v 70% ethanolu. Po centrifugaci a odstranění ethanolu byly buňky promyty ledově chladným PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml citrát-fosfátového pufru a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Nakonec byly buňky barveny

v 0,5 ml Vindelova roztoku a podrobeny analýze na flow cytometru Coulter Epics XL (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk. Získané výsledky byly zpracovány pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systém, San Diego, USA) a bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

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

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

#### **4.6. IMUNOCYTOCHEMIE**

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

#### **4.7. ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING**

V požadovaných časových intervalech jsme připravili buněčné lyzáty pomocí pufru s obsahem oktyl- $\beta$ -D-glucopyranosidu (dezintegrace buněčných membrán) a o-vanadičnanu sodného (inhibice fosfatasy).

Obsah bílkoviny ve vzorku byl stanoven pomocí bicinchoninové kyseliny (Sigma-Aldrich, s r.o, Praha, ČR).

Lyzáty obsahující stejné množství proteinu (30  $\mu$ g) byly denaturovány pomocí vzorkového pufru s obsahem SDS a  $\beta$ -merkapt ethanolu a jednotlivé vzorky nasazeny do jamek polyakrylamidového gelu (5-15%). Po elektroforetickém rozdělení proteinů na základě odlišných molekulových hmotností byly proteiny přeneseny na polyvi-

nylidenefluoridovou (PVDF) membránu (BioRad, USA). Vše jsme prováděli v zařízení MiniProtean III firmy BioRad.

Membránu jsme zablokovali v TRIS pufru s 5% obsahem mléka a inkubovali s primární protilátkou při 4 °C přes noc za mírného třepání (anti-acetylovaný histon H3, anti-acetylovaný histon H4, anti- $\gamma$ H2AX – Cell Signal; anti-p53, anti-fosforylovaný p53 na serinu 392 – Exbio; anti-lamin B – Calbiochem; anti-p21, anti- $\beta$ -aktin – Sigma). Druhý den jsme membránu promyli a poté hodinu inkubovali s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Dako, Dánsko). Signál jsme detekovali chemiluminiscenčním kitem (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Diagnostic, ČR) na modrocitlivých rentgenových filmech (Foma, ČR).

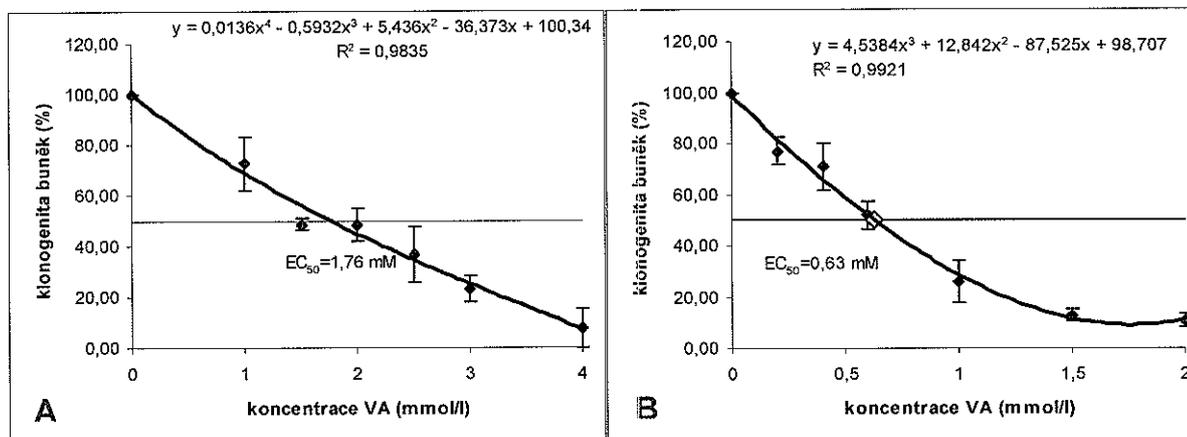
Optická hustota byla hodnocena pomocí KODAK Image Station 4000MM Digital Imaging Systém.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. MOLT-4

#### 5.1.1. KYSELINA VALPROOVÁ

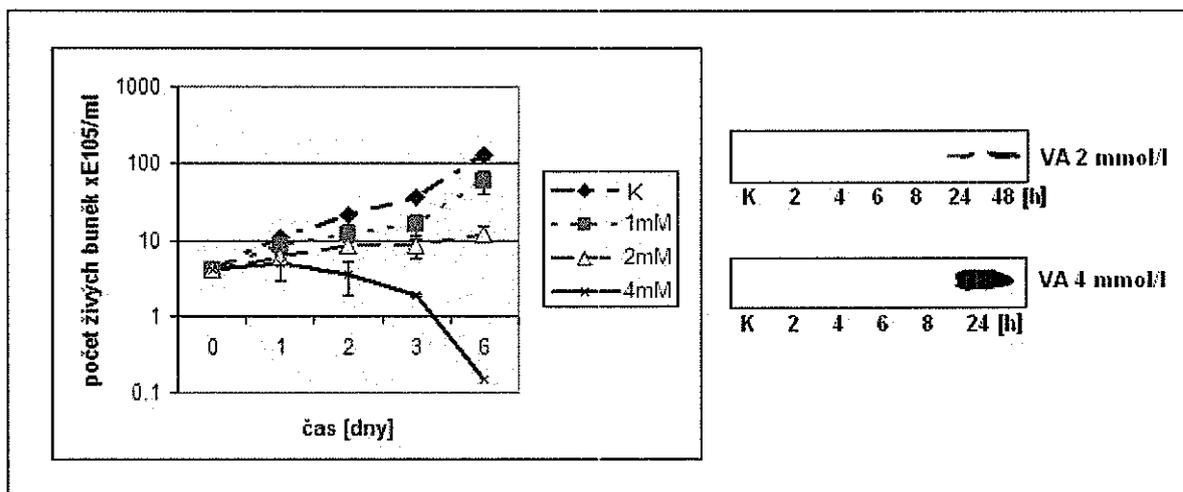
U linie MOLT-4 jsme nejprve pomocí zkoušky klonogenity stanovili hodnotu  $EC_{50}$ , což je koncentrace kyseliny valproové, která vyvolá buněčnou smrt u 50 % buněk v kultuře. Buňky jsme 3 dny kultivovali v kompletním médiu s kyselinou valproovou o různých koncentracích a pak je na 14 dní vysadili na methylcelulózový gel s 30% obsahem fetálního telecího séra. Hodnota  $EC_{50}$  byla po 14 dnech kultivace určena na základě zachované klonogenní schopnosti buněk, tzn. počítali jsme kolonie tvořené alespoň 40 buňkami. Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena 1,76 mmol/l pro 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou. Pro hodnocení dlouhodobého účinku kyseliny valproové na buňky jsme tyto kultivovali po 14 dní na methylcelulózovém gelu s 30% obsahem fetálního telecího séra a v přítomnosti rostoucích koncentrací kyseliny valproové. Hodnotu  $EC_{50}$  jsme po 14 dnech kultivace v přítomnosti VA stanovili na 0,63 mmol/l. (Obr. 5)



Obr. 5: A) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  pomocí zkoušky klonogenity u buněk MOLT-4 po 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou o různých koncentracích a následné hodnocení zachovaných klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulózovém gelu s různými koncentracemi kyseliny valproové. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

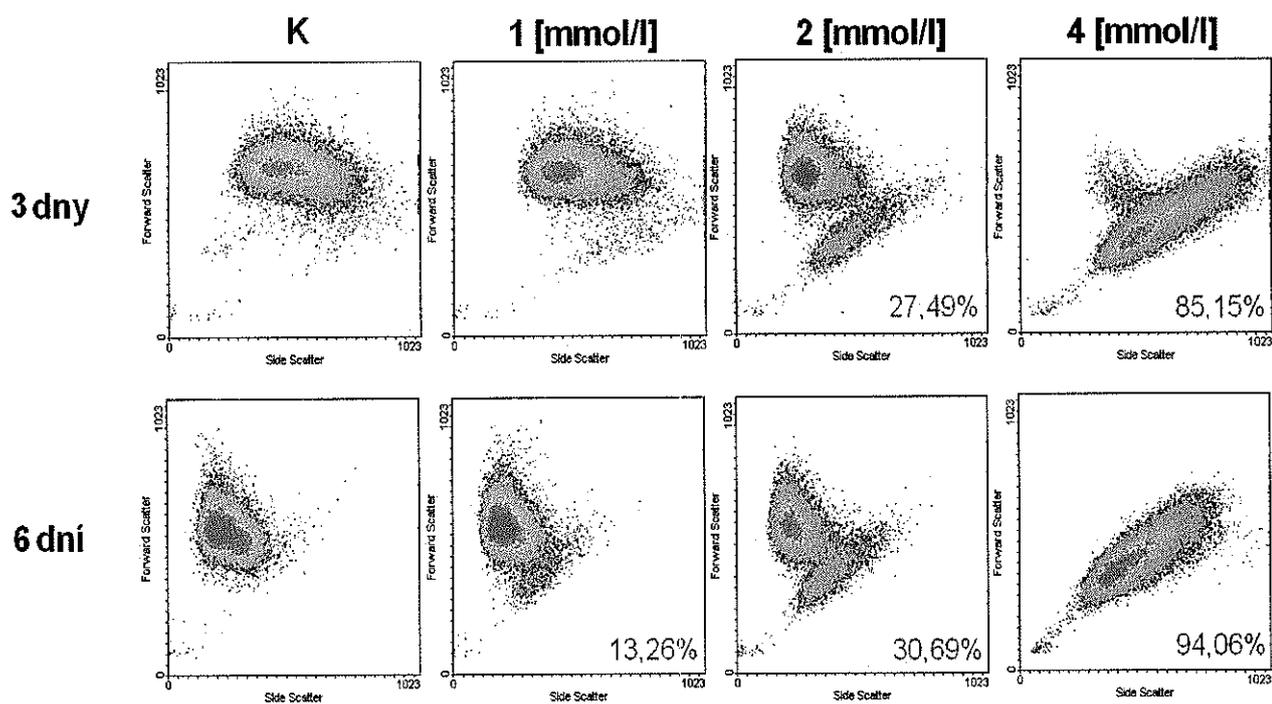
Viabilitu a proliferaci buněk jsme hodnotili na základě jejich barvení pomocí trypanové modři. Živé buňky s intaktní membránou jsou pro trypanovou modř neprostopné, kdežto do mrtvých buněk barvivo vstupuje a barví je modře. Koncentrace 2 mmol/l vyvolává v kultuře MOLT-4 inhibici proliferace a mírnou apoptózu, zatímco koncentrace 4 mmol/l způsobuje zánik buněk apoptózou a eradikaci kultury.

Pro potvrzení, že buňky umírají apoptózou, jsme využili elektroforézy a Western blottingu. Sledovali jsme protein jaderné membrány lamin B, který je během apoptózy štěpen kaspasami na fragmenty. Štěp se objevuje 24 hodin po začátku inkubace s kyselinou valproovou. Působení koncentrace 4 mmol/l vyvolává mnohem silnější apoptotickou odpověď než 2 mmol/l. (Obr. 6)



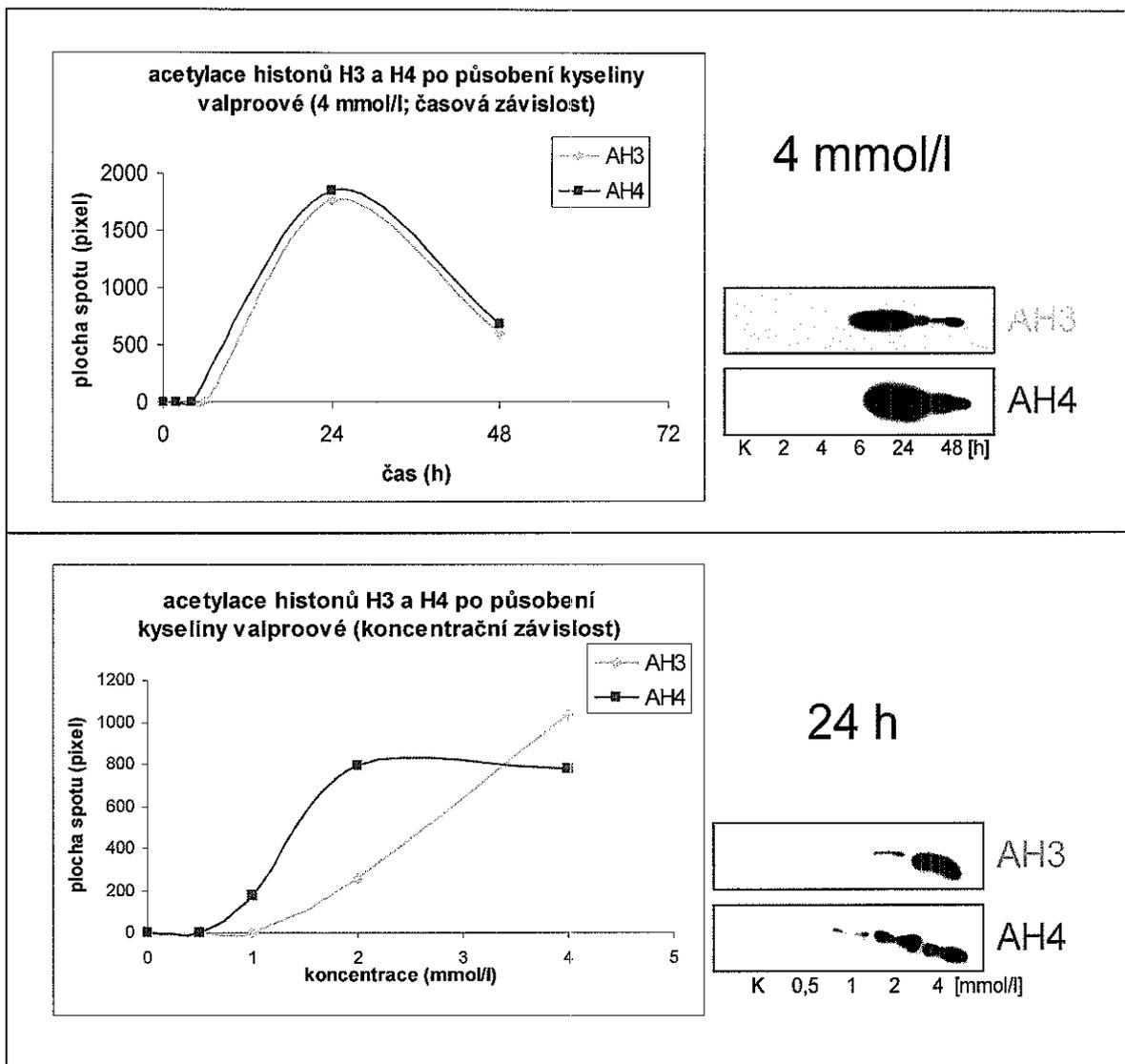
Obr. 6: Vliv kyseliny valproové na viabilitu a proliferaci živých (nebarvících se trypanovou modří) buněk MOLT-4. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. Blot ukazuje štěp jaderné bílkoviny laminu B jakožto průkaz probíhající apoptózy po působení kyseliny valproové o koncentraci 2 a 4 mmol/l 24 hodin po začátku inkubace.

Pomocí flow-cytometrické analýzy jsme stanovili procenta apoptotických buněk po působení různých koncentrací VA. Buňky, které vstupují do apoptózy, vykazují typickou morfologii, kdy dochází ke kondenzaci cytoplazmy, zmenšení buňky, sraštění jádra a později k jeho rozpadu a tvorbě typických apoptotických tělísek. Při flow-cytometrické analýze velikost buněk koreluje s intenzitou světla procházejícím v předozadním směru (forward scatter), zatímco intenzita v pravém úhlu (side scatter) koreluje s tvorbou apoptotických tělísek. Po třídenní inkubaci buněk MOLT-4 se 4 mmol/l VA vstupuje 85 % buněk do apoptózy (oproti 27 % po 2 mmol/l VA) a po šestidenní inkubaci se 4 mmol/l VA je 95 % buněk apoptotických. V případě inkubace s 2 mmol/l pouze 31 %. (Obr. 7)



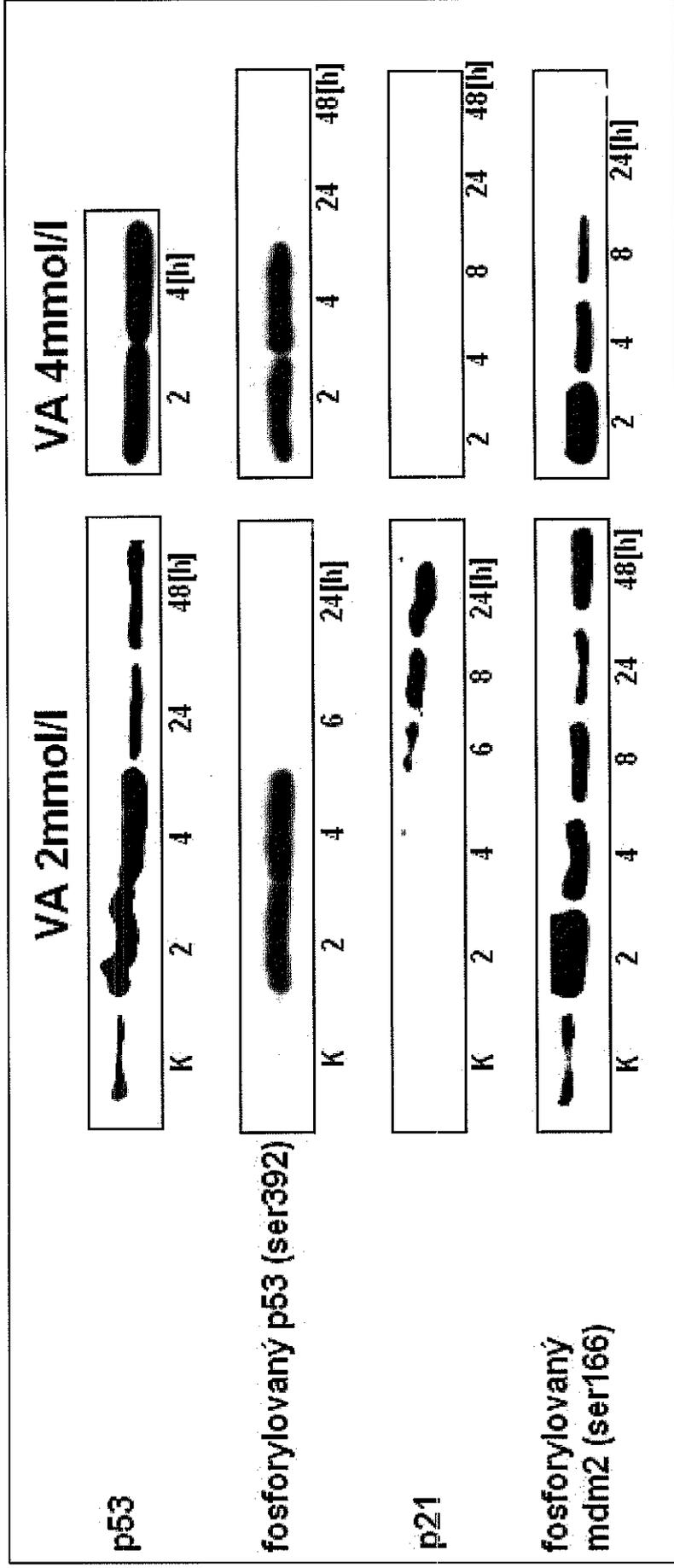
**Obr. 7: Flow-cytometrická analýza MOLT-4 buněk po působení kyseliny valproové v koncentraci 1-4 mmol/l za 3 a 6 dní. Intenzita světelného rozptylu ve forward směru koreluje s velikostí buněk, intenzita v pravém úhlu-side scatter koreluje s jejich granularitou. Procenta apoptotických buněk jsou znázorněna červeně.**

Kyselina valproová, jakožto inhibitor histondeacetylas, vyvolává po 24 hodinové inkubaci v koncentraci 4 mmol/l acetylaci u obou námi sledovaných jaderných histonů H3 (na lysinu 9) a H4 (na lysinu 12). Histon H4 je k působení kyseliny valproové citlivější, k jeho acylaci je dostačující již koncentrace 1 mmol/l. Histon H3 vyžaduje koncentraci vyšší, a to alespoň 2 mmol/l. (Obr.8)



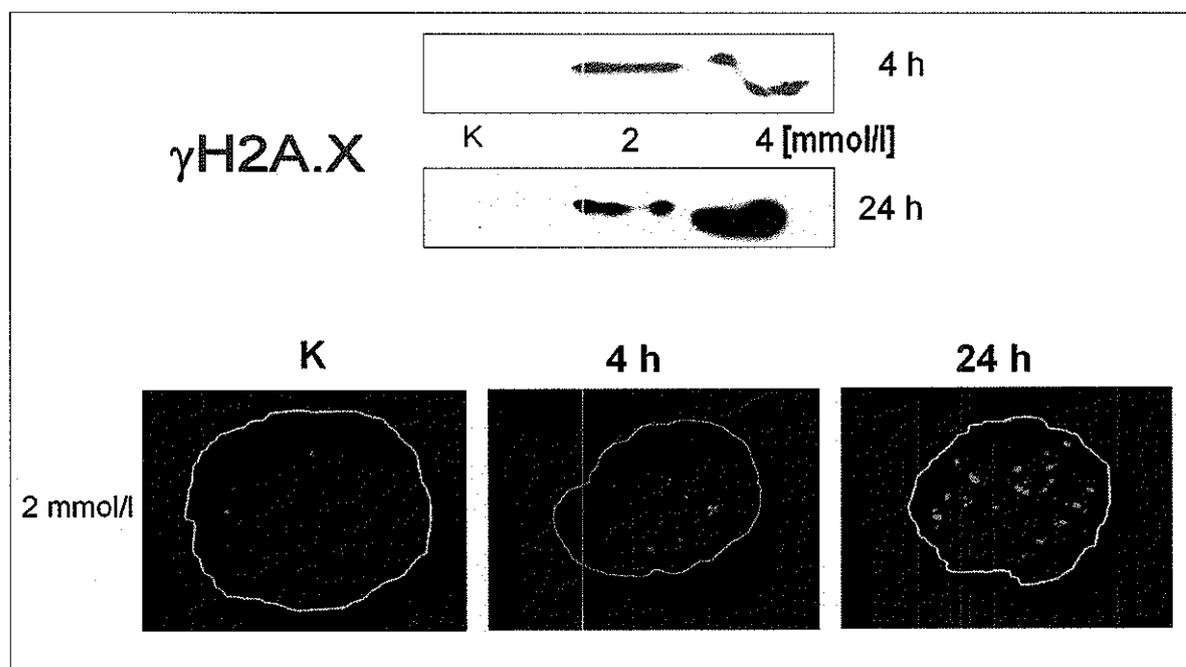
**Obr. 8: Acetylace jaderných histonů H3 (na lysinu 9) a H4 (na lysinu 12). Časová závislost po působení kyseliny valproové o koncentraci 4 mmol/l a koncentrační závislost 24 hodin po začátku působení VA.**

Buňky MOLT-4 mají funkční protein p53, k jehož indukci dochází v časných intervalech (maximální exprese za 2-4 hodiny) po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l. Souběžně dochází k fosforylaci tohoto proteinu na serinu 392. V časové návaznosti na protein p53 dochází k aktivaci proteinu p21, který vyvolává zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, a tím umožňuje reparaci poškození. Tuto aktivaci se nám podařilo zachytit pouze po působení 2 mmol/l kyseliny valproové v intervalu 6-24 hodin, koncentrace vyšší (4 mmol/l) už aktivaci nevyvolává, poškození je pravděpodobně pro buňku příliš rozsáhlé a tak vstupuje přímo do apoptózy bez snahy o reparaci. Souběžně s aktivací proteinu p53 dochází k fosforylaci jeho negativního regulátoru, proteinu mdm2 na serinu 166. (Obr. 9)



Obr. 9: Aktivace a fosforylace proteinů p53, mdm2 a p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l.

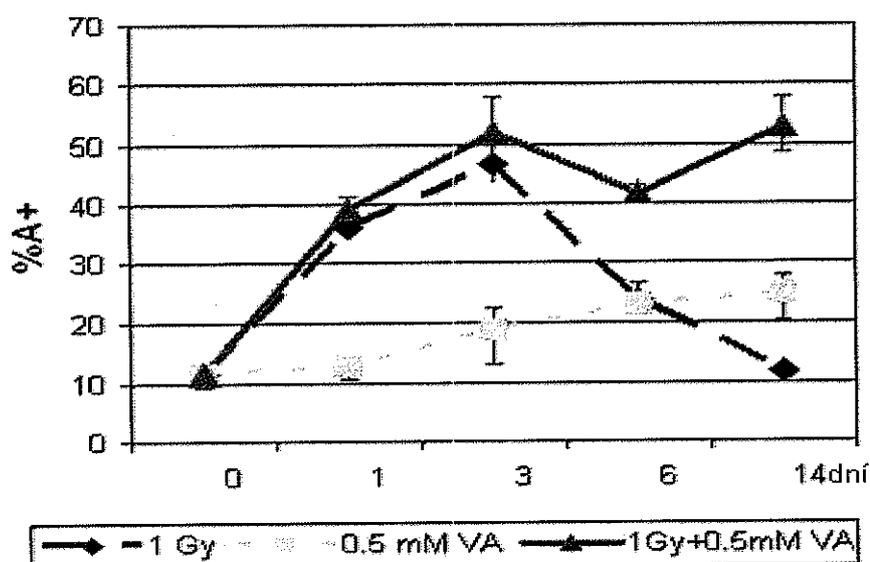
Další z proteinů, jehož fosforylaci jsme sledovali, je histon H2AX. Tato fosforylace probíhá ve vazbě na aktivovanou ATM a ATR v řádu sekund po poškození DNA a slouží jako indikátor poškození pro reparační proteiny. K fosforylaci na serinu 139 dochází po 4-hodinovém působení kyseliny valproové v koncentraci 1 mmol/l a po 24-hodinovém působení koncentrace 2 mmol/l. (Obr. 10)



Obr. 10: Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 po působení kyseliny valproové. Blot představuje koncentrační závislost fosforylace za 4 a 24 hodin po začátku působení noxy. Imunocytochemická analýza ukazuje fosforylaci histonu H2AX za 4 a 24 hodin po působení kyseliny valproové o koncentraci 2 mmol/l.

### 5.1.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

Při kombinaci kyseliny valproové a ionizujícího záření dochází k synergickému účinku obou nox na kulturu buněk MOLT-4. Samotná kyselina valproová o koncentraci 0,5 mmol/l vyvolává pozvolný nástup apoptózy, který ale přetrvává poměrně dlouhou dobu, až 14 dní po začátku kultivace, zatímco samostatné záření o dávce 1 Gy má naopak rychlý nástup i odeznění apoptózy. Při kombinaci obou nox dochází k synergizaci účinku, takže buňky rychle vstupují do apoptózy za současného delšího přetrvání účinku. (Obr. 11)



Obr. 11: Procenta apoptotických buněk (měřeno jako Annexin V pozitivní) po působení kyseliny valproové o koncentraci 0,5 mmol/l samostatně nebo v kombinaci s ionizujícím zářením o dávce 1 Gy.

Buňky MOLT-4 jsme 24 hodin preinkubovali s kyselinou valproovou o koncentraci 2 mmol/l a pak je ozářili dávkou 0,5 a 1 Gy. V intervalech 1, 4 a 24 hodin jsme porovnávali fosforylaci histonu H2AX na serinu 139 po působení samotného záření a kyseliny valproové proti jejich kombinaci. Ionizující záření vyvolává tvorbu ložisek  $\gamma$ H2AX 1 hodinu po ozáření. S postupující reparací DSB dochází k poklesu počtu ložisek a 24 hodin po ozáření dávkou 0,5 i 1 Gy je poškození téměř reparováno. V přítomnosti VA je reparace dvojitých zlomů zřejmě snižena, neboť 24 hodin po ozáření v přítomnosti VA přetrvávají v buňkách velká ložiska  $\gamma$ H2AX.

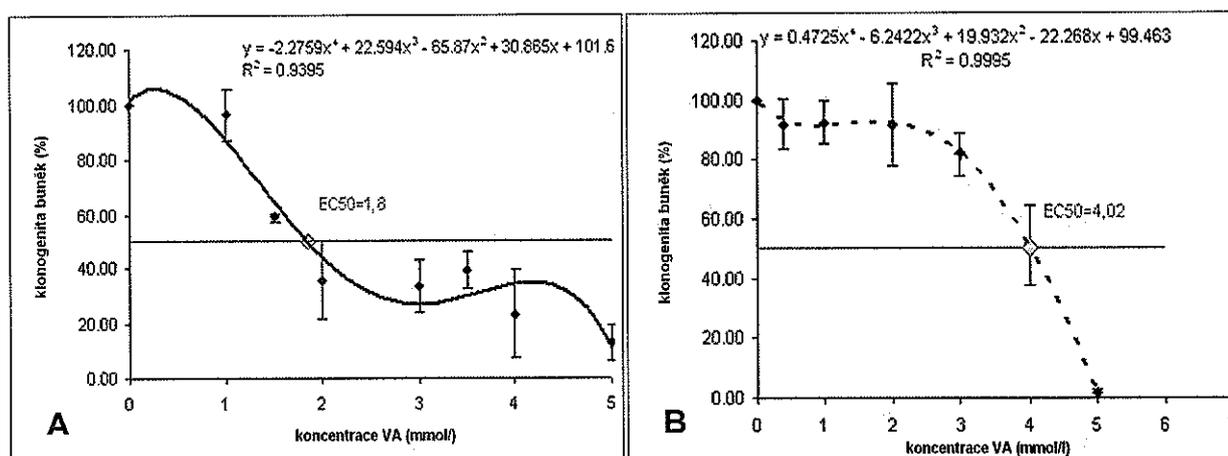
U proteinu p53 dochází k nárůstu exprese 4 hodiny po ozáření jak po kombinaci s dávkou 0,5, tak 1 Gy. Naopak u kombinace po 24 hodinové kultivaci protein p53 téměř není exprimovaný. Maximálnímu nárůstu exprese proteinu p53 odpovídá i jeho fosforylace na serinu 392, která je nejintenzivnější za 4 hodiny po kombinovaném působení kyseliny valproové a ionizujícího záření. V návaznosti na protein p53 dochází k indukci proteinu p21, a to jednak samostatně po působení kyseliny valproové, ale i po kombinovaném účinku, zejména 24 hodin po ozáření dávkou 1 Gy za preinkubace s VA. (Obr. 12)



## 5.2. HL-60

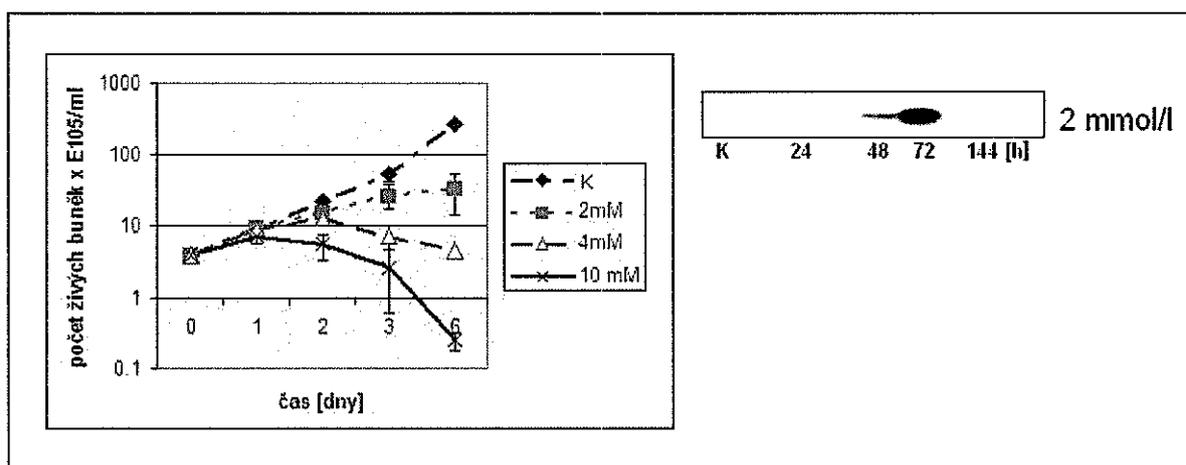
### 5.2.1. KYSELINA VALPROOVÁ

U linie HL-60 jsme nejprve pomocí zkoušky klonogenity stanovili hodnotu  $EC_{50}$ . Buňky jsme 3 dny inkubovali v kultivačním médiu s kyselinou valproovou o různých koncentracích a pak je na 14 dní vysadili na methylcelulózový gel s 30% obsahem fetálního telecího séra. Hodnota  $EC_{50}$  byla po 14 dnech kultivace stanovena na základě zachované klonogenní schopnosti buněk, tzn. počítali jsme kolonie tvořené alespoň 40 buňkami. Hodnotu  $EC_{50}$  při 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou jsme stanovili na 1,8 mmol/l. Pro hodnocení dlouhodobého účinku kyseliny valproové na buňky jsme tyto kultivovali po 14 dní na methylcelulózovém gelu s 30% obsahem fetálního telecího séra a v přítomnosti rostoucích koncentrací kyseliny valproové. Navíc buňky HL-60 je nutné při dlouhodobých pokusech kultivovat v 10% kondiciovaném médiu z lidské linie buněk 5637 karcinomu močového měchýře se čtyřmi jednotkami erythropoetinu na 1 ml média. Působením cytokinů jsou pravděpodobně buňky chráněny před apoptózou a hodnota  $EC_{50}$  po 14-denní inkubaci s kyselinou valproovou paradoxně stoupá oproti  $EC_{50}$  měřené po 3 dnech na 4,02 mmol/l. (Obr. 13)



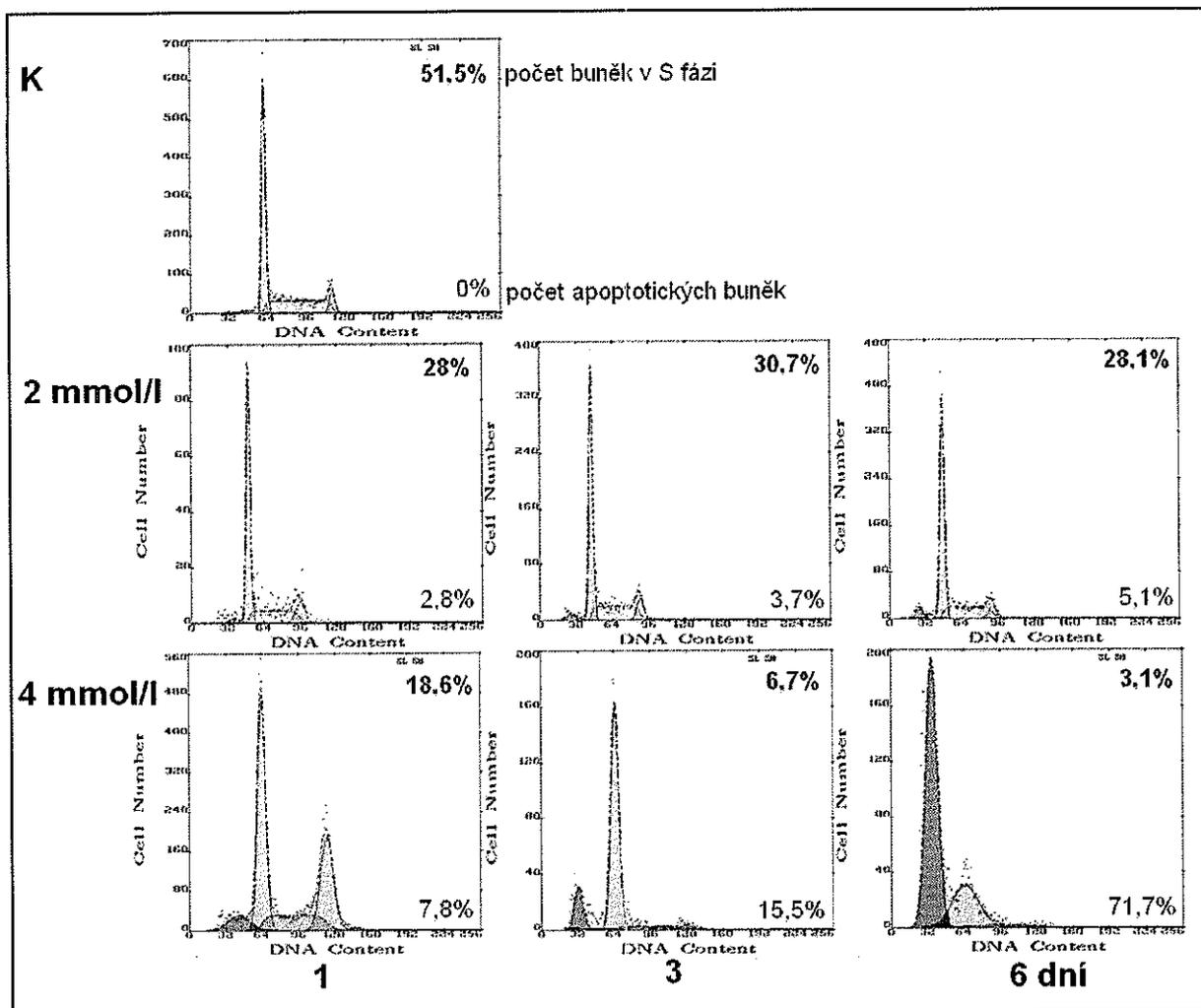
Obr.13: A) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  pomocí zkoušky klonogenity u buněk HL-60 po 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou o různých koncentracích a následné hodnocení zachovaných klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulózovém gelu s různými koncentracemi kyseliny valproové v 10% kondiciovaném médiu. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

Viabilitu a proliferaci buněk jsme hodnotili na základě jejich barvení pomocí trypanové modři. Koncentrace 3 mmol/l vyvolává v kultuře HL-60 inhibici proliferace, pro indukci apoptózy je nutné daleko vyšší koncentrace než v případě buněk MOLT-4, eradikace kultury nastává až po kultivaci s koncentrací 10 mmol/l. Detekovat apoptózu pomocí štěpení laminu B se nám podařilo pouze po působení 2 mmol/l, a to nejdříve za 48 hodin po začátku jejího působení. (Obr.14)



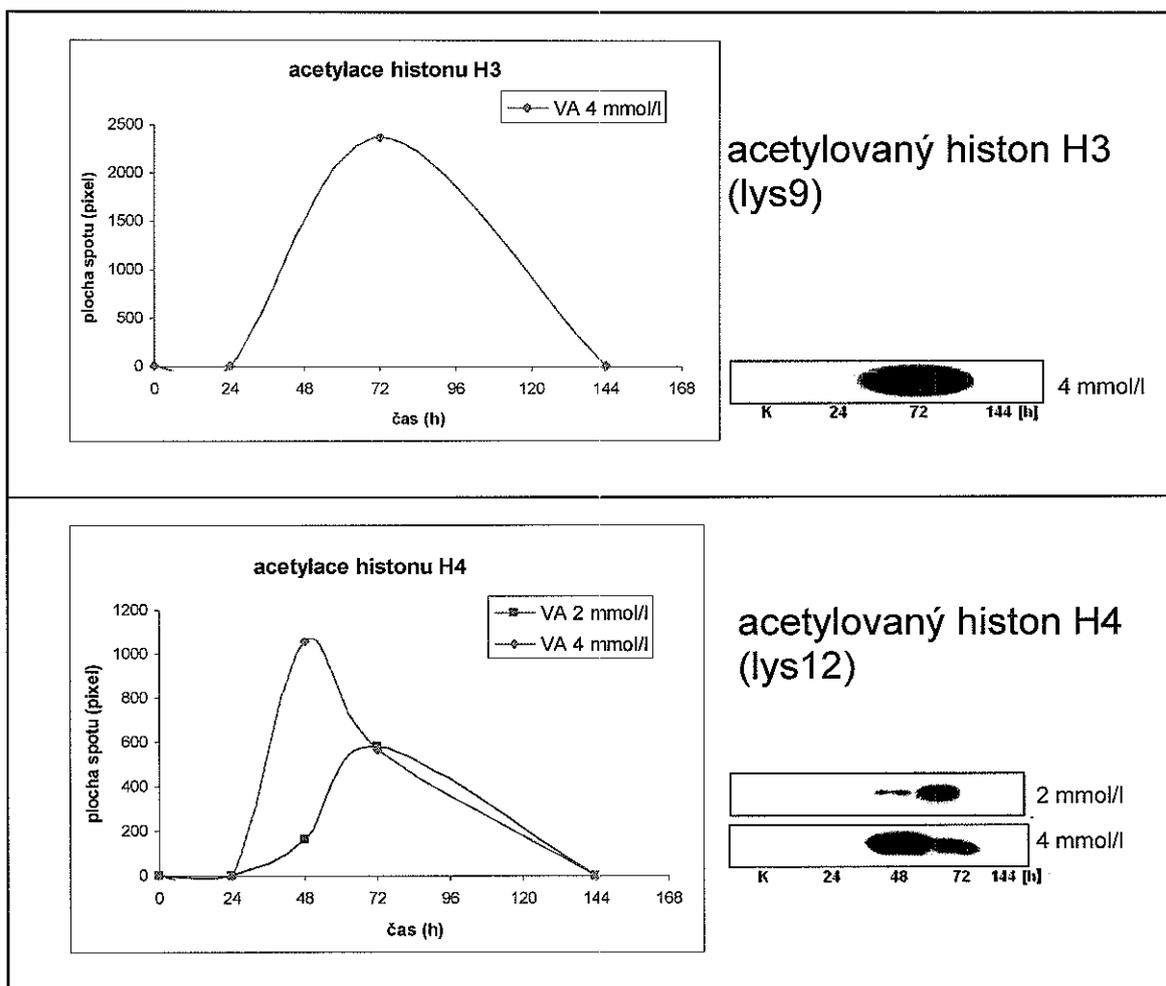
Obr. 14: Vliv kyseliny valproové na viabilitu a proliferaci živých (nebarvicích se trypanovou modří) buněk HL-60. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. Blot ukazuje štěp jaderné bílkoviny laminu B jakožto průkaz probíhající apoptózy po působení kyseliny valproové o koncentraci 2 mmol/l 24 hodin po začátku inkubace.

Při flow-cytometrické analýze jsme sledovali procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Během časných fází apoptózy dochází k aktivaci endonukleas a štěpení DNA na fragmenty o nízké molekulové hmotnosti, které opouští jádro. To se na flow-cytometrickém záznamu projeví jako vrchol sub-G1 a zároveň dochází k redukci celkového množství DNA. Procenta apoptotických buněk po působení různých koncentrací kyseliny valproové v závislosti na čase jsou vyznačena červeně. Patrný je pokles počtu buněk v S fázi, který je vyvolaný zástavou buněčného cyklu v G1 fázi. (Obr. 15)



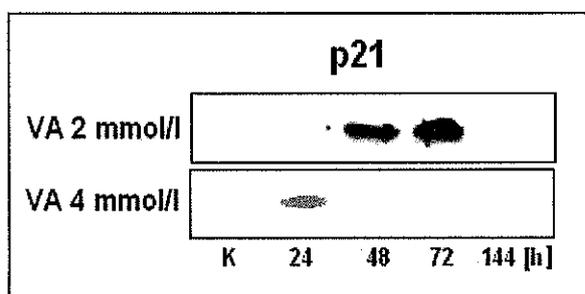
Obr. 15: Flow-cytometrická analýza buněčného cyklu u linie HL-60 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 1-6 dní. Procenta apoptotických buněk určena na základě sub-G1 peaku a označena červeně, procenta buněk v S fázi označena zeleně.

Za 72 hodin po začátku inkubace s kyselinou valproovou (4 mmol/l) dochází k acylaci jaderného histonu H3 na lysinu 9. Histon H4 je stejně jako v případě buněk MOLT-4 k acylaci citlivější, na lysinu 12 k ní dochází již za 48 hodin po začátku inkubace s kyselinou valproovou o koncentraci 2 mmol/l. (Obr. 16)



Obr. 16: Acetylace jaderných histonů H3 (lys 9) a H4 (lys 12) u buněk HL-60 po působení kyseliny valproové o koncentraci 2 a 4 mmol/l v časovém intervalu 1-6 dní.

I když buňky HL-60 jsou p53 negativní, dochází u nich k indukci proteinu p21. Tato indukce je p53 nezávislá a u buněk HL-60 probíhá po působení jak 2 mmol/l, tak 4 mmol/l koncentrace kyseliny valproové a obecně v pozdějších časových intervalech v porovnání s buňkami MOLT-4. (Obr. 17)



Obr. 17: Indukce proteinu p21 u buněk HL-60 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l (časová závislost).

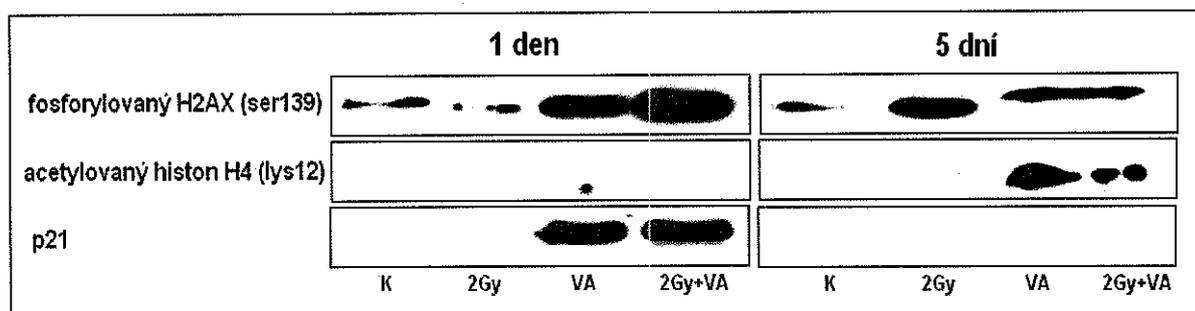
### 5.2.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

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

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

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

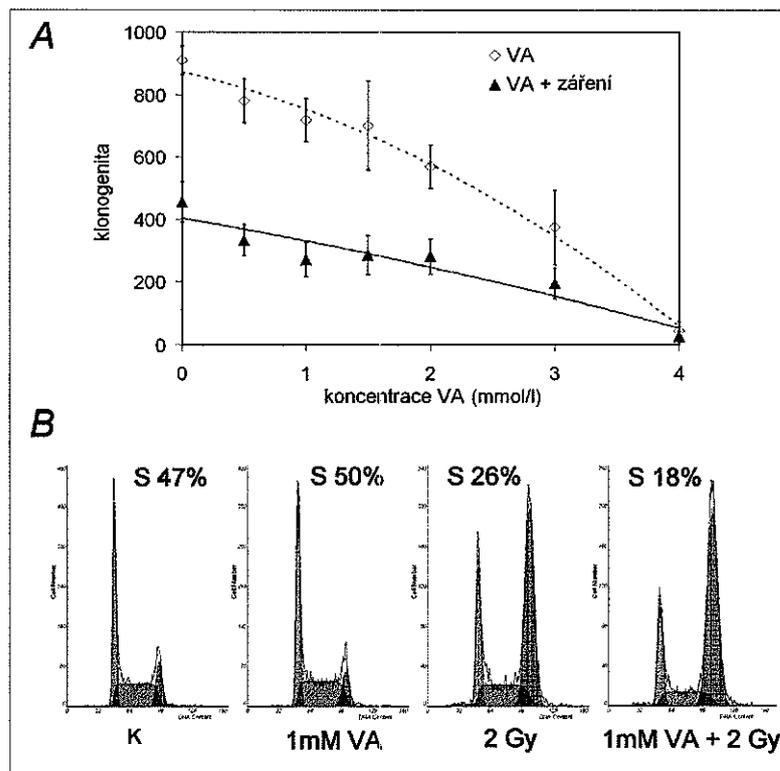
Indukce proteinu p21 u buněk HL-60 je p53 nezávislá a je patrná za 24 hodin ve stejné míře po samotné kyselině valproové jako po kombinaci s ionizujícím zářením. Po 5-denní inkubaci s VA jsme již expresi proteinu p21 nezaznamenali. (Obr. 18)



Obr. 18: Změny v expresi proteinů H2AX, histonu H4 a p21 1 a 5 dní po působení samotné kyseliny valproové v koncentraci 3 mmol/l, po působení ionizujícího záření o dávce 2 Gy a pod vlivem kombinace obou nox.

Buňky jsme 24 hodin kultivovali s kyselinou valproovou o různých koncentracích, ozářili dávkou 2 Gy a provedli zkoušku klonogenity. Samotné záření snižuje klonogenní přežití buněk na 50 %. Pokud byly buňky inkubovány s VA 24 hodin před ozářením dávkou 2 Gy, hodnota  $EC_{70}$  klesla na 1,4 mmol/l oproti 3,4 mmol/l po působení samotné VA (Obr. 19A). Kyselina valproová v koncentraci 1 mmol/l nepůsobí významné změny v zastoupení buněk v různých fázích buněčného cyklu. 24 hodin po ozáření dávkou 2 Gy dochází k akumulaci buněk v G2/M fázi (56 %) a

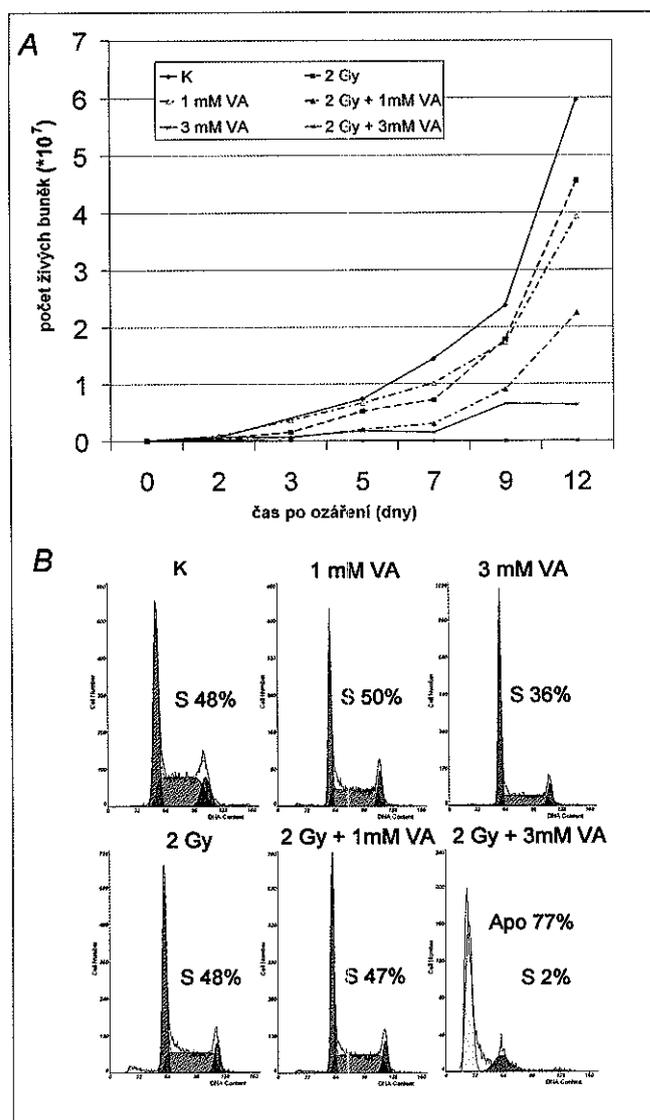
poklesu počtu buněk v S fázi (26 %). Pokud jsme buňky na 24 hodin preinkubovali s kyselinou valproovou v koncentraci 1 mmol/l a ozářili dávkou 2 Gy, tak nedošlo k překonání G2/M bloku (65 %), ale pokles počtu buněk v S fázi byl výraznější, v porovnání s pouze ozářenými buňkami. (Obr. 19B)



Obr. 19: A) porovnání schopnosti tvořit kolonie u buněk HL-60 pouze inkubovaných s kyselinou valproovou proti buňkám 24 hodin preinkubovaným s VA a potom ozářeným dávkou 2 Gy. Hodnota EC70 klesá z 3,4 mmol/l na 1,4 mmol/l. Samotné ozáření snižuje klonogenní přežití na 50 %. B) Flow-cytometrická analýza obsahu DNA u buněk HL-60 24 hodin po ozáření s nebo bez 24 hodinové preinkubace s 1 mmol/l VA. Procenta představují počet buněk v S fázi buněčného cyklu.

Inkubace buněk s kyselinou valproovou o koncentraci 1 mmol/l vedla po 12 dnech k poklesu životnosti buněk na 65 %, v případě koncentrace 3 mmol/l až na 10 % oproti kontrole. Ozáření buněk dávkou 2 Gy pak vede k poklesu životnosti buněk na 76 % za stejný časový interval. Pokud záření a kyselinou valproovou aplikujeme zároveň, dochází ke kumulaci účinku, v případě kombinace VA 1 mmol/l a záření 2 Gy počet živých buněk klesá na 37 % kontroly, v případě kombinace VA 3 mmol/l a záření 2 Gy, živé buňky jsou téměř eradikovány (Obr. 20A). Za 12 dní po ozáření buňky překonaly blok v G2/M fázi a prochází normálním buněčným cyklem. Kyselina valproová v koncentraci 1 mmol/l výrazně neovlivňuje buněčný cyklus, zatímco v koncentraci 3 mmol/l způsobuje výrazný pokles buněk v S fázi, což odpovídá snížené proliferaci. Stejně tak po kombinaci záření 2 Gy a kyseliny valproové

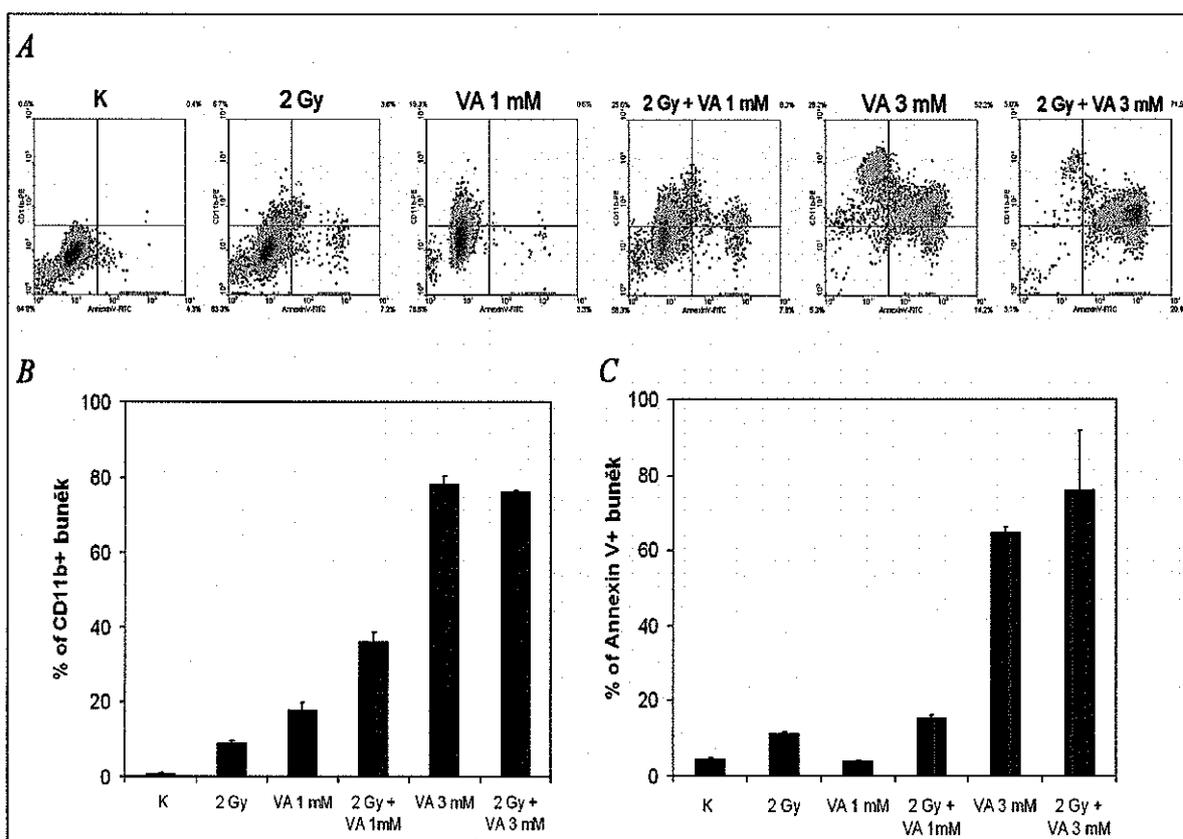
v koncentraci 1 mmol/l nemělo přílišný vliv na indukci apoptózy, zatímco kombinace 3 mmol/l a 2 Gy ji vyvolávala ve většině buněk. (Obr. 20B)



Obr. 20: A) Porovnání proliferačních schopností buněk HL-60 po 12 dnech kultivace s kyselinou valproovou v koncentraci 1 a 3 mmol/l samostatně proti záření o dávce 2 Gy a buněk ozářených a následně kultivovaných s uvedenými koncentracemi VA. B) Změny zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu 12 dní po kultivaci s kyselinou valproovou (1 a 3 mmol/l) samostatně a po ozáření dávkou 2 Gy a po kombinaci obou nox. Procenta označují počet buněk v S fázi buněčného cyklu.

Kyselina valproová v koncentraci 1 mmol/l vede k diferenciaci a zvýšené expresi CD11b (u 17,8 % buněk) bez indukce apoptózy, zatímco koncentrace 3 mmol/l zvyšuje procento CD11b pozitivních buněk na 78,3 a apoptóza je indukována u 65 % buněk. Tři dny po ozáření dávkou 2 Gy jsme pozorovali mírný nárůst CD11b pozitivních buněk (na 9 %) a stejně tak indukci apoptózy (11,3 % buněk). Nižší koncentrace kyseliny valproové v kombinaci s ionizujícím zářením vyvolávají především nárůst

diferenciace, tedy CD11b pozitivita (36,3 %), účinek na indukci apoptózy byl pouze aditivní (15,4 %). Účinek vyšší koncentrace VA spolu se zářením byl odlišný. Diferenciace byla porovnatelná s účinkem samotné kyseliny valproové, zatímco procento apoptotických buněk stoupl na 76,2. Flow-cytometrický záznam ukazuje, že dobře diferencované, CD11b pozitivní buňky, jsou živé, bez positivity na annexin V. Jakmile jsou buňky annexin V pozitivní, exprese CD11b klesá, dokud nedojde ke kompletní ztrátě tohoto diferenciačního markeru. (Obr. 21)

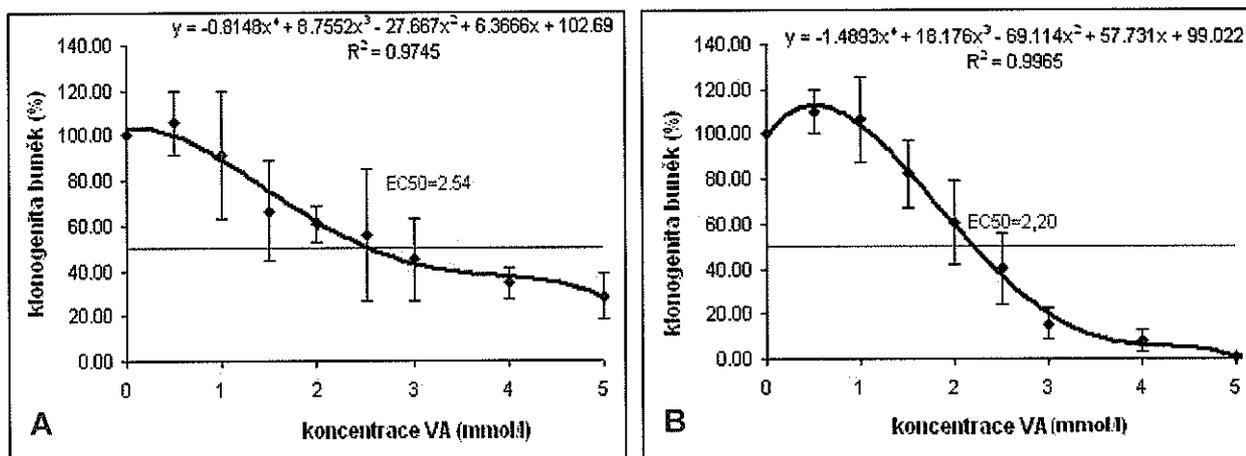


Obr. 21: Flow-cytometrická analýza změn v expresi antigenu CD11b a annexinu V u buněk HL-60, 3 dny po ozáření dávkou 2 Gy a inkubaci s kyselinou valproovou o koncentraci 1 a 3 mmol/l.

### 5.3. U-937

#### 5.3.1. KYSELINA VALPROOVÁ

U linie U-937 jsme pomocí zkoušky klonogenity stanovili hodnotu  $EC_{50}$ . Buňky jsme 3 dny inkubovali v kultivačním médiu s kyselinou valproovou o různých koncentracích a pak je na 14 dní vysadili na methylcelulózový gel s 30% obsahem fetálního telecího séra. Hodnota  $EC_{50}$  byla po 14 dnech kultivace stanovena na základě zachované klonogenní schopnosti buněk, tzn. byly počítány kolonie tvořené alespoň 40 buňkami a byla stanovena jako 2,54 mmol/l. Pro hodnocení dlouhodobého účinku kyseliny valproové jsme buňky kultivovali 14 dní na methylcelulóze s rostoucími koncentracemi kyseliny valproové. Hodnota  $EC_{50}$  byla stanovena na 2,2 mmol/l pro 14-denní inkubaci. (Obr. 22)

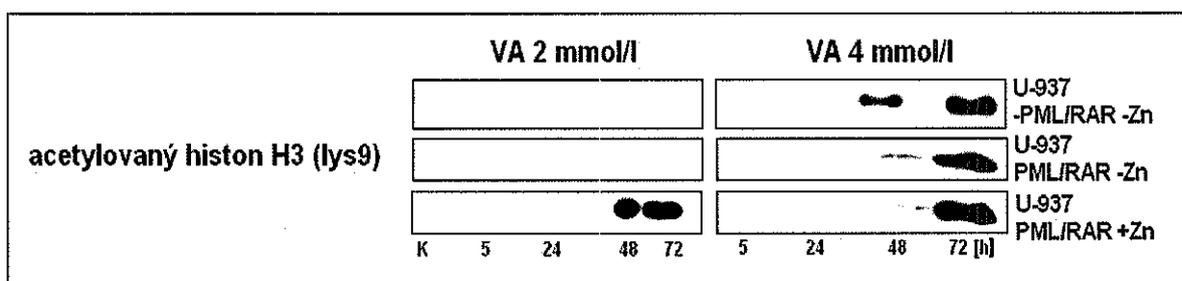


Obr.22: A) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  pomocí zkoušky klonogenity u buněk U-937 po 3-denní preinkubaci s kyselinou valproovou o různých koncentracích a následné hodnocení zachovaných klonogenních schopností buněk 14 dní po výsevu na methylcelulózu. B) Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  na základě zachovaných klonogenních schopností po 14-denní inkubaci buněk na methylcelulózovém gelu s různými koncentracemi kyseliny valproové. Počítány kolonie o alespoň 40 buňkách, pokus proveden dvakrát v duplikátu (celkem 4 měření).

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

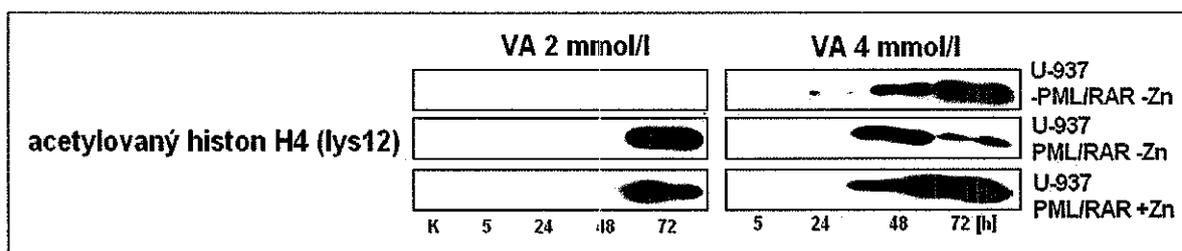
1. kontrolní buňky U-937 bulk transfekované prázdným vektorem bez vloženého genu PML/RAR,
2. buňky U-937 s vloženým genem PML/RAR, ale kultivované bez přítomnosti  $Zn^{2+}$ , který je nezbytný pro expresi genu,
3. buňky U-937 s vloženým genem PML/RAR kultivované v přítomnosti  $Zn^{2+}$ .

U všech tří variant dochází k acetylaci jaderného histonu H3 a to nejdříve po 8 hodinách působení VA o koncentraci 4 mmol/l. Pouze u buněk s vloženým PML/RAR genem a kultivovaných v prostředí  $Zn^{2+}$  dochází k acetylaci již při koncentraci 2 mmol/l (Obr. 23)



Obr. 23: Acetylace jaderného histonu H3 na lysinu 9 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$ ) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí  $Zn^{2+}$ ).

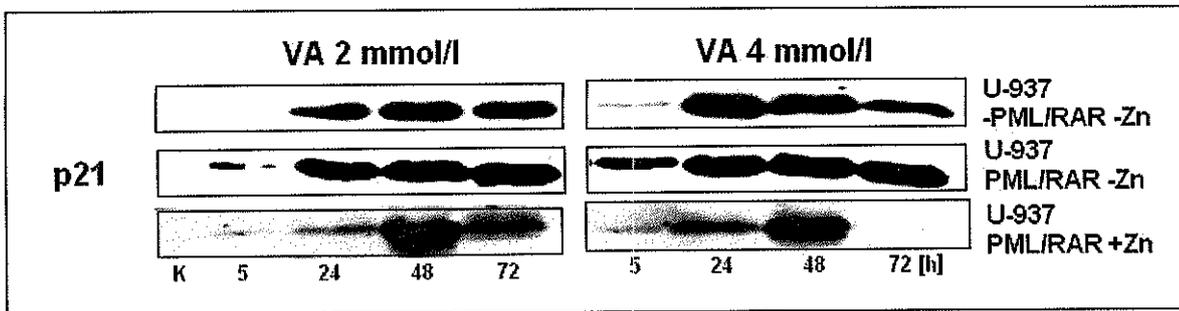
Histon H4 je opět citlivější k působení kyseliny valproové, k jeho acetylaci dochází již po působení 2 mmol/l kyseliny valproové a to po 72 hodinách (s výjimkou buněk U-937 bez vloženého genu PML/RAR). (Obr. 24)



Obr. 24: Acetylace jaderného histonu H4 na lysinu po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$ ) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí  $Zn^{2+}$ ).

Buňky U-937 jsou stejně jako buňky HL-60 p53 negativní, proto u nich dochází k expresi proteinu p21 způsobem p53 nezávislým, a to velmi výrazně již

5 hodin po začátku inkubace s 2 i 4 mmol/l kyselinou valproovou, opět vyjma buněk U-937 bez vloženého genu PML/RAR. (Obr.25)



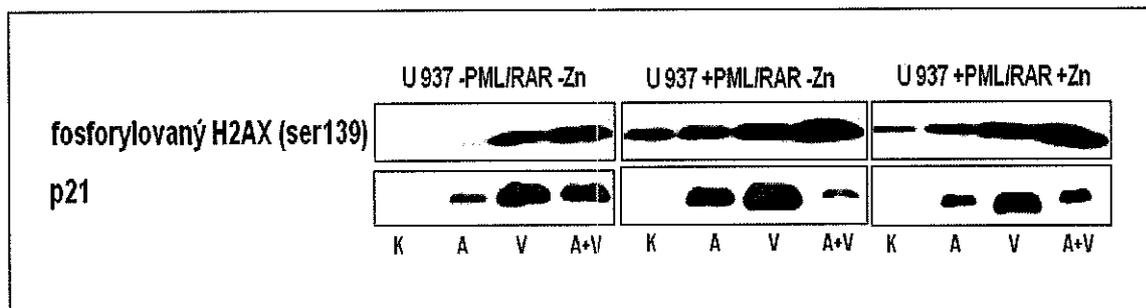
Obr. 25: Aktivace proteinu p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 a 4 mmol/l v intervalu 5-72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$ ) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí  $Zn^{2+}$ ).

### 5.3.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI S KYSELINOU ALL-TRANS RETINOVOU

U buněk U-937 jsme kombinovali účinek kyseliny valproové v koncentraci 2 mmol/l s diferenciačním agens kyselinou *all-trans*-retinovou v koncentraci 1  $\mu$ mol/l.

V případě histonu H2AX dochází 72 hodin po začátku kultivace k výraznému zesílení fosforylace na serinu 139 při použití kombinace obou kyselin oproti působení jednotlivých nox samostatně.

Překvapivě, k aktivaci proteinu p21 dochází po působení této kombinace méně nežli po působení samotné kyseliny valproové. (Obr. 26)



Obr. 26: Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 a aktivace proteinu p21 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 mmol/l samostatně nebo v kombinaci s kyselinou *all-trans*-retinovou v koncentraci 1  $\mu$ mol/l v intervalu 72 hodin u linií neexprimujících fúzní gen PML/RAR (U-937 bez vloženého genu PML/RAR, s vloženým genem PML/RAR, ale v nepřítomnosti  $Zn^{2+}$ ) a u linie exprimující tento gen (U-937 s vloženým genem v prostředí  $Zn^{2+}$ ).

## 6. DISKUZE

### 6.1. KYSELINA VALPROOVÁ

Podle chemické struktury patří kyselina valproová do skupiny karboxylových kyselin s krátkým řetězcem (SCFAs), stejně tak jako butyrát, fenylbutyrát a fenylacetát. Mezi ostatními inhibitory histondeacetylasy, právě SCFAs vykazují nejnižší účinnost, s hodnotami  $IC_{50}$  řádově v milimolech (Qiang et al, 2004). Námi určená hodnota  $EC_{50}$  pro VA se u všech tří leukemických linií (MOLT-4, HL-60, U-937) pohybovala kolem 2 mmol/l po 3- i 14-denní inkubaci s kyselinou valproovou. Výjimkou byla pouze 14-denní inkubace buněk MOLT-4, kde hodnota klesla na pouhé 0,6 mmol/l, naopak po 14-denní inkubaci buněk HL-60 hodnota paradoxně stoupá na 4,02 mmol/l. Předpokládá se, že buňky HL-60 při 14-denní inkubaci s VA vyžadují pro tvorbu kolonií médium s cytokiny (IL-3, SCF, G-SCF), které mají antiapoptotický efekt (Řezáčová et al, 2006). Z literatury vyplývá, že u HeLa buněk byla hodnota  $IC_{50}$  stanovena na 0,4 mmol/l (Phiel et al, 2001), u buněk lidského neuroblastomu 0,5 mmol/l a gliomu 1,0 mmol/l (Blaheta et Cinatl, 2002). Rozmezí plazmatických koncentrací, které se používají při léčbě epilepsie se pohybuje od 0,35 do 0,7 mmol/l (Phiel et al, 2001). Proto terapeutické hodnoty VA dosahované u epileptických pacientů jsou dostačující pro vyvolání protinádorové aktivity. Některé linie (MV4-11, KOCL-44) byly dokonce kompletně eradikovány po terapeutických dávkách VA (Kawagoe et al, 2002).

Kyselina valproová vyvolává diferenciaci mnoha buněčných linií, zejména neuroektodermálního a leukemického původu, inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu kultivovaných nádorových buněk (Kostrouchová et al, 2007).

Diferenciace buněk, identifikovaná nárůstem exprese markeru CD11b, je úzce spjatá s expresí proteinu p21 (viz dále). Buňky U937 bez funkčního proteinu p21 neexprimují diferenciační marker CD11b (Blaheta et al, 2005). V naší práci jsme prokázali, že u buněk HL-60 dochází 24 hodin po začátku působení 2 mmol/l VA k masivní aktivaci proteinu p21, která přetrvává do 72. hodiny. Na konci tohoto intervalu téměř všechny buňky exprimují CD11b (Řezáčová et al, 2006). Naopak po vyšší koncentraci VA (4 mmol/l) už je exprese p21 výrazně menší a pouze 24 hodin po začátku kultivace, za 72 hodin již není patrná a buňky podléhají apoptóze (Řezáčová et al, 2006).

vá et al, 2008). Je tedy zřejmé, že u buněk HL-60 je exprese proteinu p21 je spojena se zástavou růstu a diferenciací buněk, nikoliv s indukcí apoptózy.

U některých nádorových linií pozorujeme po působení VA typické znaky probíhající apoptózy: kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA, externalizaci fosfatidylserinu (PS), uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následnou aktivaci kaspas 9 a 3. VA vyvolává apoptózu jak na kaspasách závislou, tak nezávislou cestou. Přesný mechanismus na kaspasách nezávislé apoptotické smrti není jasný, ale pravděpodobně je spojena s mitochondriálním, apoptózu indukujícím faktorem – AIF (Kawagoe et al, 2002). Další rozhodující událostí je stimulace proapoptotických faktorů jako je TRAIL, receptory smrti 5 (DR5), Fas ligand a Fas a dowregulace antiapoptotických faktorů, ovšem tyto účinky nebyly pozorovány u preleukemických nebo zdravých buněk (Kuendgen et Gattermann, 2007). Jedním z hlavních antiapoptotických faktorů, modulovaných inhibitory HDAC, je pravděpodobně survivin (Facchetti et al, 2004). Prokázali jsme, že u buněk HL-60 dochází nejprve k jejich diferenciaci (vzestup CD11b), zástavě růstu a poklesu počtu buněk v S fázi. Apoptóza je indukována až po vyšších dávkách VA (Řezáčová et al, 2006). V kultuře MOLT-4 jsou po třídenní inkubaci se 4 mmol/l kyselinou valproovou téměř všechny buňky apoptotické.

Primárním účinkem kyseliny valproové na molekulární úrovni je acetylace jaderných histonů H3 a H4 (Göttlicher et al, 2001). Také v naší práci s leukemickými buňkami jsme prokázali tuto acetylaci u všech sledovaných linií, ale nikdy ne v intervalu kratším než 24 hodin. Histon H4 je vůči působení kyseliny valproové citlivější než H3, k jeho acetylaci je třeba nižší koncentrace i kratší inkubační doba. I když existují rozdíly mezi liniemi, v každém případě je pro hyperacetylaci histonů nutná kontinuální expozice kyselině valproové, např. u lidských gliomových linií SF539 a U251 tento stav přetrvává pouze 3 hodiny po odmytí VA. (Camphausen et al, 2005)

Acetylaci histonů předcházela aktivace nehistonových částic jako jsou proteiny p53 a p21, proto se naskytá otázka, do jaké míry je anti-tumorozní účinek VA založený na přímé inhibici histondeacetylasy a do jaké je dán modifikací jiných cílových molekul, kterých je do současné doby známo víc než 50 (Dokmanovic et al, 2007)

Zvýšenou hladinu proteinu p53 a jeho fosforylaci na serinu 392 u buněk MOLT-4 (jediná linie s p53 wild typem) jsme detekovali již za 2 a 4 hodiny po začátku

inkubace s VA, avšak za 24 hodin, tzn. ještě před acetylací histonů, již tyto změny nebyly patrné. Výsledky byly shodné pro obě studované koncentrace VA (2 i 4 mmol/l). Fosforylace proteinu p53 na serinu 392 probíhá pomocí kaseinkinasy II, tato fosforylace aktivuje protein p53 jako transkripční faktor a umožňuje jeho sekvencně specifickou vazbu (Sakaguchi et al, 1998). Naproti tomu fosforylace na serinu 15 a 37 pomocí DNA-PK, ATM a ATR (Lakin et Jackson, 1999) zabraňují navázání negativního regulátoru proteinu mdm2, který řadíme mezi E3 ubikvitin ligasy. Protein mdm2 jednak katalyzuje vazbu ubikvitinu na protein p53 a tím indukuje jeho degradaci v proteasomu, ale také funguje jako represor p53 zprostředkované transkripce, minimálně podporou exportu p53 z jádra (Brooks et al, 2007).

Ve stejném časovém intervalu jako fosforylace p53 probíhá u buněk MOLT-4 fosforylace mdm2 na serinu 166 (Zášková et al, 2006). Tu katalyzuje Akt kinasa a tím umožňuje vstup mdm2 do jádra (Meek et Knippschild, 2003).

Protein mdm2 navíc může vytvářet komplexy s HDAC1 a tak kontrolovat acetylaci p53 (Ito et al, 2002). Ta probíhá na lysinech 373 a 382 pomocí acetyltransferasy p300 a zvyšuje proteinovou stabilitu, protože acetylované lysinové zbytky se kryjí s vazebnými místy pro mdm2 a ubikvitinylaci (Zhao et al, 2006). Kromě HDAC1 deacetyluje p53 i třída III HDAC a SIRT1, a tak snižují schopnost proteinu p53 transkripčně aktivovat inhibitor buněčného cyklu p21 (Glozak et al, 2005).

V různých nádorových buňkách, i bez funkčního proteinu p53, dochází při působení HDACi k nárůstu proteinu p21 (Richon et al, 2000; Gui et al, 2004; Fortunati et al, 2004). U buněk MOLT-4 jsme po inkubaci s 2 mmol/l VA pozorovali expresi proteinu p21, a to již 6 hodin po začátku kultivace. Nárůst p21 dosahoval maxima po 24 hodinách inkubace, za 48 hodin již nebyl patrný. Expresi proteinu p21 po 4 mmol/l VA se nám nepodařilo detekovat, důvodem je pravděpodobně senzitivita MOLT-4 buněk, kdy poškození jsou již příliš rozsáhlá a buňka vstupuje přímo do apoptózy bez zástavy buněčného cyklu a snahy o reparaci.

U linie HL-60 probíhá exprese proteinu p21 nezávisle na proteinu p53 po působení kyseliny valproové v koncentraci 2 i 4 mmol/l, ale v porovnání s linií MOLT-4 až v pozdějším časovém intervalu. Poprvé se objevuje 24 hodin po začátku inkubace, a v případě koncentrace 2 mmol/l přetrvává až 72 hodin (což koreluje s maximální expresí diferenciačního markeru CD11b), zatímco po 4 mmol/l přetrvává pouze 24 hodin.

U linie U-937 v případě exprese proteinu p21 nacházíme rozdíly, kdy linie ne-exprimující gen PML/RAR aktivují tento protein v intervalu 24-72 hodin po začátku působení 2 mmol/l VA. Po působení koncentrace 4 mmol/l je tato aktivace rychlejší, nastává již 5 hodin po začátku působení a přetrvává stejnou dobu. Jiná situace je v případě linie U-937 s vloženým genem PML/RAR a kultivovaná v přítomnosti  $Zn^{2+}$ , tedy exprimující fúzní onkoprotein PML/RAR. Zde dochází k masivní aktivaci proteinu p21 za 48 hodin po začátku kultivace s kyselinou valproovou a přetrvává u silnější 4 mmol/l koncentrace pouze v tomto intervalu, u slabší 2 mmol/l pak mizí až po 72 hodinách.

Význam p21 spočívá v regulaci zástavy buněčného cyklu v G1 fázi. Blok buněk v G1 fázi je spojen s poklesem procenta buněk v S fázi, inhibicí proliferace a cytostatickým účinkem VA. Aktivace proteinu p21 může probíhat různými mechanismy. Po působení inhibitorů histondeacetylasy je to především p53 nezávislá exprese přes Sp1-vazebné místo na p21 promotoru. Navíc acetylované histony H3 a H4 těsně naléhají k promotoru p21 a tak indukují zvýšenou p21 expresi (Zhao et al, 2006).

Při proteomové studii jsme prokázali, že kyselina valproová mění expresi 22 proteinů, z toho u 15 dochází k downregulaci, a ty úspěšně identifikované jsou spojeny s mikrotubulárním systémem a hnRNP rodinou (Vávrová et al, 2007). Apoptóza a vyzrávání představují alternativní buněčné osudy a narušení normální diferenciace předurčuje buňky k apoptóze.

## **6.2. KYSELINA VALPROOVÁ V KOMBINACI**

Bez ohledu na dávkovací schéma, kombinace kyseliny valproové a ionizujícího záření signifikantně snižuje klonogenní přežití leukemických buněk.

Pokus s kombinovaným účinkem kyseliny valproové a ionizujícího záření jsme prováděli ve dvou opačných schématech: v prvním jsme buňky preinkubovali s VA, pak ozářili  $\gamma$ -zářením o různých dávkách a sledovali změny hodnoty  $D_0$  (dávka záření, kterou přežije 37 % buněk). Třídenní preinkubace buněk MOLT-4 s 2 mmol/l VA vedla k poklesu hodnoty  $D_0$  z 0,7 na 0,2 Gy.

Ve druhém schématu jsme buňky nejprve ozářili dávkou 1 Gy a pak je 14 dní kultivovali s VA o různých koncentracích a sledovali pokles hodnoty  $EC_{70}$  (koncentra-

ce VA, kterou přežije 30 % buněk). Během této kontinuální kultivace s VA po ozáření dávkou 1 Gy se hodnota  $EC_{70}$  snížila z 0,97 mmol/l na 0,38 mmol/l.

Poslední částí pokusu bylo sledování vlivu kombinovaného účinku na indukci apoptózy. Pokud jsme buňky po ozáření dávkou 1 Gy kultivovali v médiu s 0,5 mmol/l VA po dobu 14 dní, tak indukce apoptózy byla zřetelně zvýšená v porovnání s pouze ozářenými buňkami, kde 14 dní po ozáření dávkou 1 Gy byla kultura zcela ozdravena a detekovali jsme pouze živé buňky, zatímco v kombinaci bylo téměř polovina buněk apoptotických.

Buňky HL-60 bez funkčního proteinu p53 již za 24 hodin reagují na ionizující záření dlouhým blokem v G2 fázi buněčného cyklu. Zástava buněčného cyklu jim poskytuje čas pro reparaci poškození vyvolaného ozářením. Tím se buňky HL-60 stávají rezistentnějšími než buňky MOLT-4, které jsou p53 pozitivní a po ozáření se akumulují především v S fázi. Při preinkubaci buněk HL-60 s 1 mmol/l VA nedochází k ovlivnění G2 bloku, ale je významně sníženo zastoupení buněk v S fázi.

Buňky HL-60 jsme nejprve inkubovali s VA o různých koncentracích, za 24 hodin ozářili a sledovali změny hodnoty  $EC_{70}$ . 24-hodinová preinkubace buněk HL-60 s VA před ozářením dávkou 2 Gy vedla k poklesu  $EC_{70}$  z 3,4 na 1,4 mmol/l.

V opačném schématu jsme nejprve buňky ozářili a pak dlouhodobě kultivovali s VA. U buněk HL-60 jsme prokázali synergický efekt VA při dlouhodobé inkubaci po ozáření dávkou 2 Gy. Během kontinuální kultivace (14 dní) s VA po ozáření byly i relativně malé koncentrace VA efektivní v navození apoptózy.

Inkubace buněk s 1 mmol/l VA ihned po ozáření 2 Gy vede k rychlejší diferenciaci buněk (vzestup CD11b) a během 12 dnů dochází k zástavě růstu a poklesu proliferčních schopností buněk.

Ve srovnání s kontrolní skupinou vede 12-denní kultivace se samotnou VA k poklesu počtu živých buněk na 65 % (1 mmol/l) resp. 10 % (3 mmol/l). Záření o dávce 2 Gy snížilo za stejný časový interval počet živých buněk na 76 % oproti kontrolní skupině. Pokud kombinujeme obě noxy, tak v případě inkubace buněk s 1 mmol/l VA po dobu 12 dní od ozáření poklesl počet živých buněk na 37 % a s 3 mmol/l prakticky živé nebyly přítomny. Zastoupení buněk v buněčném cyklu se při kombinovaném účinku 2 Gy a 1 mmol/l VA výrazně neměnilo, až zvýšení koncentrace na 3 mmol/l vyvolalo pokles počtu buněk v S fázi.

Přesný mechanismus společného účinku VA a ionizujícího záření zůstává nejasný, k zesílení odpovědi na radiaci pomocí HDACi může docházet na různých úrovních.

První z nich představují fyzikální změny chromatinové struktury, kdy obecně transkripčně aktivní geny jsou citlivější k cytotoxickým účinkům radiace a komprese chromatinu do struktur vyšších řádů působí jako ochrana DNA před radiací indukovanými dvojitými zlomy (DSB). DSB jsou nejzávažnějším typem poškození vzhledem k buněčnému přežití a zachování integrity genomu. Tím, že HDACi usnadňují jak relaxaci chromatinu tak genovou transkripci, mohou zesilovat cytotoxický účinek záření přes fyzikální změny chromatinové struktury (Chinnaiyan et al, 2005). Změny v chromatinové struktuře způsobené histonovou hyperacetylací ústí ve zvýšení počtu radiací indukovaných DSB (Karagiannis et El-Osta, 2006).

Další možný mechanismus zahrnuje interakce s reparačními mechanismy. Za citlivý indikátor DSB se obecně považuje fosforylace histonu H2AX, která se objevuje u mnoha nádorových i normálních buněk. Tato modifikace probíhá velice rychle, v minutách po ozáření pomocí ATM kinasy. Ta je aktivovaná na základě změn chromatinu v místě DSB. Současně se v místech dvojitých zlomů shlukují různé další proteiny a vytváří „ionizing radiation inducing foci“ – IRIF (Vavrova et al, 2007). Nejdůležitější funkcí těchto proteinů je oprava zářením vyvolaného poškození DNA. Dalšími substráty ATM, důležitými pro odpověď na DSB, jsou p53, který má klíčovou roli v kontrole buněčného cyklu a apoptóze, mdm2, ChK1 a ChK2, které jsou zahrnuté v regulaci buněčného cyklu, a BRCA1 a NSB1 důležité pro samotnou opravu DSB. Přesným místem působení HDACi může být přímo ATM kinasa, která interaguje *in vivo* i *in vitro* s HDAC1 a vytváří komplex s HDAC aktivitou nebo další senzor poškození DNA-protein 53BP1, který kolokalizuje s HDAC4 v DNA poškozením indukovaných ložiscích. Buňky s nefunkční HDAC4 se vyznačují značnou radiosenzitivitou (Karagiannis et El-Osta, 2006).

Během apoptózy, ve fázi fragmentace DNA a chromatinové kondenzace, dochází také k fosforylaci H2AX, tentokrát působením DNA-dependentní protein kinasy (Mukherjee et al, 2006). U apoptotických buněk je tento enzym klíčový, zatímco ATM je pro tento děj postradatelná. Inkubace buněk MOLT-4 s 2 mmol/l kyselinou valproovou vede k lehkému nárůstu apoptózy již po 24 hodinách a během 72 hodin stoupá. Proto roste počet buněk, které obsahují ložiska s  $\gamma$ H2AX 24 hodin po začátku inkubace, což je v pozdějších časových intervalech spojeno spíše s postupující apoptó-

zou nikoliv s přímým poškozením DNA působením VA. Fosforylovaný H2AX se lokalizuje v místech zářením vyvolaných zlomů a jeho disperze je spojena s reparací poškození. V našich podmínkách dochází k fosforylaci histonu H2AX 4 hodiny po působení samotné kyseliny valproové o koncentraci 1 mmol/l (u linie MOLT-4) a za 24 hodin po působení 4 mmol/l (u linie HL-60). Camphausen et al. neprokázali stejnou tendenci, zde působení kyseliny valproové o koncentraci 1,5 a 2 mmol/l nevyvolalo fosforylaci proteinu H2AX u linií U251 a SF539 (Camphausen et al, 2005). Inkubace buněk s HDACi jako jsou MS-275, butyrát sodný (NaB) a trichostatin A (TSA) před ozářením vede ke zvýšené a prodloužené expresi radiací indukovaných  $\gamma$ H2AX ložisek (Karagiannis et El-Osta, 2006). Prokázali jsme, že i působením kyseliny valproové dochází ke snižování reparačních schopností buňky, protože 24 hodin po ozáření v přítomnosti VA přetrvávají ložiska  $\gamma$ H2AX, zatímco ve stejném časovém intervalu po samotném ozáření jsou již poškození reparována.

Reparace DSB probíhá dvěma hlavními cestami – homologní rekombinací (HR) a nehomologním spojováním konců (NHEJ). Tyto dva procesy se výrazně liší a fungují komplementárně. Při HR se poškozený chromozom spojuje s nepoškozenou DNA, se kterou sdílí rozsáhlou sekvenční homologii. Naopak při NHEJ se vzájemně váží DSBs a není nutná ani sekvenční homologie mezi DNA konci ani spojení poškozené nukleové kyseliny s nepoškozenou partnerskou molekulou (Jackson, 2002). K nejdůležitějším faktorům nutným pro reparace patří Ku70, Ku80, které jsou v úzké vazbě s DNA-PK, DNA ligasou IV a komplexem Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN komplex). Další možný mechanismus synergického účinku HDACi s IR spočívá právě v utlumení těchto proteinů. Chinnaiyan et al. prokázali, že SAHA snižuje expresi DNA-PK a tak vyřazuje klíčovou cestu zahrnutou v reparaci DSB (Chinnaiyan et al, 2005). Čím nižší je exprese proteinů zodpovědných za reparaci, tím závažnější je celkové poškození DNA a apoptotická odpověď (Glaser, 2007). Inkubace s HDACi vede ke zvýšení jaderného klusterinu, což je zářením indukovatelný protein, který váže Ku-70 a při přílišné expresi v nádorových buňkách spouští apoptózu.

Způsobů, jakými vysvětlit radiosenzitizující účinek HDACi, je tedy několik, ale v každém případě jsou úzce spjaty s molekulárními mechanismy, které snižují schopnost buněk opravovat DSB způsobené ionizujícím zářením, s hyperacetylací histonů včetně H2AX (Camphausen et al, 2005), zesílením pro-apoptických proteinů (Glaser, 2007), a naopak zeslabením signálů pro přežití, které zajišťují radiorezistenci (Chinnaiyan et al, 2005).

U celé řady odlišných HDACi byly popsány schopnosti zvyšovat citlivost nádorových buněk vůči ionizujícímu záření. SAHA snižuje expresi DNA-PK, preinkubace buněk gliomu s TSA pravděpodobně posiluje účinek p53 a tím jsou nádorové buňky citlivější (Kim et al, 2004). Po působení NaB dochází k acetylaci jaderného histonu H4 u melanomové buněčné linie i u normálních buněk, avšak zvýšená citlivost vůči ionizujícímu záření je patrná pouze u nádorových buněk, proto se zdá, že radiosenzitizující účinek není závislý na stavu acetylace (Munshi et al, 2005). U obou typů buněk dochází ke stejným změnám v distribuci buněčného cyklu a expresi p21, avšak u melanomové buněčné linie dochází k nárůstu proapoptického proteinu Bax. NaB sám nezpůsobuje fosforylaci H2AX, na rozdíl od VA. Avšak když jsou buňky melanomu ozářeny dávkou 2 Gy po 24 hodin dlouhé preinkubaci s NaB, fosforylace histonu H2AX 30 minut po ozáření je zvýšena a také přetrvává déle (Munshi et al, 2005).

Naproti tomu, HDACi mají *in vivo* radioprotektivní účinky na zdravou tkáň. Snižují expresi onkogenů myc, potlačují zánětlivé cytokiny IL-1, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ . Topické lékové formy HDACi byly testovány pro schopnost zlepšovat poškození kůže a jako ochrana před negativními pozdně radiačními účinky na kůži. Kyselina valproová a trichostatin A zlepšují akutní dermatitidu, chrání před výskytem fibrózy a redukují pozdní tumorigenezi (Chung et al, 2004).

Kromě ionizujícího záření se VA nebo obecně inhibitory histondeacetylasy zdají být vhodnými agens pro kombinační léčbu s dalšími chemoterapeutiky, už jen proto, že způsobují remodelaci chromatinu a tak zvyšují přístupnost léčiv k DNA. Obecně předléčba různých buněčných linií s TSA nebo SAHA zvyšuje senzitivitu buněk vůči konvenční chemoterapii VP-16, ellipticinem, doxorubicinem a cis-platinou (Karagianis et al, 2006).

Souběžné podávání terapeutických dávek ATRA a HDACi má synergický protinádorový účinek (Epping et al, 2007), efektivně aktivuje utlumené geny regulované kyselinou retinovou při terapii akutní promyelocytární leukemie (APL), avšak podobné účinky byly pozorovány u jiných typů leukemií a solidních nádorů. Smysl této kombinační terapie spočívá na dvou předpokladech: obě použité látky jsou silná diferenciaci indukující činidla a retinoidy účinkují přes komplex jaderného receptoru, který interaguje s promotory RA-responzivních genů (Rosato et Grant, 2003). V APL blastech dochází k vzájemné translokaci mezi chromozomem APL a místem kódujícím receptor pro RA, přičemž vznikající fúzní proteiny blokují terminální diferenciaci he-

matopoetických buněk. U normálních buněk je receptor kyseliny retinové napojený na DNA responzivní části RA-regulovaných genů a zároveň tvoří komplexy s HDAC a dalšími korepresory jako je SMRT a N-CoR. V této podobě jsou RA-regulované geny utlumené. V přítomnosti ligandu dochází k uvolnění korepresorového komplexu a receptor se spojuje s transkripčními kofaktory, které zahrnují proteiny s histonacetylaseovou aktivitou (Ruthardt et al, 1997). U APL je změněný RA receptor necitlivý k fyziologickým koncentracím RA, pro aktivaci RA-responzivních genů je nutná alespoň 1000krát vyšší koncentrace než v případě normálních buněk (Melnick et Licht, 1999). Kyselina valproová indukuje diferenciaci a apoptózu v AML buněčné linii a čerstvých leukemických blastech synergicky s *all-trans*-retinovou kyselinou, ale viabilitu normálních hematopoetických kmenových buněk významně nepostihuje, naopak zvyšuje jejich proliferaci (Bug et al, 2005).

Co se týká vlivu na expresi proteinů a buněčný cyklus, kyselina valproová v koncentraci 2 mmol/l vyvolává za 72 hodin u buněk U-937 expresi proteinu p21, mnohem mírnější vzestup tohoto proteinu jsme zaznamenali po působení ATRA v koncentraci 1 μmol/l. Při současném použití obou nox ale nedochází k zesílení indukce p21. Stejný trend pozorovali u stromálních buněk endometria Wu et al., kdy souběžné podání VA a ATRA nemělo synergický vliv a nezvyšovalo expresi p21 v porovnání se samostatným působením jednotlivých nox (Wu et Guo, 2007). Synergický účinek jsme naopak pozorovali při fosforylaci histonu H2AX, kdy současném působení obou kyselin dochází k mnohem výraznější fosforylaci oproti působení látek samostatně.

## **7. SHRnutí NEJDůLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKů**

### **7.1. MOLT-4**

- hodnota EC<sub>50</sub> stanovena na 1,76 mmol/l pro 3-denní kultivaci s kyselinou valproovou, při dlouhodobé kultivaci (14 dní) klesá na resp. 0,63 mmol/l ,
- koncentrace inhibující proliferaci stanovena na 2 mmol/l,
- působení 4 mmol/l VA po dobu 3 dní vyvolává apoptózu u 85 % buněk. Za 6 dní je apoptotických 94 % buněk,
- acetylace jaderných histonů H3 a H4 probíhá nejdříve za 24 hodin po začátku inkubace s VA o koncentraci 4 mmol/l; histon H4 k působení citlivější,
- aktivace nehistonových cílů předchází této acetylaci. Protein p53 je aktivován a fosforylován na serinu 392 již za 2 hodiny po začátku působení VA v koncentraci 2 a 4 mmol/l. Paralelně je aktivován jeho negativní regulátor mdm2 fosforylací na serinu 166,
- indukce proteinu p21 následuje aktivaci p53, ale pouze po působení VA v koncentraci 2 mmol/l,
- ložiska  $\gamma$ H2AX 24 hodin po samotném ozáření již nejsou patrná, ve stejném časovém intervalu v přítomnosti VA dochází ke snížení reparačních schopností a ložiska přetrvávají,
- kombinace VA (0,5 mmol/l) a IR (1 Gy) má za následek zvýšenou indukci apoptózy zejména v pozdních časových intervalech, za 4 hodiny dochází k aktivaci a fosforylaci proteinu p53 ve zvýšené míře po kombinaci, stejně tak k indukci proteinu p21, která je zvýšená i 24 hodin po ozáření.

### **7.2. HL-60**

- hodnota EC<sub>50</sub> stanovena na 1,8 mmol/l pro 3-denní inkubaci s kyselinou valproovou, při dlouhodobé kultivaci je nutné kondiciované médium a hodnota paradoxně roste na 4,01 mmol/l,
- koncentrace inhibující proliferaci stanovena na 3 mmol/l,
- působení 4 mmol/l VA vyvolává po 3 dnech apoptózu u 16 % buněk. Za 6 dní je apoptotických 72 %,

- acetylace jaderných histonů H3 a H4 až v pozdějších intervalech působení VA, předchází jí p53 nezávislá indukce proteinu p21 po účinku VA v koncentraci 2 a 4 mmol/l,
- kombinací VA (3 mmol/l) a IR (2 Gy) dochází za 1 den k zesílení fosforylace H2AX, indukce p21 zůstává nezměněna.

### **7.3. U-937**

- hodnota EC<sub>50</sub> stanovená po 3 dnech kultivace s VA na 2,54 mmol/l, při dlouhodobé kultivaci mírně klesá na 2,2 mmol/l,
- acetylace jaderných histonů nejdříve za 48 hodin po působení VA o koncentraci 4 mmol/l, po působení koncentrace 2 mmol/l až za 72 hodin,
- indukce proteinu p21 24 hodin po začátku působení VA o koncentraci 2 mmol/l, po působení VA o koncentraci 4 mmol/l již za 5 hodin, nejvýraznější a s jinou dynamikou u linie exprimující gen PML/RAR,
- kombinací VA (2 mmol/l) a ATRA (1 μmol/l) dochází k zesílení fosforylace histonu H2AX.

## 8. ZÁVĚR

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

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

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

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

## 9. ZKRATKY

AML	akutní myeloidní leukemie
APL	akutní promyelocytární leukemie
ATP	adenosintrifosfát
ATRA	<i>all-trans</i> -retinová kyselina
D <sub>0</sub>	dávka záření, kterou přežije 37% buněk
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouvláknový zlom DNA
EC <sub>50</sub>	efektivní koncentrace, která vyvolává 50% maximálního účinku
FCS	fetální telecí sérum
FS	forward scatter
GABA	kyselina γ-aminomáselná
HAT	histonacetyltransferasa
HDAC	histondeacetylasa
HDACi	inhibitor histondeacetylasy
HR	homologní rekombinace
HU	hydroxyurea
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace, která vyvolá 50% maximální inhibice
IR	ionizující záření
MDS	myelodysplastický syndrom
MRN komplex	Mre11-Rad50-Nbs1 proteinový komplex
NaB	butyrát sodný
Nbs	Nijmegen Breakage Syndrome
NHEJ	nehomologní spojování konců
PB	fenylbutyrát
PBS	fosfátový pufr
RA	retinová kyselina
Rb	retinoblastom
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAHA	suberoylanilid kyseliny hydroxamové
SS	side scatter
TSA	trichostatin A
VA	valproová kyselina

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

## 10. LITERATURA

1. American Type Culture Collection [online].2006. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.lgcpromochem-atcc.com>>
2. Appella E, Anderson CW: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **2001**;268(10):2764-72
3. Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, Du L, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Fojo T, Bates SE: Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* **2002**;1(11):937-41
4. Blaheta RA, Cinatl J Jr: Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* **2002**;22(5):492-511
5. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr: Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* **2005**;25(4):383-97
6. Brooks CL, Li M, Gu W: Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *J Biol Chem* **2007**;282(31):22804-15
7. Bug G, Gül H, Schwarz K, Pfeifer H, Kampfmann M, Zheng X, Beissert T, Boehrer S, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M: Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* **2005**;65(7):2537-41
8. Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, Fine H, Tofilon PJ: Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* **2005**;114(3):380-6
9. Cimino G, Lo-Coco F, Fenu S, Travaglini L, Finolezzi E, Mancini M, Nanni M, Careddu A, Fazi F, Padula F, Fiorini R, Spiriti MA, Petti MC, Venditti A, Amadori S, Mandelli F, Pelicci PG, Nervi C: Sequential valproic acid/all-trans retinoic acid treatment reprograms differentiation in refractory and high-risk acute myeloid leukemia. *Cancer Res* **2006**;66(17):8903-11
10. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**;75(5):2458-62
11. Česká onkologická společnost [online]. 2004. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.linkos.cz/index1.php>>
12. Český statistický úřad [online]. 2008. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.czso.cz>>
13. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **2003** 15;370(Pt 3):737-49
14. Deubzer H, Busche B, Rönndahl G, Eikel D, Michaelis M, Cinatl J, Schulze S, Nau H, Witt O: Novel valproic acid derivatives with potent differentiation-inducing activity in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* **2006**;30(9):1167-75
15. Dokmanovic M, Marks PA: Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* **2005**;96(2):293-304
16. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA: Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* **2007**;5(10):981-9
17. Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R: A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**;104(45):17777-82
18. European Cell Collection [online]. 2007. Dostupné na World Wide Web:

- <<http://www.ecacc.org.uk/default.asp>>
19. Facchetti F, Previdi S, Ballarini M, Minucci S, Perego P, La Porta CA: Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* **2004**;9(5):573-82
  20. Ferrara FF, Fazi F, Bianchini A, Padula F, Gelmetti V, Minucci S, Mancini M, Pellicci PG, Lo Coco F, Nervi C: Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* **2001**;61(1):2-7
  21. Fortunati N, Bertino S, Costantino L, Bosco O, Vercellinato I, Catalano MG, Boccuzzi G: Valproic acid is a selective antiproliferative agent in estrogen-sensitive breast cancer cells. *Cancer Lett* **2008**;259(2):156-64
  22. Fu M, Wang C, Zhang X, Pestell RG: Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **2004**;68(6):1199-208
  23. Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I: Chromosomal histone modification patterns-from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* **2006**;11(4):199-208
  24. Gartel AL, Tyner AL: Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* **1999**;246(2):280-9
  25. Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rasool FV: Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol Cancer Res* **2006**;4(8):563-73
  26. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK: 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* **2003**;2(2):151-63
  27. Glaser KB: HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* **2007**;74(5):659-71
  28. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E: Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **2005**;363:15-23
  29. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pellicci PG, Heinzl T: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **2001**;20(24):6969-78
  30. Göttlicher M: Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann Hematol* **2004**;83 Suppl 1:S91-2
  31. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA: Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101(5):1241-6
  32. Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS: Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* **2004**;64(3):1079-86
  33. He LZ, Tolentino T, Grayson P, Zhong S, Warrell RP Jr, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, Pandolfi PP: Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* **2001**;108(9):1321-30
  34. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD: Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96(24):13777-82

35. Chinnaiyan P, Vallabhaneni G, Armstrong E, Huang SM, Harari PM: Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2005**;62(1):223-9
36. Chung YL, Wang AJ, Yao LF: Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Mol Cancer Ther* **2004**;3(3):317-25
37. Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP: MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* **2002**;21(22):6236-45
38. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP: p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* **2001**;20(6):1331-40
39. Jackson SP: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **2002**;23(5):687-96
40. Johannessen CU: Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int* **2000**;37(2-3):103-10
41. Ju R, Muller MT: Histone deacetylase inhibitors activate p21(WAF1) expression via ATM. *Cancer Res* **2003**;63(11):2891-7
42. Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U: The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* **2006**;91(2):248-51
43. Karagiannis TC, El-Osta A: The paradox of histone deacetylase inhibitor-mediated modulation of cellular responses to radiation. *Cell Cycle* **2006**;5(3):288-95
44. Karagiannis TC, Harikrishnan KN, El-Osta A: The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X. *Cancer Biol Ther* **2005**;4(7):787-93
45. Karagiannis TC, Kn H, El-Osta A: The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. *Epigenetics* **2006**;1(3):131-7
46. Karagiannis TC, El-Osta A: Modulation of cellular radiation responses by histone deacetylase inhibitors. *Oncogene* **2006**;25(28):3885-93
47. Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K: Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res* **2002**;26(5):495-502
48. Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M: Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* **2008**;409(2):581-9
49. Khanna KK, Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **2001**;27(3):247-54
50. Kim IA, Shin JH, Kim IH, Kim JH, Kim JS, Wu HG, Chie EK, Ha SW, Park CI, Kao GD: Histone deacetylase inhibitor-mediated radiosensitization of human cancer cells: class differences and the potential influence of p53. *Clin Cancer Res* **2006**;12(3 Pt 1):940-9
51. Kim JH, Shin JH, Kim IH: Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2004**;59(4):1174-80
52. Klener P: Klinická onkologie. 1.vyd. Praha: Galén, **2002**. 686 s. ISBN 80-7262-151-3

53. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M: Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol* **2007**;53(2):37-49
54. Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* **2007**;128(4):693-705
55. Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M: The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* **2003**;22(13):3411-20
56. Krejsek J, Kopecký O: *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nukleus, 2004. 968 s. ISBN 80-86225-50-X
57. Kuendgen A, Knipp S, Fox F, Strupp C, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Gattermann N: Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* **2005**;84 Suppl 1:61-6
58. Kuendgen A, Schmid M, Knipp S, Czibere A, Hildebrandt B, Steidl C, Haas R, Germing U, Doehner H, Gattermann N: Valproic Acid (VPA) Achieves High Response Rates in Patients with Low-Risk Myelodysplastic Syndromes. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **2005**;106: Abstract 789
59. Kuendgen A, Gattermann N: Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer* **2007**;110(5):943-54
60. Kuendgen A, Lübbert M: Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* **2008** Epub ahead of print
61. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, Germing U, Gattermann N: Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* **2004**;104(5):1266-9
62. Lager G, Doetzlhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, Chiocca S, Suske G, Rotheneder H, Wintersberger E, Seiser C: The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol* **2003**;23(8):2669-79
63. Lakin ND, Jackson SP: Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **1999**;18(53):7644-55
64. Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ: Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* **2005**;3(10):e328
65. Löscher W: Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* **1999**;58(1):31-59
66. Luo RX, Dean DC: Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *J Natl Cancer Inst* **1999**;91(15):1288-94
67. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA: Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* **2000**;92(15):1210-6
68. Masopust J: *Patobiochemie buňky*. 1.vyd. Praha: Česká společnost klinické biochemie a Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, **2003**. 344 s. ISBN 80 239 1011-0
69. Meek DW, Knippschild U: Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res* **2003**;1(14):1017-26



## 11. PŘÍLOHY

### 11.1. Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J:

Význam kyseliny valproové v diferenciaci a indukci apoptózy nádorových buněk.

Lékařské zprávy LF UK Hradec Králové 2005;50(5-6):167-173



VYŽÁDÁNO REDAKCÍ

## VÝZNAM KYSELINY VALPROOVÉ V DIFERENCIACI A INDUKCI APOPTÓZY NÁDOROVÝCH BUNĚK

*Darina Zášková<sup>1</sup>, Martina Řezáčová<sup>1</sup>, Jirina Vávrová<sup>2</sup>*

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové: Ústav lékařské biochemie<sup>1</sup>; Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové: Katedra radiobiologie<sup>2</sup>

**Summary: The role of valproic acid in differentiation and induction of apoptosis in leukemia cells.**

A recent interest in valproic acid is concentrated on its newly discovered antitumor activities, based on an inhibition of histone deacetylases (HDAC). Inhibitors of HDAC significantly affect transcription of genes involved in the regulation of cell cycle, apoptosis and DNA synthesis by changes of histone acetylation and therefore by changes of tertiary structure of DNA. HDAC inhibitors induce a cell cycle arrest in G1 or G2 phase, which is followed by differentiation and/or apoptosis. These properties can be used in the treatment of acute promyelocytic leukemia. During a monotherapy with retinoic acid a resistance and a differentiation blockade is developed in some patients. This undesirable effect can be possibly overcome by combined therapy with retinoic acid and HDAC inhibitor. The treatment targets fusion protein PML-RAR, which is responsible for the inhibition of terminal differentiation in blast cells, but also accounts for the sensitivity to retinoic acid treatment. From the currently tested HDAC inhibitors, valproic acid has favorable pharmacological properties, it is used in the clinical *praxis* for a long time, and therefore represents a promising agent not only for the therapy of promyelocytic leukemia.

---

**Key words:** Valproic acid; Inhibitors of histone deacetylases; PML-RAR fusion protein; Apoptosis; Differentiation; Leukemia

---

**Souhrn:** V posledních letech se zájem o kyselinu valproovou soustředil především na její nově objevené antitumorózní vlastnosti inhibitora histoneacetylasy (HDAC). Inhibitory HDAC ovlivněním acetylace, a tím terciární struktury DNA, výrazně působí na tran-

skripce, a to především u genů důležitých pro regulaci buněčného cyklu, apoptózu a DNA syntézu. V různé míře vyvolávají zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi, následovanou diferenciací nebo apoptózou. Tyto vlastnosti jsou využitelné především při léčbě akutní promyelocytární leukémie. U určitého procenta pacientů dochází při monoterapii kyselinou retinovou k rozvoji rezistence a diferenciacímu bloku, který může být překonán kombinací terapií kyseliny retinové a inhibitoru HDAC. Cílem působení je fúzní protein PML-RAR, který v blastech blokuje terminální diferenciaci, ale zároveň způsobuje citlivost buněk k terapii. Z dosud zkoušených inhibitorů HDAC má kyselina valproová vhodné farmakologické vlastnosti, je již dlouhou dobu používána v klinické praxi, a proto představuje slibný lék v terapii nejen akutní promyelocytární leukémie.

Kyselina valproová (VPA), 2-propylpentanová kyselina, je osmiuhlíkatá rozvětvená mastná kyselina s antikonvulzními vlastnostmi. Je lékem volby při léčbě některých forem epilepsie, využívá se v terapii bipolárních poruch a migrény. V posledních letech se zájem soustředil především na její nově objevené antitumorózní vlastnosti (1). Mechanismem antitumorózního účinku se kyselina valproová řadí mezi inhibitory histondeacetylas (HDACI), které na základě chemické struktury rozdělujeme do 4 základních skupin:

- Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. butyrát, fenylobutyát, fenylacetát, VPA).
- Syntetické deriváty benzamidu (MS-275, CI-994, N-acetyldinalin).
- Cyklické tetrapeptidy (trapoxin, apicidin).
- Hydroxamové kyseliny (trichostatin A, suberoylanilidhydroxamová kyselina-SAHA) (11).

Oproti ostatním mastným kyselinám má VPA výhodu, že je již dlouhou dobu (téměř třicet let) používána v klinické praxi, může být aplikována perorálně, nežádoucí účinky jsou vzácné a biologický poločas je 3-4krát delší než u fenylacetátu nebo fenylobutyátu. Koncentrace v rovnovážném stavu se pohybuje v rozmezí 50-100 µg/ml (0,35-0,7 mM). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly stanoveny na 0,5 mM pro buňky neuroblastomu a 1,0 mM pro buňky gliomu, z čehož vyplývá, že terapeutické hodnoty dosahované při léčbě epilepsie jsou dostačující pro vyvolání antitumorózního účinku (1). Při podání v těhotenství může VPA vyvolat malformace a vrozené vady jako např. defekty neurální trubice. Mechanismus teratogenity je odlišný od antiepileptického působení (4). Přestože mechanismus antiepileptického působení VPA není zcela přesně objasněn, velkou roli hraje zejména ovlivnění GABAergního systému. VPA zvyšuje hladinu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA) a ovlivňuje aktivitu některých enzymů souvisejících s metabolismem mozkových buněk (succinát semialdehyd dehydrogenasa, GABA transaminasa a  $\alpha$ -oxoglutarát dehydrogenasa) (2). Naproti tomu teratogenita VPA zřejmě souvisí s inhibicí histondeacetylas (HDAC), neboť podobný teratogenní účinek byl prokázán i po trichostatinu A (10). Předpokládá se, že terapie VPA by mohla být účinná v léčbě promyelocytární leukémie i solidních nádorů (nádory střeva, prsu a prostaty).

V zástavě buněčného růstu, diferenciaci a apoptóze hraje hlavní roli regulace transkripce, která je ovlivňována velkým množstvím faktorů. Jedním z nich je terciární struk-

tura DNA, která je určující pro přístup transkripčních faktorů k jejich cílovým segmentům, a tím pro průběh transkripce.

DNA eukaryotického jádra je kondenzována do vysoce organizovaného chromatinu. Základní strukturální jednotkou chromatinu je kulovitá částice – nukleosom – o průměru 10 nm. Obsahuje 146 párů bází, které vytvářejí 1,75 levotočivých nadšroubovicových závitů DNA kolem proteinového jádra (8). Jádro má strukturu oktameru, skládá se vždy ze dvou stejných molekul čtyř různých typů jaderných bílkovin – histonů. Histony H2A a H2B jsou bohaté na lysin a vytvářejí dimery, které se spojují ve větší oligomerní komplexy. Histony H3 a H4 s vysokým obsahem argininu vytvářejí tetramery. Struktura histonů je mezidruhově značně konzervativní, což znamená, že jejich funkce je u všech eukaryontů stejná. Histon H1 je obsažen v chromatinu v přibližně polovičním množství než ostatní typy histonů a není součástí centrálního oktameru, nachází se ve vnější části nukleosomů. K chromatinu se váže nejslaběji, lze ho snadno extrahovat solným roztokem a chromatin se pak stává rozpustným. Sestavení nukleosomu je pravděpodobně zprostředkováno jaderným proteinem nukleoplasminem.

Nukleosomy se dále skládají do vyšších struktur chromatinu, které jsou poměrně dynamické – procházejí značnými změnami, které vedou k aktivaci nebo represí transkripce. Na silně bazických amino-terminálních částech histonů probíhá 5 typů kovalentních modifikací: acetylace, fosforylace, metylace, ADP-ribosylace a kovalentní vazba na jaderný protein ubikvitin. Nejlépe z nich je prozkoumaná acetylace – probíhá na lysinových zbytcích, např. lysin 8 a lysin 16 na histonu H4, lysin 9 a lysin 14 na histonu H3 (7). Acetylace histonových proteinů neutralizuje pozitivní náboj na lysinových zbytcích a narušuje strukturu nukleosomů, což usnadňuje přístup transkripčních faktorů k DNA a vyvolává změny v genové expresi.

Acetylace/deacetylace jaderných histonů je dána poměrem aktivit opačně působících enzymů ze skupiny histonacetyltransferas (HAT) a histondeacetylasy (1). Oba typy enzymů působí na cílové geny v komplexu se sekvencně specifickými transkripčními faktory a jejich kofaktory (např. N-CoR, SMRT) (4). V deacetylovaném stavu jsou nukleosomy vysoce kompaktní, nepřístupné k transkripci, a naopak. Proto zvýšení acetylace histonů je spojeno s vyšší transkripční aktivitou a obecně acetylace je důležitým mechanismem, kontrolujícím uspořádání chromatinu a genové regulace.

Inhibitory HDAC řídí přibližně 2 % genů, a to především geny ovlivňující buněčný cyklus, apoptózu a DNA syntézu (11). Inhibice aktivity HDAC probíhá pravděpodobně vazbou na katalytické místo, a tak blokádu přístupu substrátu (4). Některé inhibitory HDAC mají omezené terapeutické využití kvůli nízké biologické dostupnosti *in vivo* a stejně tak nežádoucím vedlejším účinkům při účinných dávkách.

Antitumorózní aktivita HDAC nevychází pouze z jejich schopnosti regulovat acetylaci histonů, ale může zahrnovat i jiné funkce včetně acetylace nehistonových proteinů, např. p53, E2F, *retinoblastoma protein*. Navíc některé ze sloučenin nejsou specifické pouze pro HDAC, ale inhibují také fosforylaci a metylaci proteinů nebo DNA. Další z hypotéz je, že HDAC mohou reaktivovat tumorsupresorové geny, jejichž aktivita byla v průběhu neoplastických transformací utlumena, např. gen CDKN1A, který kóduje CDK inhibitor p21 (11).

Inhibitory HDAC vyvolávají v různé míře zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi, následovanou diferenciací nebo apoptózou. Např. indukce p21, zprostředkovaná inhibitory HDAC, vede k defosforylaci pRb, který se následně váže a inaktivuje E2F, což způsobuje represi transkripce genů, důležitých pro pokračování buněčného cyklu, a může vyústit až v zástavu růstu a buněčnou diferenciací (11). Faktory, určující zda nádorová buňka po ovlivnění HDACI zastaví svůj cyklus, podlehne diferenciaci nebo apoptóze, nejsou zatím zcela objasněny, ale důležitou roli hraje typ buňky, působící agens, dávka a interval podání – např. u buněk linie U937 působení SAHA v nízkých koncentracích vyvolalo diferenciaci, zatímco ve vyšších pak poškození mitochondrií a apoptózu (11).

Nevhodná represe genů, nutných pro buněčnou diferenciaci, je spojena s některými druhy rakoviny, především s akutní promyelocytární leukémií (APL). Akutní promyelocytární leukémie se řadí mezi akutní myeloidní leukémie, tvoří z nich více než 10 %. Morfologicky je pro ni typická akumulace myeloidních buněk v promyelocytárním stadiu maturace (13). Geneticky je charakterizována vzájemnou translokací, která vždy zahrnuje chromosom 17 (fúze v místě kódujícím  $\alpha$  receptor kyseliny retinové – RAR $\alpha$ ). Druhým chromosomem účastnícím se translokace je přibližně v 95 % případů APL chromosom 15 (gen promyelocytární leukémie – PML), ve zbylých případech chromosom 11 – geny PLZF (PML zinc finger), NuMA (*nuclear matrix-mitotic apparatus*), NPM (*nucleophosmin*) nebo STAT5b (9). Takto vzniklé hybridní geny kódují fúzní proteiny, které u hematopoetických prekursorových buněk blokuji schopnost podstupovat terminální diferenciaci. Translokace 15;17 a 11;17 jsou primární chromosomální aberace a často jsou jedinou cytogenetickou abnormalitou u APL. Ačkoliv blasty exprimující PML-RAR $\alpha$  jsou klinicky nerozlišitelné od blastů exprimujících ostatní fúzní proteiny, různí se v jedné důležité vlastnosti, a to v odpovědi na působení retinové kyseliny (RA). PML-RAR $\alpha$  APL blasty jsou na rozdíl od ostatních APL blastů vysoce citlivé na farmakologické dávky RA a u většiny pacientů léčených RA dochází k remisi (12).

Receptory pro kyselinu retinovou patří mezi jaderné receptory typu II. Existují tři typy RAR:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . K vazbě na DNA dochází ve formě heterodimeru s RXR (*retinoid receptor x*), který opět má tři formy,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Heterodimer RAR-RXR se u některých genů váže na části promotorů, označované jako RARE (*retinoic acid response element*). V nepřítomnosti ligandu – retinové kyseliny – váže heterodimer RAR-RXR kromě DNA korepresory SMRT a N-CoR, které jsou součástí komplexu dalších korepresorů, včetně histon-deacetylasy 1, a tak změnami ve struktuře chromatinu způsobuje utlumení cílových genů. V přítomnosti ligandu dochází k uvolnění korepresorového komplexu a receptor se spojuje s transkripčními kofaktory, které zahrnují proteiny s histonacetylasovou aktivitou (CBP, ACTR, P/CAF). Modifikace struktury chromatinu pomocí RAR-RXR přispívá ke kontrole transkripce. Přesné detaily mechanismu, který přenáší RA signál z jaderných receptorů do transkripčního procesu, nebyly dosud na molekulární úrovni objasněny.

Fúzní protein PML-RAR $\alpha$  zastává v APL blastech dvojí funkci – přispívá k transformovanému fenotypu a slouží jako mediátor diferenciaci indukované retinoidy. Zatímco v přítomnosti téměř fyziologických koncentrací RA PML-RAR tlumí tran-

skripci a blokuje diferenciaci, vysoké dávky RA aktivují jím zprostředkovanou genovou transkripci a buněčnou diferenciaci (4). Fúzní protein PML-RAR $\alpha$  antagonizuje funkce přirozených proteinů PML, RAR $\alpha$  a RXR bez genetické modifikace (*wild type* – přirozený typ). Fúze zachovává funkční všechny domény RAR $\alpha$  s výjimkou domény A, což je jedna ze dvou domén AF-1, zodpovědných za transkripční aktivaci. PML-RAR $\alpha$  se tedy může vázat na RARE místa v DNA podobně jako RAR $\alpha$  bez genetické modifikace, většinou rovněž jako heterodimer s RXR. Heterodimery PML-RAR $\alpha$ /RXR vytváří na RARE multimery díky zachované helikální doméně PML, čímž sekvestrují RXR a úspěšně o něj soutěží s RAR $\alpha$ . PML-RAR $\alpha$  váže korepresory SMRT a N-CoR a další asociované proteiny včetně HDAC1, a to silněji než RAR $\alpha$ . V nepřítomnosti ligandu je inhibiční účinek fúzního PML-RAR $\alpha$  vyšší než inhibiční účinek RAR $\alpha$ . Vazebná doména pro retinovou kyselinu je zachována, avšak k uvolnění korepresorů z vazby na PML-RAR $\alpha$  je zapotřebí zhruba 1000x vyšší koncentrace RA – zatímco pro aktivaci RAR $\alpha$  jsou postačující koncentrace all-trans retinové kyseliny (ATRA) v řádu nmol/l, u PML-RAR $\alpha$  to jsou  $\mu$ mol/l. Tyto fakty jsou v souladu s teorií, že PML-RAR působí při nižších koncentracích retinoidů jako dominantní negativní receptor, který spotřebovává kritické komponenty a zabraňuje jejich interakci s přirozeným typem RAR $\alpha$ .

Terapeutické dávky ATRA ( $\mu$ mol/l) tedy překonávají zvýšenou afinitu PML-RAR k represorovým proteinům a vedou k aktivaci transkripce genů obsahujících RARE. Dochází rovněž k normalizaci jaderné distribuce ostatních složek komplexu (RXR, přirozený PML, PLZF), ke zvýšené degradaci PML-RAR a ke zvýšené expresi přirozeného typu RAR $\alpha$ . Inhibitory HDAC by měly potlačit reziduální aktivitu korepresorového komplexu obsahujícího prokazatelně HDAC1, a tím zvýšit efekt (9). Zatímco schopnost blokovat hematopoetickou diferenciaci závisí na neporušené DNA vazebné doméně, RA cílové geny pravděpodobně představují *downstream* efekторы PML-RAR. Fúzní protein blokuje diferenciaci tlumením RA-závislých genů zahrnutých v kontrole diferenciaci hematopoetických prekurzorových buněk. Studie mechanismu, kterým PML-RAR reguluje transkripci, jsou limitovány skutečností, že represe ještě nebyla analyzována v nativním chromatinu. V nepřítomnosti RA PML-RAR zvyšuje kondenzaci chromatinu. Protože trichostatin A dokáže tento efekt překonat, předpokládáme, že příčinou je abnormální zvyšování HDAC aktivity (13). PML-RAR tedy způsobuje vyšší kondenzaci chromatinu, který pak zůstává méně přístupný dokonce i v přítomnosti RA.

U pacientů s APL vyvolává léčba ATRA dlouhodobou remisi u 70 % z nich. Avšak při opakované terapii RA dochází pravidelně k vzniku rezistence a nemocný na léčbu RA téměř nereaguje, proto se hledají nové terapeutické přístupy. Z tohoto pohledu představuje kombinace ATRA s HDAC1 slibnou strategií. Používání této kombinace je založeno na několika předpokladech:

1. obě sloučeniny jsou silná diferenciaci indukující činidla
2. retinoidy působí přes jaderný receptorový komplex, který interaguje s promotory RA-zodpovědných genů. Navíc, HDAC podjednotka je integrální částí tohoto korepresorového komplexu, který se podílí na útlumu transkripce v nepřítomnosti ligandu (11).

Kombinace RA a HDAC by se tedy mohla efektivně využívat v léčbě APL, a to jak RA-senzitivní, tak RA-rezistentní, protože inhibitory HDAC *in vitro* obnovují tran-

skripční aktivaci a indukují diferenciaci primárních blastů u AML pacientů. HDACI mají dávkově závislou inhibiční aktivitu, RA taktéž značně inhibuje buněčný růst a jejich kombinaci získáváme kombinací látek s aditivním inhibičním efektem (5).

Jako první z inhibitorů HDAC se v praxi použil fenylbutyrát. U pacienta s četnými relapsy po terapii RA došlo k remisi onemocnění po léčbě fenylbutyrátem. Nevýhodou je, že fenylbutyrát je po i.v. podání velice rychle odbouráván, a proto se musí podávat ve vysokých dávkách, přesahujících 400 mg/kg/den.

Další z inhibitorů HDAC, SAHA se nyní nachází ve druhém stadiu klinických zkoušek, ale při léčbě dochází k projevům leukopenie, trombocytopenie a hypotenze (3).

První klinické zkoušky s kyselinou valproovou, jakožto inhibitorem HDAC, se začaly provádět v Německu. Osmnáct pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a AML bylo léčeno samotnou kyselinou valproovou v dávkách 346 a 693  $\mu\text{M}$  (50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ) a 5 nemocných kombinací VPA a ATRA (80 mg/m<sup>2</sup>/den ve dvou denních dávkách; den 1.-7., každý druhý týden). Na léčbu monoterapií odpovídalo osm osob (tzn. 44 %), čtyři pacienti měli přetrvávající obtíže a u šesti docházelo k progresi onemocnění. V případě kombinované léčby došlo u jednoho nemocného ke snížení počtu blastů, u jednoho pacienta přetrvával stabilní stav a u tří došlo k progresi onemocnění. Odpověď na léčbu VPA nesouvisela s pohlavím, věkem, počtem krevních destiček před terapií, počtem blastů kostní dřeně nebo dávkou VPA. Frekvence transfuzí červené krevní složky, které předcházely léčbě VPA, byla signifikantně nižší u pacientů, kteří na terapii reagovali.

Větší počet nemocných reagoval na monoterapii VPA než na prvořadou kombináční léčbu. Je možné, že pro uvolnění represe signální cesty kyseliny retinové je nutná inhibice HDAC. Proto synergický účinek obou léků pravděpodobně vyžaduje předléčbu pomocí VPA.

Ačkoliv VPA řadíme mezi první generaci inhibitorů HDAC, pro svoje obrovské výhody jako je perorální aplikace, stabilní sérové koncentrace, málo nežadoucích účinků a dobrá tolerance, je valproová kyselina slibným lékem především pro kombináční léčbu v terapii akutní promyelocytární leukémie (6).

## Literatura

1. Blaheta RA, Cinatl J Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002;22(5):492-511.
2. Johannessen CU. Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int* 2000;37(2-3):103-10.
3. Gottlicher M. Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann Hematol* 2004;83(Suppl 1):S91-9.
4. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20(24):6969-78.
5. He LZ, Tolentino T, Grayson P et al. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 2001;108(9):1321-30.
6. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004;104(5):1266-9.
7. Luo RX, Dean DC. Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(15):1288-94.
8. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(15):1210-6.

9. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;93(10):3167-215.
10. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001;276(39):36734-41.
11. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13(1):21-38.
12. Ruthard M, Testa U, Nervi C et al. Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol* 1997;17:4859-69.
13. Segalla S, Rinaldi L, Kilstup-Nielsen C et al. Retinoic acid receptor alpha fusion to PML affects its transcriptional and chromatin-remodeling properties. *Mol Cell Biol* 2003;23:8795-808.

*Mgr. Darina Zášková,  
Univerzita Karlova v Praze,  
Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Ústav lékařské biochemie,  
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové.  
e-mail: zaskodovad@lfhk.cuni.cz*



**11.2. Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Zášková D:**

Effect of Valproic Acid and Antiapoptotic Cytokines on Differentiation and Apoptosis Induction of Human Leukemia Cells.

General Physiology and Biophysics **2006**;25:65-79



## Effect of Valproic Acid and Antiapoptotic Cytokines on Differentiation and Apoptosis Induction of Human Leukemia Cells

M. ŘEZÁČOVÁ<sup>1</sup>, J. VÁVROVÁ<sup>2</sup>, D. VOKURKOVÁ<sup>3</sup> AND D. ZÁŠKODOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences Hradec Králové, University of Defense Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

**Abstract.** This work compares effect of histone deacetylase inhibitor, valproic acid (VA), on proliferation, differentiation and apoptosis induction in two human leukemic cell lines: HL-60 (human promyelocytic leukemia, p53 negative) and MOLT-4 (human T-lymphocyte leukemia, p53 wild type). Incubation with VA caused decrease in percentage of cells in S phase of cell cycle. The decrease was more intensive in HL-60 cells, where the cells in S phase were absent 6 days after the beginning of incubation with VA (4 mmol/l). 3-day-long incubation of HL-60 cells with 4 mmol/l VA caused differentiation of these cells, marked by increase in CD11b and co-stimulatory/adhesion molecule CD86, and induction of a significant apoptosis. Annexin V positive cells lost the CD11b antigen. 3-day-long incubation of MOLT-4 cells with VA (1–2 mmol/l) inhibited proliferation and decreased percentage of cells in S phase of the cell cycle. 90% of MOLT-4 cells are CD7 positive. This CD7 positivity is not changed during apoptosis induction (detected as Annexin V positivity). On the other hand, CD4 marker expression decreases after incubation with 1–2 mmol/l VA, but during apoptosis induction by 4 mmol/l VA, most of the apoptotic Annexin V positive cells were also CD4 positive. Using a clonogenic survival assay  $EC_{50}$  for 3-day-long incubation with VA was determined. For HL-60 cells, the established  $EC_{50}$  was 1.84 mmol/l, for MOLT-4 cells it was 1.76 mmol/l. Ability of VA to induce differentiation in HL-60 cells thus does not affect final cell killing. However, the elimination of the cells was considerably affected by presence of hematopoietic growth factors. 14-day-long incubation of HL-60 cells with VA in conditioned medium (source of IL-3, SCF, G-CSF) caused increase in  $EC_{50}$  to 4 mmol/l, while in MOLT-4 cells (cultivation without conditioned medium), the  $EC_{50}$  decreased to 0.63 mmol/l.

Correspondence to: Martina Řezáčová, Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic. E-mail: rezacovam@lfhk.cuni.cz

**Key words:** Histone deacetylase inhibitor — Valproic acid — Apoptosis — Leukemia

### Introduction

It has been found that defects of status of histone acetylation are related to an expression of many cellular oncogenes and tumor-suppressor genes (Gottlicher 2004; Rosato and Grant 2004; Vávrová et al. 2005). These findings have initiated an extensive search for substances capable of histone deacetylases (HDAC) inhibition. Among these compounds, differing greatly in their chemical structure, is a group of short chain carboxylic acids such as butyrate or valproic acid (VA). VA or sodium valproate is a commonly used anticonvulsant in the management of epilepsy with good response rates and an acceptable toxicity. Aberrant recruitment of HDAC by several acute myeloid leukemia (AML) fusion proteins is required for their capacity to block myeloid differentiation (Minucci et al. 2001). Gottlicher et al. (2001) proved that VA at concentrations of 0.3–1 mmol/l, which are achieved in a patient serum during the therapy of epilepsy with a daily dose of 20–30 mg/kg, acts as a potent inhibitor of HDAC activity. They observed that myeloid differentiation, induced when leukemic blasts of AML patients are cultured for 5 days in the presence of VA (1 mmol/l), is comparable to that induced by all-trans retinoic acid (ATRA) and the best results were obtained by the combination of VA and ATRA. Remarkably, the combination of retinoic acid and VA treatment induces the appearance of cells with metamyelocyte or neutrophil like morphology.

Trus et al. (2005) described that VA could mimic or enhance retinoid sensitivity in the AML cell line, OCI/AML-2, and in the clinical samples derived from patients with AML. Using GeneChip experiment they demonstrated that VA modulated the expression of numerous genes, including p21, that were not affected by ATRA. Expression of p21 is related with cell cycle arrest. Kawagoe et al. (2002) studied the effect of VA on apoptosis induction in the leukemic line MV411 and they showed that VA induced apoptosis by mitochondrial pathway through cytochrome c release from mitochondrias and activation of caspases 8, 9 a 3. A caspase inhibitor, zVAD-FMK, inhibited the DNA fragmentation caused by VA, but not the cell death.

HL-60 cells of human promyelocytic leukemia induced to undergo maturation by retinoic acid ultimately die by an apoptotic death, although as a relatively late event. It becomes apparent that terminal differentiation of leukemic cells and apoptosis are closely related processes. Rather than a differentiation, probably a dysregulation of maturation of U937 human leukemia cells leading to apoptosis would be induced after treatment with phorbol myristate acetate (De Vente et al. 1995). Their data suggest that the decision of a cell to undergo death or differentiation in response to phorbol esters may, in part, be modulated by alterations within the protein kinase C signal transduction pathway. Vrana et al. (1999) proved that HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces maturation and apoptosis at HL-60 and U937 cells. SAHA-mediated apoptosis is associated with decreased mitochondrial membrane potential, caspase 3 activation and poly

(ADP-ribose) polymerase degradation and is p53 independent, but at least partially regulated by Bcl-2/Bcl-XL, p21 signaling cascade. Tang et al. (2004) found that VA induces apoptosis in AML patient cell expressing of both P-glycoprotein and/or MDR-associated protein 1 (MRP1).

In our work we compared the effect of VA in p53 negative HL-60 cells, which are capable of terminal differentiation after exposure to retinoic acid, and p53 wild type cells MOLT-4 (human T-lymphocyte leukemia). We found that VA induces apoptosis not only through terminal differentiation of cells (HL-60), but also directly in p53 wild type MOLT-4 cells, indicating that the process of apoptosis induction caused by HDAC inhibitors is not directly dependent on cell differentiation.

## Materials and Methods

### *Cell culture and culture conditions*

HL-60 cells were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, UK) and MOLT-4 cells were obtained from American Type Culture Collection (University Blvd., Manassas, USA). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) supplemented with 20% fetal calf serum in humidified incubator at 37°C and controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cultures were divided every 2<sup>nd</sup> day by dilution to a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml. Cell counts were performed with a hemocytometer, cell membrane integrity was determined using the Trypan Blue exclusion technique. Cells in the maximal range of 20 passages were used for this study.

### *Incubation of cells with VA*

VA (Sigma) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) to achieve stock solution of 1 mol/l, it was stored at -20°C until required. Two ways of exposure of cells to VA were used:

1. Cells in exponential growth were seeded at  $2-4 \times 10^5$ /ml in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks and supplemented with 0.1–10 mmol/l VA. Cells were harvested after 1–6 days of incubation, washed and used for other assay.

2. VA was added to Iscove's medium containing 0.9% methylcellulose and 30% fetal bovine serum (FBS) (MOLT-4 cells). For HL-60 cells, 10% conditioned medium (source of interleukine 3 (IL-3), stem cell factor (SCF) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)) from human cell line 5637 (urine vessel carcinoma) were added to higher specified Iscove's medium. Both cell lines were cultured in this medium continuously for 14 days.

### *Cell cycle analysis*

Following the incubation, the cells were washed with cold PBS, fixed by 70% ethanol and stained with propidium iodide in Vindelov's solution for 30 min at 37°C. Fluorescence (DNA content) was measured with Coulter Electronic (Hiialeah,

FL, USA) apparatus. A minimum of 10,000 cells analyzed in each sample served to determine the percentages of cells in each phase of the cell cycle, using Multicycle AV software. Three independent experiments were performed.

#### *CD11b, CD86, CD4 and CD7 antibody, apoptosis detection*

For apoptosis detection we used Apoptest-FITC kit (DakoCytomation, Brno, Czech Republic). During apoptosis, cells expose phosphatidylserine at the cell surface. Annexin V is a phospholipid binding protein which, in the presence of calcium ions, binds selectively and with high affinity to phosphatidylserine. For detection of cell surface markers in HL-60 cells we used PE-conjugated anti-human CD11b (Bear1, IgG1-IM2581) and anti-human CD86 (HA5.2B7, IgG2b-IM2729) – obtained from Immunotech (Marseille, France). For detection of cell surface markers in MOLT-4 cells we used PE-conjugated anti-human CD7-PE (8H8.1, IgG2b-IM1429) and anti-human CD4 (13B8.2, IgG1-IM0449) – obtained from Immunotech (Marseille, France).

#### *Flow cytometric analysis*

The ability of the cells to scatter light in a forward direction (FS) correlates with cell volume, while their ability to scatter light in side direction (SS) correlates with cell granularity. We analyzed VA-treated cells for changes in the intensity of FS and SS as compared to untreated control cells. Flow cytometric analysis was performed on a Coulter Epics XL flow cytometer equipped with a 15 mW argon-ion laser with excitation capabilities at 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). A minimum of 10,000 cells was collected for each 2-colour sample in a list mode file format. List mode data was analyzed using Epics XL System II software (Coulter Electronic).

#### *In vitro clonogenic survival assay*

$10^2$ – $10^5$  cells were plated in Iscove's medium containing 0.9% methylcellulose and 30% FBS. HL-60 cells were stimulated by 10% conditioned medium of human cell line 5637 (urine vessel carcinoma) (used only for HL-60 cells) *per* 1 ml of medium. Duplicate dishes were plated for each experiment. The cells were incubated for 14 days at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>. Colonies containing more than 40 cells were scored. For the clonogenic survival data, each point is the mean from four measurements from two experiments.

#### *Statistical analysis*

The results were statistically evaluated with Student's *t*-test. The values represent mean  $\pm$  SD (standard deviation of the mean) of three independent experiments. Statistical significance of the differences of means between comparable sets is indicated.

## Results

### *Cell growth and viability*

Fig. 1 shows the effects of VA on the proliferation rate of the HL-60 and MOLT-4 cell lines. As can be seen from this figure, cultivation of HL-60 cells with 2 mmol/l VA induced a slight decrease in proliferation in comparison with control cells. Cultivation with 4 mmol/l VA induced high inhibition of the HL-60 cell growth rate. The decrease in the proliferation rate observed in HL-60 cells after addition of 10 mmol/l VA was caused by the cytotoxic effect of VA. After 6 days, all cells treated with 10 mmol/l VA were dead.

As can be seen from the Fig. 1B, cultivation of MOLT-4 cells with 1 mmol/l VA induced a slight decrease in proliferation in comparison with control cells. Cultivation with 2 mmol/l VA induced high inhibition of the MOLT-4 cell growth rate. The decrease in the proliferation rate observed in MOLT-4 cells after addition of 4 mmol/l VA was due to the cytotoxic effect of VA. After 6 days, all cells treated with 4 mmol/l VA were dead.

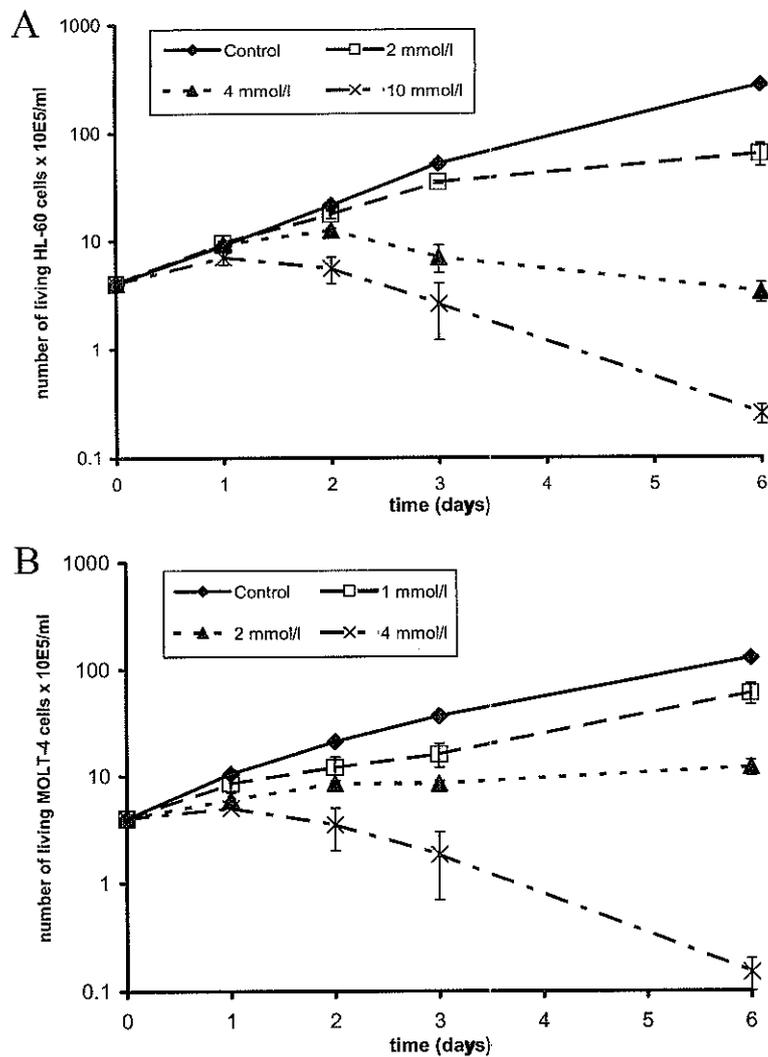
### *Clonogenicity*

Using colony assay we established  $EC_{50}$  value (the concentration, after which 50% of cells retain their clonogenic capacity and form colonies) of 3-day-long incubation with VA for HL-60 and MOLT-4 cells. The detected  $EC_{50}$  value for HL-60 cells was 1.84 mmol/l VA and for MOLT-4 cells 1.76 mmol/l VA. We also established  $EC_{50}$  value for continuous exposure to VA, where VA was added to clonogenicity cultivation dishes (14-day-long incubation). In the case of MOLT-4 cells, the  $EC_{50}$  value decreased to 0.63 mmol/l (Fig. 2B). HL-60 cells require a 10% conditioned medium as a source of cytokines (IL-3, SCF, G-CSF) for colony formation. For HL-60 cells cultured 14 days in presence of VA and conditioned medium, the  $EC_{50}$  value increased to 4 mmol/l (Fig. 2A).

### *Analysis of apoptosis*

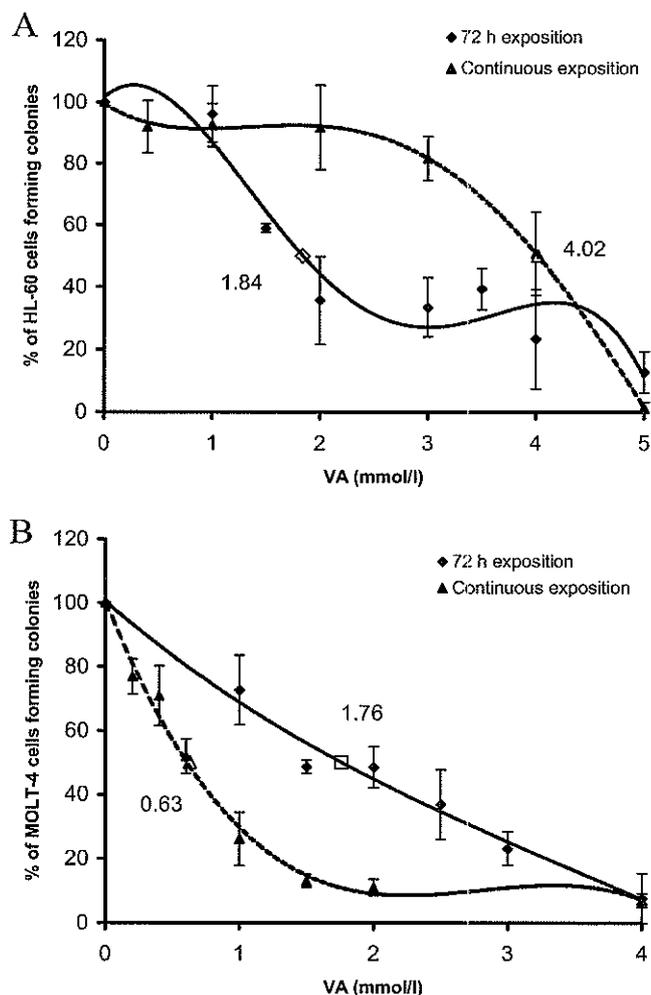
Fig. 3 shows changes in MOLT-4 cells after 3-day-long incubation with VA. Induction of early apoptosis was monitored mainly by Annexin V positivity, which binds selectively to phosphatidylserine. We also evaluated changes of forward and side light scattering, where the intensity of light scattered in forward direction correlates with cell size, and side scatter correlates with granularity. Further we observed expression of CD7 and CD4 markers and changes in distribution of the cells in cell cycle phases.

A cell triggered to undergo apoptosis activates a cascade of molecular events, which leads to its total disintegration. One of the early events is condensation of the cytoplasm followed by a change in cell size, shape and granularity. Therefore, we analyzed VA-treated cells for changes in the intensity of FS and SS as compared to untreated control. Population of cells with low FS (decrease in size) and high SS (increase in granularity) appears after incubation with VA in concentration-dependent



**Figure 1.** Kinetics of VA effect on the proliferative rate of the HL-60 and MOLT-4 cell line. The cells were exposed to various VA concentrations (HL-60 1–10 mmol/l, part A; MOLT-4 1–4 mmol/l, part B). Numbers of viable cells were determined by Trypan blue staining. Each point represents mean value from at least 3 experiments  $\pm$  SEM.

manner. After incubation with 4 mmol/l VA, this subpopulation represents 85% of cells. Induction of apoptosis was confirmed by Annexin V positivity. 90% of control MOLT-4 cells are CD7<sup>+</sup> and Annexin V<sup>-</sup>. The percentage of CD7<sup>+</sup> and



**Figure 2.** Effect of 72 h-long and continuous treatment of HL-60 and MOLT-4 cells with VA on colony-forming properties. In the case of HL-60 cells, conditioned medium providing cytokines (IL-3, SCF, G-CSF) was used. The presence of cytokines protected the cells from apoptosis during continuous exposure to VA (part A). MOLT-4 cells colonies were grown in standard cultivation medium (part B). Each point represents mean value from at least 4 measurements  $\pm$  SEM.

Annexin V<sup>+</sup> cells increase in concentration-dependent manners (from 8% in control cells up to 87% in cells exposed to 4 mmol/l VA). 48% of control MOLT-4 cells are CD4<sup>+</sup> and Annexin V<sup>-</sup>. After incubation with VA, this subpopulation signif-

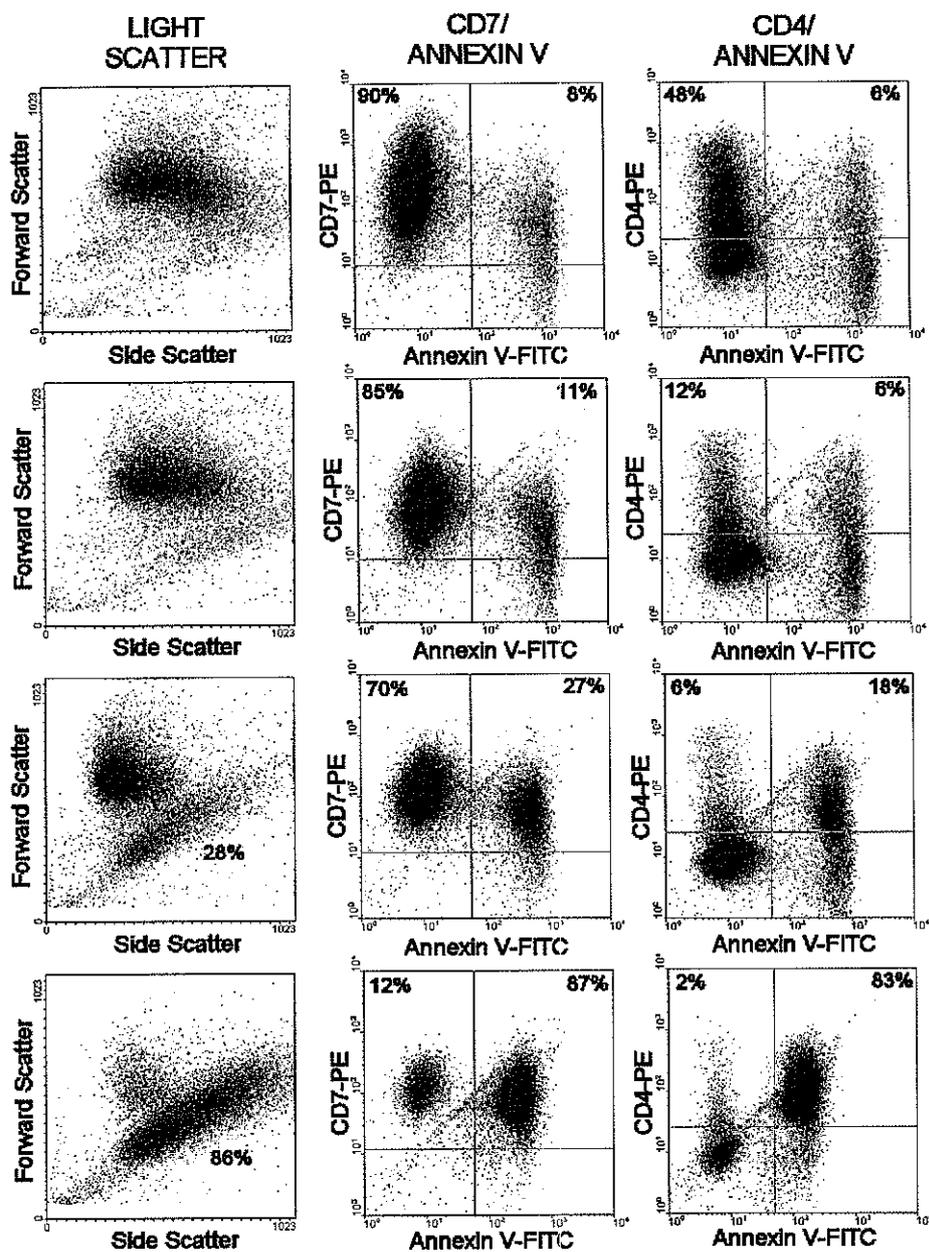


Figure 3. Changes in MOLT-4 cells after 3-day-long incubation with VA. The cells were treated with increasing concentrations of VA (from top row to bottom: control, 1 mmol/l VA, 2 mmol/l VA, 4 mmol/l VA) for 72 h, harvested and analyzed by flow cytometry.

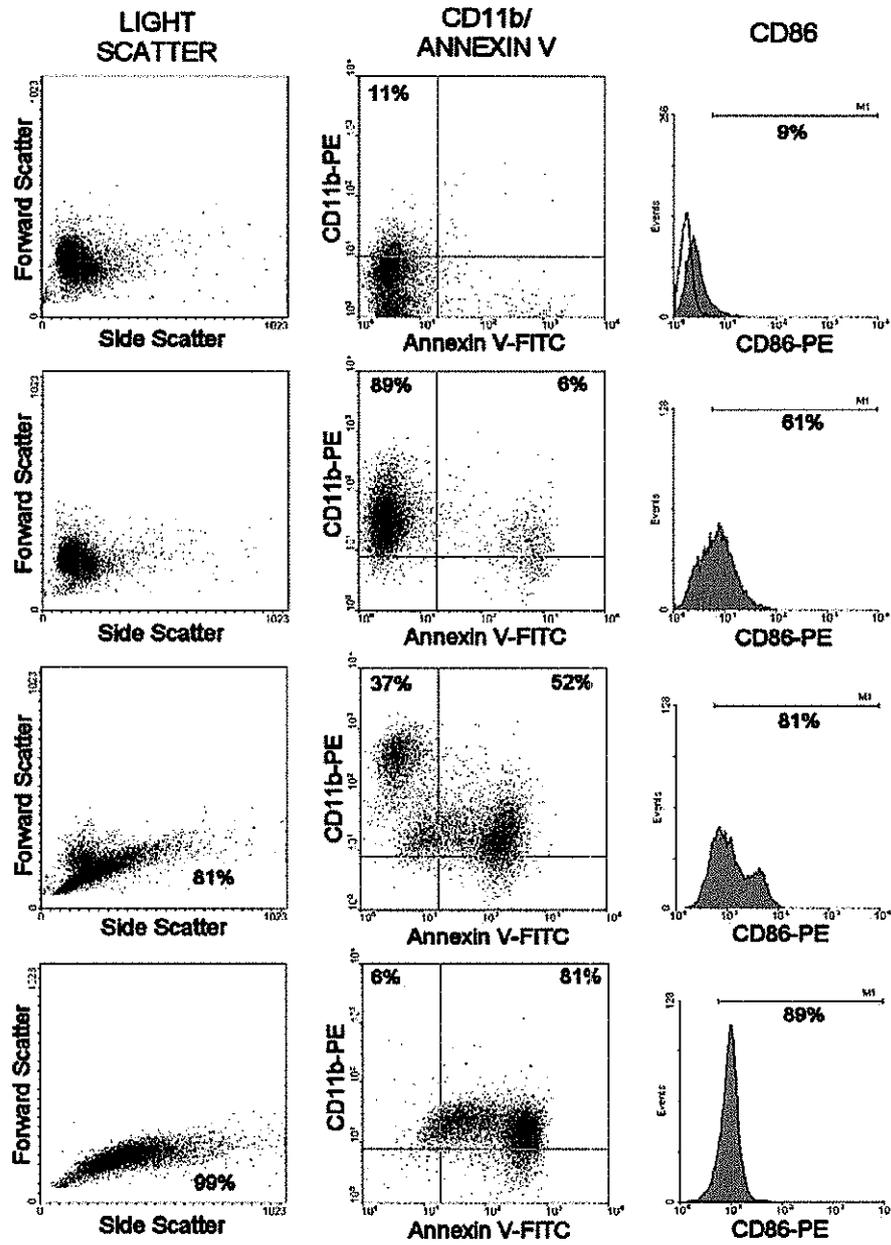
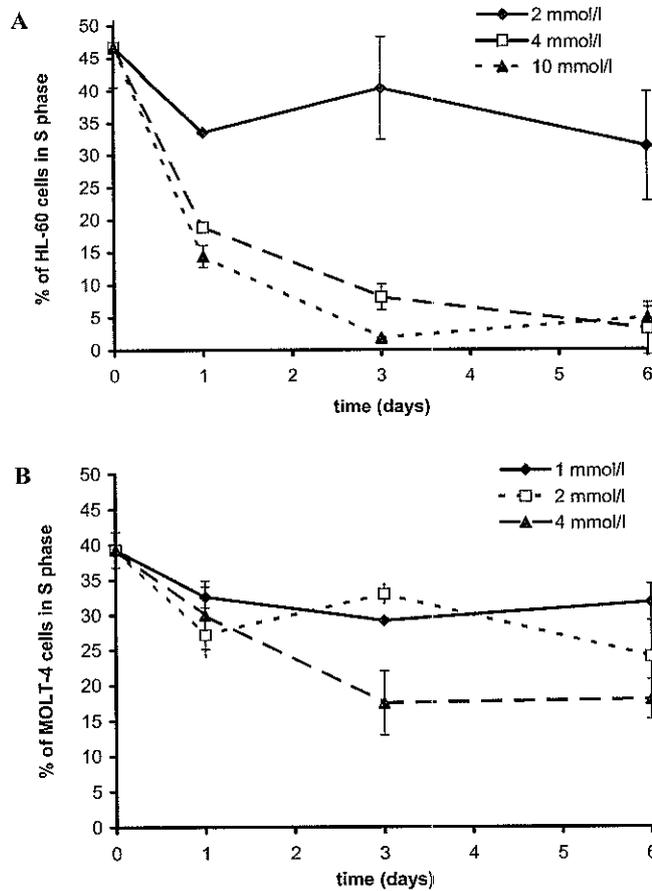


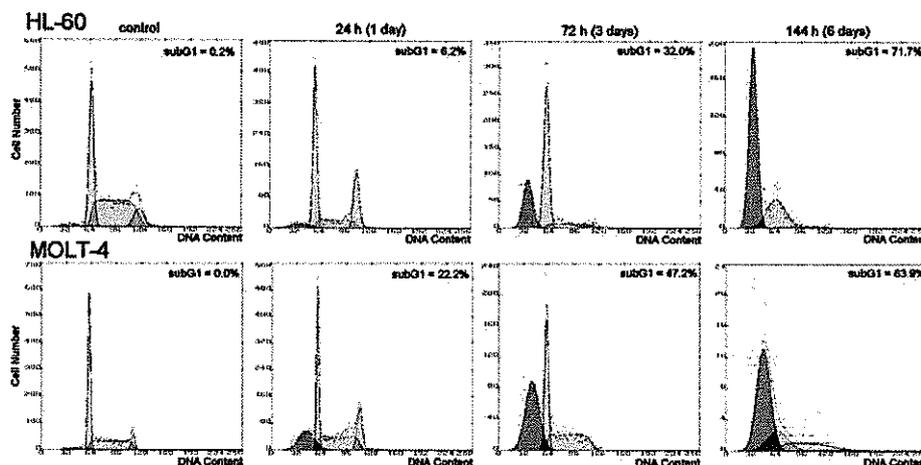
Figure 4. Changes in HL-60 cells after 3-day-long incubation with VA. The cells were treated with increasing concentrations of VA (from top row to bottom: control, 2 mmol/l VA, 4 mmol/l VA, 10 mmol/l VA) for 72 h, harvested and analyzed by flow cytometry.



**Figure 5.** Kinetics of distribution of cells in S phase of the cell cycle after VA treatment. The cells were exposed to various VA concentrations (HL-60 1–10 mmol/l, part A; MOLT-4 1–4 mmol/l, part B). Numbers of viable cells in S phase were determined using flow cytometric DNA analysis. The graph shows percentage of cells in S phase from viable cells only. Each point represents mean value from at least 3 experiments  $\pm$  SEM.

icantly decreases (only 12% of cells after incubation with 1 mmol/l VA). This is accompanied by increase in CD4<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> subpopulation (from 8% in control cells up to 83% in cells exposed to 4 mmol/l VA). It is interesting that the cells maintain CD7 and CD4 markers even during apoptosis.

Similar analysis for changes in HL-60 cells after 3-day-long incubation with VA is shown on Fig. 4. We evaluated changes of FS and SS, positivity of Annexin V staining and expression of CD11b and CD86 markers. Population of cells with low FS and high SS appears after incubation with VA in concentration-dependent



**Figure 6.** Apoptosis and cell cycle changes after treatment by VA. The MOLT-4 and HL-60 cells were treated with 4 mmol/l VA for 1 to 6 days, harvested and analyzed by flow cytometric detection of DNA content. Apoptotic cells are detected as subG1 peak. Sample results of 1 of 3 experiments.

manners. After incubation with 4 mmol/l VA, this subpopulation represents 81% of cells. 6,8% of control cells are CD11b<sup>+</sup> and Annexin V<sup>-</sup>. After incubation with the lowest tested concentration – 2 mmol/l VA, nearly all cells are CD11b positive, which proves ability of VA to induce differentiation of HL-60 cells. 89% of cells were CD11b<sup>+</sup>/Annexin V<sup>-</sup> and 6% CD11b<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup>. After exposure to higher concentrations of VA, CD11b<sup>+</sup>/Annexin V<sup>+</sup> subpopulation prevails. After 3-day-long incubation with 10 mmol/l VA, nearly all cells are apoptotic. Also expression of CD86 increases after 3-day-long incubation with 2 mmol/l VA (61%) and further increases with increasing concentration of VA (10 mmol/l VA, 89%).

#### *Analysis of cell cycle*

In next part of our work we analyzed distribution of the cells in cell cycle phases using flow cytometric DNA content analysis. Most significant changes were observed in percentage of cells in S phase. The results are shown on Fig. 5. The percentage of cells in S phase of cell cycle decreased in concentration dependent manners and intensified with the time of incubation. The decrease in S phase in HL-60 cells was significant already after 24 h-long incubation with 4 and 10 mmol/l VA. The decrease in S phase in MOLT-4 cells is significant, but less pronounced in comparison to HL-60 cells. Fig. 6 shows the time course of cell cycle changes and apoptosis detected by subG1 peak after the treatment of HL-60 and MOLT-4 cells by VA during 6 days. Significant changes in distribution of cells in cell cycle phases – progressive decrease in S phase cells (see also Fig. 5) from 24 to 144 h of VA

treatment and accumulation of cells in G2/M phase after 24 h of VA treatment could be seen in both cell lines. During first 3 days, the increase in apoptotic subpopulation is more intensive in MOLT-4 cells, as VA in HL-60 cells induces mainly differentiation in the beginning of the treatment.

## Discussion

The results obtained in this work prove that VA stimulates differentiation of HL-60 cells and acts as highly potent inducer of apoptosis in human leukemia cells of myeloid (HL-60) and T lymphocyte (MOLT-4) origin. Our data corresponds with findings of Gottlicher et al. (2001), who proved induction of apoptosis by VA in leukemic blasts of AML of patients after 5-day-long incubation with 1 mmol/l VA.

It is generally accepted that there is a close relation between differentiation and apoptosis. Almost the same  $EC_{50}$  value (1.8 mmol/l) was established for both MOLT-4 and HL-60 cells after 3-day-long incubation with VA. Slow apoptosis is also induced in the case of continuous incubation of MOLT-4 cells (on the clonogenicity dishes, where VA is added directly to cultivation medium with methylcellulose) and therefore the  $EC_{50}$  value decreases to 0.63 mmol/l. HL-60 cells are cultured for clonogenicity determination in presence of conditioned medium providing cytokines (IL-3, SCF, G-CSF), which have antiapoptotic effect. During continuous exposure to VA in this model the cells were resistant to apoptosis induction and  $EC_{50}$  value paradoxically increased to 4 mmol/l. The curve exhibits a long plateau up to VA concentration 3 mmol/l (where the loss of clonogenicity was not considerable) followed by a linear part of the curve. After exposure to concentrations 5 mmol/l and higher all cells lost colony-forming ability. Antiapoptotic effect of cytokines (IL-3, SCF and FLT3-ligand) on hematopoietic stem cells after *in vitro* irradiation was described by Vávrová et al. (2002). In their work they proved that *in vitro* irradiation of AC133<sup>+</sup> cells isolated from peripheral blood of healthy donors after mobilization induces apoptosis in 80% of these cells 72 h after irradiation by 2.5 Gy. However, in presence of cytokine combination IL-3+SCF+FLT3-ligand, surviving 20% of cells are able to divide and on 7<sup>th</sup> day after irradiation, 35% of cells are in S phase of cell cycle. Results of our work also emphasize importance of culture medium, as in the presence of antiapoptotic cytokines, the cells treated by VA only differentiate and apoptosis is minimal. From the clinical point of view an important finding is (Bug et al. 2005; De Felice et al. 2005), that VA, known to induce differentiation or apoptosis in leukemic blasts, stimulates the proliferation of normal CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells in presence of cytokine cocktails (IL-3+SCF+FLT3-ligand+trombopoetin) and therefore increases expansion potential of these cells.

We detected that incubation of HL-60 cells with VA after causes differentiation, as after 3-day-long exposure to 2 mmol/l VA nearly all cells gained CD11b positivity. In humans, integrin CD11b is strongly expressed on myeloid cells, and weakly expressed on NK cells and some activated lymphocytes. In our previous

work (Mareková et al. 2003) we have described differentiation and apoptosis induction in HL-60 cells after incubation with ATRA. It seems that VA, similarly as ATRA, triggers in these cells an aberrant differentiation program, a phenomenon known to lead to apoptosis. Similar results were obtained in HL-60 cells after 3-day-long incubation with other HDAC inhibitors, such as SAHA (Vrana et al. 1999) or butyrate (Maeda et al. 2000). Maeda et al. (2000) proved in AML cell lines that some of HDAC inhibitors (i.e. butyrate and trichostatin A) increase expression of CD86 and ICAM-1 molecules. They also proved that in 30 clinical AML samples, CD86 expression was significantly increased after treatment with butyrate. CD86 (also called B7-2) is capable of binding the receptors CD28 and CTLA-4. Its binding to CD28 provides critical co-stimulatory signal enabling activation of T-lymphocytes. In contrast to the stimulatory effects of CD28 ligation, CTLA-4 acts as an inhibitory receptor that is vital for down-modulation of the immune response. In our experiments VA induced increased expression of CD86 in HL-60 cells. However, the immunomodulatory effects of HDAC inhibitors are poorly understood. These studies show that HDAC inhibitors, including VA, can enhance expression of co-stimulatory/adhesion molecules in AML cells. It was found that during allogeneic transplantation of bone marrow, the antileukemic immune response (graft *versus* leukemia) occurs and that donor T-lymphocytes play an important role in residual leukemic cells removal. Expression of CD86 on the surface of leukemic cells is related to T-lymphocytes interactions and killing (Maeda et al. 2000). It is becoming apparent that VA in AML cells can be used as suppressor of cellular growth, inductor of differentiation and apoptosis and also as immunotherapeutic agent.

VA causes quick apoptosis also in MOLT-4 cells, which do not differentiate. Interesting observation is that percentage of CD4<sup>+</sup>/Annexin V<sup>-</sup> dramatically decreases after exposure of MOLT-4 cells to all tested concentrations of VA, but CD7<sup>+</sup>/Annexin V<sup>-</sup> subpopulation is significantly affected only after the highest VA concentration (4 mmol/l). The fact that most of Annexin V<sup>+</sup> MOLT-4 cells probably recruit from CD4 positive subpopulation deserves further elucidation. However, it is clear that apoptosis induced after incubation with VA can be initiated without connection with previous differentiation of cells.

In MOLT-4 cells, the concentrations 1–2 mmol/l of VA had mostly cytostatic effect during 6-day-long incubation. The number of cells in the S phase of cell cycle decreased significantly, as well as the ability of the cells to form colonies. The highest concentration studied (4 mmol/l) had cytotoxic effect. Apoptosis induction by VA in concentration 4 mmol/l in MOLT-4 cells was proved by presence of subG1 peak in DNA content analysis and by Annexin V binding accompanied by retained expression of CD4 and CD7 markers. MOLT-4 cells quickly transform from early apoptotic phase to late apoptotic phase, which is not detectable by subG1 peak, therefore part of late apoptotic MOLT-4 cells are not analyzed by DNA content analysis.

In both cell lines, VA inhibits proliferation of the cells which corresponds to observed decrease in percentage of cells in S phase of cell cycle. MOLT-4 cells enter

apoptosis more quickly. The importance of mitochondrial pathway of apoptosis induction by VA is still in question. Our preliminary results indicate significance of p53 increase and its phosphorylation in MOLT-4 cells. Future studies should further concentrate on molecular mechanisms important in proliferation inhibition and apoptosis induction by HDAC inhibitors.

**Acknowledgements.** This work was supported by grant No. 202/04/0598 of Grant Agency of the Czech Republic.

## References

- Bug G., Gul H., Schwarz K., Pfeifer H., Kampfmann M., Zheng X., Beissert T., Boehrer S., Hoelzer D., Ottmann O. G., Ruthardt M. (2005): Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* **65**, 2537–2541
- De Felice L., Tatarelli C., Mascolo M. G., Gregorj C., Agostini F., Fiorini R., Gelmetti V., Pascale S., Padula F., Petrucci M. T., Arcese W., Nervi C. (2005): Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* **65**, 1505–1513
- De Vente J., Kiley S., Garris T., Bryant W., Hooker J., Posekany K., Parker P., Cook P., Fletcher D., Ways D. K. (1995): Phorbol ester treatment of U937 cells with altered protein kinase C content and distribution induces cell death rather than differentiation. *Cell Growth Differ.* **6**, 371–382
- Gottlicher M. (2004): Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann. Hematol.* **83** (Suppl. 1), S91–92
- Gottlicher M., Minucci S., Zhu P., Kramer O. H., Schimpf A., Giavara S., Sleeman J. P., Lo Coco F., Nervi C., Pelicci P. G., Henzel T. (2001): Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969–6978
- Kawagoe R., Kawagoe H., Sano K. (2002): Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and independent apoptotic signaling pathways. *Leuk. Res.* **26**, 495–502
- Maeda T., Towatari M., Kosugi H., Saito H. (2000): Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **96**, 3847–3856
- Mareková M., Vávrová J., Vokurková D., Psutka J. (2003): Modulation of ionizing radiation induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Physiol. Res.* **52**, 599–606
- Minucci S., Nervi C., Coco F. L., Pelicci P. G. (2001): Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemia? *Oncogene* **20**, 3110–3115
- Rosato R. R., Grant S. (2004): Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **13**, 21–38
- Tang R., Faussat A. M., Majdak P., Perrot J. Y., Chaoui D., Legrand O., Marie J. P. (2004): Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cell expressing P-gp and MRP1. *Leukemia* **18**, 1246–1251
- Trus M. R., Yang L., Suarez S. F., Bordeleau L., Jurisica I., Minden M. D. (2005): The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all trans retinoic acid in acute myeloblastic leukemia cells. *Leukemia* **19**, 1161–1168

- Vávrová J., Vokurková D., Mareková M., Bláha M., Jebavý L., Filip S. (2002): Antiapoptotic cytokine IL-3+SCF+FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Folia Biol. (Prague)* **48**, 51—57
- Vávrová J., Řezáčová M., Osterreicher J. (2005): Inhibitors of histone-deacetylase. *J. Appl. Biomed.* **3**, 13—24
- Vrana J. A., Decker R. H., Johnson C. R., Wang Z., Jarvis W. D., Richon V. M., Ehinger B., Grant S. (1999): Induction of apoptosis in U 937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* **18**, 7016—7025

Final version accepted: December 21, 2005



**11.3. Záškodová D, Řezáčová M, Vávrová J, Tichý A:**

Effect of Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, on Cell Death and Molecular Changes Caused by Low-Dose Irradiation.

Annals of the New York Academy of Sciences **2006**;1091:385-98



# Effect of Valproic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, on Cell Death and Molecular Changes Caused by Low-Dose Irradiation

DARINA ZÁŠKODOVÁ,<sup>a</sup> MARTINA ŘEZÁČOVÁ,<sup>a</sup> JIŘINA VÁVROVÁ,<sup>b</sup>  
DORIS VOKURKOVÁ,<sup>c</sup> AND ALEŠ TICHÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic*

<sup>b</sup>*Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic*

<sup>c</sup>*Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Valproic acid (VA), a histone deacetylase inhibitor (HDACI), *in vitro* induces differentiation of promyelocyte leukemia cell (HL-60) and proliferation arrest and apoptosis of various leukemia cell lines. In MOLT-4 cells (human T lymphocyte leukemia) the cell cycle arrest is caused by 2 mM VA, while 4 mM VA induces mainly apoptosis. In our work we studied effect of VA on molecular mechanisms responsible for cell cycle arrest (2 mM VA) or apoptosis induction (4 mM VA). The aim of our article was to evaluate a cotreatment by low (cytostatic) concentrations of VA with ionizing radiation and an effect of this combination on apoptosis induction in tumor cells MOLT-4. We prove that 24-h long incubation with VA causes acetylation of histones H3 and H4 in concentration-dependent manners. During first hours after the beginning of cultivation with VA in both studied concentrations (2 and 4 mM) an increase of p53 and its phosphorylation on serine 392 is detected, as well as a phosphorylation of Mdm2 on serine 166. After 8 and 24 h after the beginning of cultivation with 2 mM VA we detect p21, which is not observed after exposure to 4 mM VA. Cleavage of lamin B to 46 kDa fragment as an indicator of apoptosis was apparent after 24-h long incubation with 4 mM VA. In this article we prove radiosensitizing effect of VA. After 3-days long cultivation of cells with 2 mM VA the D<sub>0</sub> value decreased from 0.7 to 0.2 Gy. Also the EC70 value fell from 0.97 to 0.38 mM

Address for correspondence: Darina Zášková, Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic. Voice: +420-495-816-166; fax: +420-495-512-715.  
e-mail: zaskodovad@lfhk.cuni.cz

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1091: 385–398 (2006). © 2006 New York Academy of Sciences.  
doi: 10.1196/annals.1378.082

**when the cells were irradiated with a dose of 1 Gy before the continual cultivation with VA. Continual cultivation of MOLT-4 cells irradiated by the dose of 1 Gy with VA caused during 14 days after irradiation significant increase of apoptotic cells in comparison to the cells exposed to only one factor. As a conclusion it can be postulated that continual exposure of MOLT-4 cells to VA increases apoptosis and decreases colony-forming capacity of the cells irradiated with small dose of radiation.**

**KEYWORDS:** valproic acid; ionizing radiation; apoptosis; p53; Mdm2; p21

## INTRODUCTION

Valproic acid (VA) (2-propylpentanoic acid) is a short chain fatty acid with anticonvulsant properties. Moreover, during the past years it has become evident that VA possesses antitumor properties of an inhibitor of histone deacetylases (HDAC).<sup>1</sup>

Histone acetyltransferases and HDAC are two antagonistic enzymatic groups responsible for chromatin remodeling. In transcriptionally silent cells, the nuclear histones are hypoacetylated on lysine residues of their NH<sub>2</sub> terminal tails, so that the chromatin forms a compact mass inaccessible for transcription factors. Whereas the acetylation on the lysine residues neutralizes the positive charge, which makes the chromatin unfolded and the transcription can proceed. Histone acetylation constitutes a key mechanism controlling chromatin remodeling and gene regulation. Thus the histone deacetylases inhibitors (HADCi) influence the expression of approximately 2% of genes, especially genes important for cell cycle regulation and induction of differentiation and/or apoptosis.

Three days long incubation of leukemic cells HL-60 and MOLT-4 with VA inhibits proliferation, decreases number of cells in S phase of the cell cycle and induces apoptosis.<sup>2</sup> EC50 value measured by colony-forming efficiency is 1.8 mM VA for both leukemic cell lines.

Also ionizing radiation is an important apoptosis inductor at leukemic cell lines MOLT-4 and HL-60. In contrary to the HL-60 cells (which are p53 negative), the MOLT-4 cells express functional p53 and exhibit greater radiosensitivity.<sup>3,4</sup> It is generally accepted that ionizing radiation causes double-strand break (DSB) of DNA, which trigger Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM kinase) activation.<sup>5</sup> Activated ATM kinase triggers phosphorylation of other targets, mainly p53, Mdm2, Chk1, and Chk2. These phosphorylations are followed by further processes related to cell cycle arrest and reparation of radiation-induced damage or apoptosis induction. During the first hours (2–6 h) after the irradiation by a high lethal dose of 7.5 Gy we proved accumulation of p53 and its phosphorylation on serine 15 and serine 392. The p21 upregulation followed (4–6 h) the p53 phosphorylation process.<sup>3</sup>

It is known from literature<sup>6</sup> that accumulation of p21 appears after treatment of tumor cells by HDACI and that this accumulation is p53 independent, as it was detected also at cells lacking p53.<sup>7,8</sup> In unstressed cells, p53 is maintained at low levels through target degradation by its key negative regulator Mdm2.<sup>9</sup> Mdm2 is an E3 ligase that ubiquitylates a defined set of lysine residues at the C terminus of p53 and thus triggers its rapid degradation by proteasomes or promotes its nuclear export.<sup>10</sup>

It is presumed that apoptosis induced in tumor cells after exposure to HDACI is mediated by mitochondrial pathway. Kawagoe *et al.*<sup>11</sup> described effect of VA on apoptosis induction at leukemic cell line MV411 and they found that VA induces apoptosis by initiation of mitochondrial pathway through cytochrome c release from mitochondria and further activation of caspase 8, 9, and 3. A caspase inhibitor, zVAD-FMK, inhibited the DNA fragmentation by VA but not cell death.

In our study we evaluated effect of cytostatic (2 mM) and cytotoxic (4 mM) concentration of VA on posttranslational modifications of histones H3 and H4 and proteins p53 and Mdm2. While acetylation of H3 and H4 and phosphorylation of p53 and Mdm2 was detected after both concentrations, p21 was upregulated only after cytostatic (2 mM) concentration.

Because of many tumor cells exhibit aberrant regulation of gene expression and primary activity of HDACI is to regulate gene expression, one of possible approaches in antitumor therapy is their combination with other anti-tumor agents.<sup>12</sup> Rosato and co-worker<sup>12</sup> proved synergic interactions between HDACI SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) or sodium butyrate (NaB) and TRAIL (tumor necrosis apoptosis inducing ligand) at leukemic cell lines HL-60, Jurkat, and U937. Simultaneous administration of TRAIL and HDACI potently induces mitochondrial damage, caspase activation and apoptosis in human leukemia cells. Kim *et al.*<sup>13</sup> proved dose-dependent reduction in survival and radiosensitization with another HDACI—TSA (trichostatin A) treatment in human glioblastoma cells, where TSA decreased clonogenic survival of the cells when applied before as well as after the irradiation. Munshi *et al.*<sup>14</sup> described radiosensitizing effect of NaB at two melanoma cell lines; this effect was not observed at normal fibroblasts. Radiosensitizing effect of NaB is caused mainly by decrease of reparation capacity of tumor cells.

The aim of our article was to determine whether low cytostatic concentrations of VA can potentiate radiation-caused apoptosis induction at T lymphocyte cell line MOLT-4.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell Cultures and Culture Conditions*

The human T lymphocyte leukemia cells MOLT-4 from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) have been cultured in Iscove's modified

Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich s.r.o., Prague, Czech Republic) supplemented with a 20% fetal calf serum in a humidified incubator at 37°C and a controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cultures have been divided every second day by a dilution to a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL. The cell counts have been performed with a hemocytometer, the cell membrane integrity has been determined by using the Trypan blue exclusion technique. The cell lines in the maximal range of up to 20 passages have been used for this study.

### *Gamma Irradiation*

The exponentially growing MOLT-4 cells have been suspended at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL in a complete medium. Aliquots of 10 mL have been plated into 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc GmbH & Co., Wiesbaden, Germany) and irradiated using a <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray source with a dose-rate of 0.4 Gy/min. After the irradiation the flasks have been placed in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub> and the aliquots of the cells have been removed at various times after irradiation for analysis. The cells have been counted and cell viability was determined with the Trypan blue exclusion assay.

### *VA*

VA (Sigma-Aldrich) has been added into the cultivation flask for various time (1–120 h) in a final concentration of 0.5–10 mM. The VA (sodium salt, Sigma-Aldrich) was dissolved in phosphate-buffered saline solution (PBS) to a stock concentration of 100 mM and stored at –20°C.

### *In Vitro Clonogenic Survival Assay*

The survival curves have been generated using an *in vitro* clonogenic assay. The untreated control ( $10^2$ /mL) and the irradiated and treated MOLT-4 cells ( $10^2$ – $10^5$ /mL) have been mixed in the Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with a 0.9% methylcellulose, a 30% fetal calf serum. A total of 1 mL of the plating mixture has been dispersed into 35 mm tissue culture Petri dishes. The colonies (containing 40 or more cells) have been counted after 14 days of the incubation in 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> at 37°C and the curves have been generated. All semisolid cultures have been performed in duplicates. Two independent experiments (four measurements) have been performed.

### *CD7 Antibody, Apoptosis Detection*

For apoptosis detection we used APOPTTEST-FITC (Dako, Brno, Czech Republic). During apoptosis, cells expose phosphatidylserine at the cell surface. Annexin V is a phospholipid binding protein, which in the presence of calcium ions binds selectively and with high affinity to phosphatidylserine. For

detection of cell surface markers in MOLT-4 cells we used PE-conjugated anti-human CD7-PE (8H8.1, IgG2b-IM1429) 49) obtained from Immunotech (Marseille, France).

### *Flow Cytometric Analysis*

The ability of the cells to scatter light in a forward direction (FS) correlates with cell volume, while their ability to scatter light in side direction (SS) correlates with cell granularity. We analyzed VA-treated and irradiated cells for changes in the intensity of FS and SS as compared to untreated control cells. Flow cytometric analysis was performed on a Coulter Epics XL flow cytometer equipped with a 15mW argon-ion laser with excitation capabilities at 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL). A minimum of 10,000 cells was collected for each 2-color sample in a list mode file format. List mode data was analyzed using Epics XL System II software (Coulter Electronic).

### *Western Blotting*

At various time after VA treatment and radiation the MOLT-4 cells have been washed with a PBS. The lysates containing an equal amount of protein (30  $\mu$ g) have been loaded into an each lane of a polyacrylamide gel. After electrophoresis, the protein has been transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 and 5% nonfat dry milk and then incubated with primary antibody (p21—Sigma-Aldrich; acetylated histone H3 and H4, p53—Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA; p53 phosphorylated at serine 392 and lamin B—Calbiochem-Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) at 4°C overnight. After washing, the blots were incubated with secondary antibody (Dako) and the signal was developed with a chemiluminescence (ECL) detection kit (Boehringer, Boehringer Ingelneim, Germany).

### *Statistical Analysis*

The results have been statistically evaluated with a Student's *t*-test. The values represent the mean  $\pm$  SD (a standard deviation of the mean). The statistical significance of the difference of means in comparable sets is indicated.

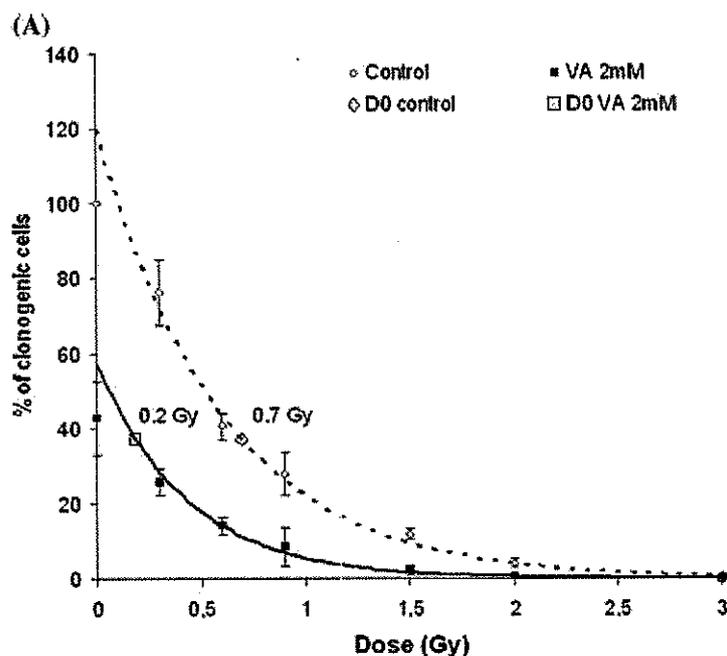
## **RESULTS**

### *Clonogenicity*

The cells have been cultivated with 2 mM VA for 3 days before the irradiation and 14 days later we determined the colony-forming efficiency. The  $D_0$  value

(the dose reducing cell survival to 37%) decreased from 0.7 Gy (control) to 0.2 Gy (precedent treatment with 2 mM VA) (FIG. 1 A).

The cells were irradiated with the dose of 1 Gy and the colony-forming efficiency in the continual presence of VA during 14 days was established. The EC70 value (the concentration after which 70% of cells retain their clonogenic capacity and form colonies) decreased from 0.97 mM in the case of cultivation with alone VA to 0.38 in the case of treatment with precedent irradiation (FIG. 1 B).



**FIGURE 1. (A)** The effect of 72-h-long incubation with 2 mmol/L VA and consecutive irradiation on clonogenic survival of MOLT-4 cells. For the clonogenic survival data, each point is a mean of four measurements from two experiments  $\pm$  SD. The clonogenicity test has been started immediately after the end of the irradiation. Equations of generated curves: Control:  $y = 119.54e^{-1.6941x}$  ( $R^2 = 0.9936$ ); VA:  $y = 57.348e^{-2.3473x}$  ( $R^2 = 0.9868$ ). **(B)** The effect of irradiation by the dose of 1 Gy on clonogenic survival of MOLT-4 cells in continuous presence of VA. For the clonogenic survival data, each point is a mean of four measurements from two experiments  $\pm$  SD. The clonogenicity test has been started immediately after the end of the irradiation and the cells were cultivated in medium containing VA. Equations of generated curves: Control:  $y = -0.8304x^3 + 9.8211x^2 - 37.134x + 42.75$  ( $R^2 = 1$ ); 1 Gy:  $y = 4.5384x^3 + 12.842x^2 - 87.525x + 98.707$  ( $R^2 = 0.9921$ ).

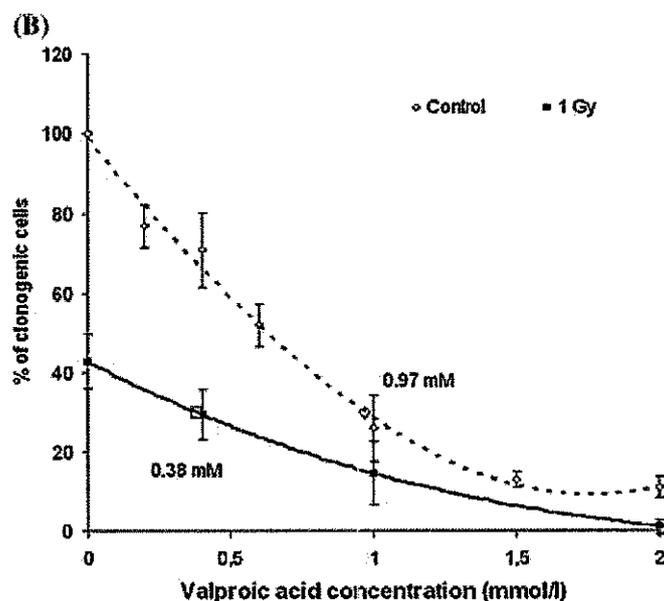


FIGURE 1. Continued.

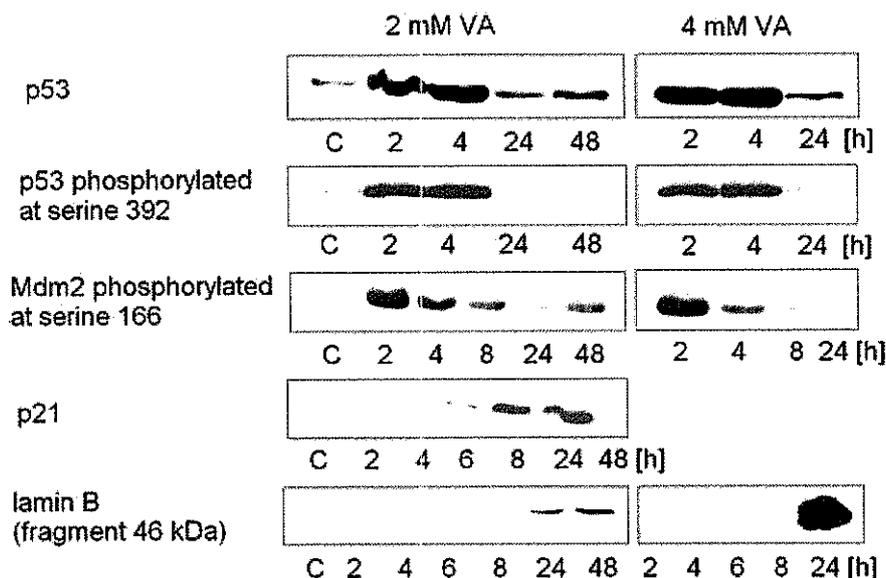
### *Electrophoresis and Western Blotting*

FIGURE 2 shows changes in protein expression after treatment with VA. The addition of 2 mM and 4 mM VA to MOLT-4 culture provoked in both the cases elevated expression of protein p53 in wild form as well as its phosphorylation at serine 392 in a short period of treatment. Elevated level of protein p53 induced consequently the upregulation of p21, but only after treatment with 2 mM, when probably the injury is not lethal and the cell undergoes repair processes during arrest in G1/S phase. After treatment with 4 mM VA we did not record increased p21 expression, the damage is more extensive and the cell seems to start apoptosis directly without any effort of reparation.

In a later period the acetylation of nuclear histones H3 and H4 proceeded. Histone H4 was more sensitive to the action of VA, its acetylation occurred already 24 h after 0.5 mM VA addition. Histone H3 required at least 2 mM concentration for 24 h to be acetylated (FIG. 3). The cleavage of lamin B as a proof of apoptosis occurred after 4 mM VA treatment, a fragment with molecular weight 46 kDa appeared 24 h after the beginning of incubation (FIG. 2).

### *Flow Cytometric Analysis*

Both irradiation of MOLT-4 cells by the dose of 1 Gy and incubation with 0.5 mM VA caused apoptosis induction and increase of number of cells of



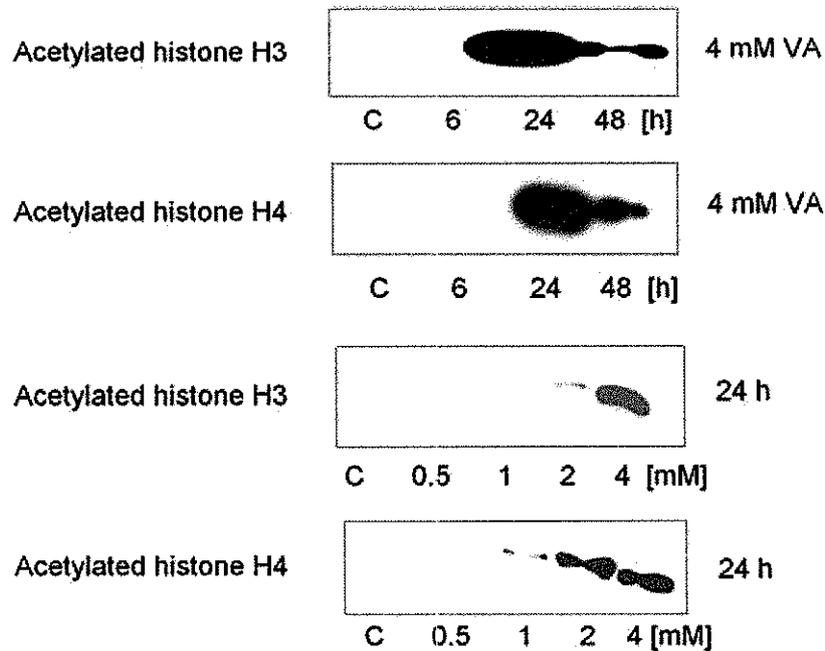
**FIGURE 2.** The effect of VA on the expression of protein p53 (wild form as well as phosphorylation at serine 392) and induction of protein p21. MOLT-4 cells were incubated with 2 mM and 4 mM VA for indicated periods, washed with PBS and lysed. SDS-PAGE and Western blotting were performed.

smaller size and increased granularity. After the irradiation maximal increase of this subpopulation could be seen on days 1 and 3, during later intervals the number of cells with low SS and high FS significantly decreased back to control level. Incubation with VA caused slow increase of number of apoptotic cells with maximum on day 14. In the case of combined effect of irradiation and VA synergic effect of both factors could be seen (FIG. 4).

It is apparent from the figure that the combination of irradiation by the dose of 1 Gy and 0.5 mM VA had synergic effect from the point of view of apoptosis induction. While during first 3 days after irradiation the main inductor of apoptosis was ionizing radiation, on day 6 both factors contributed equally to apoptosis induction and on day 14 most of the cells in group treated by combination of 1 Gy + 0.5 mM VA were apoptotic. (FIG. 5 A and B).

## DISCUSSION

In our study we proved that combination of VA and ionizing radiation decreases clonogenic survival of the leukemic cells when VA is applied before as well as after the irradiation. During continuous cultivation (14 days) with VA after the irradiation even relatively low concentrations of VA were effective. During 14-days long cultivation of MOLT-4 cells with 0.5 mM VA after the

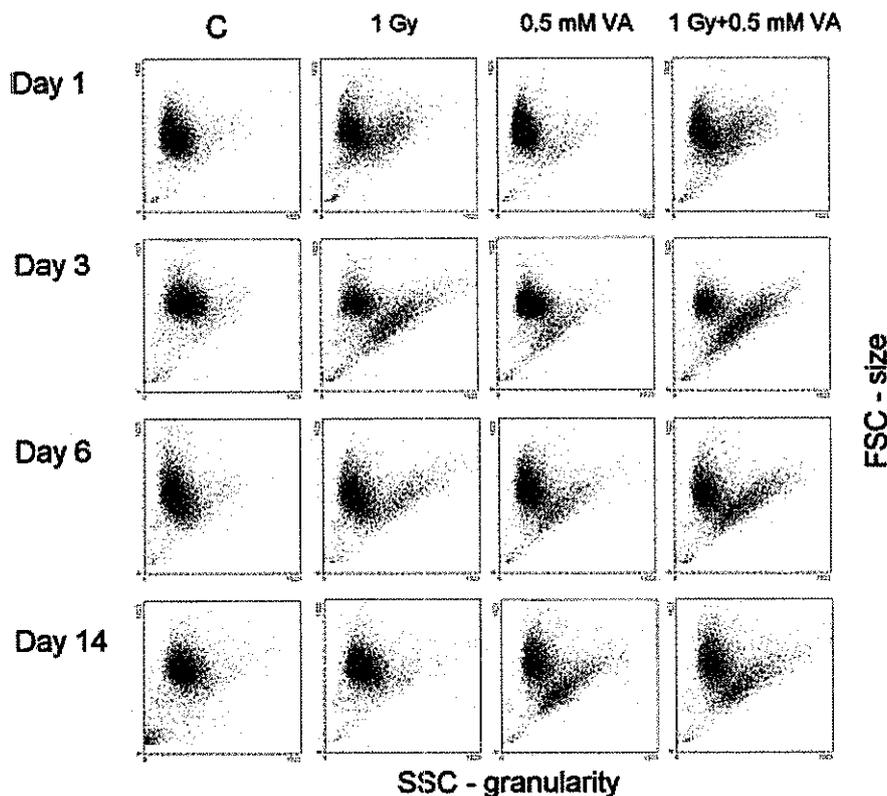


**FIGURE 3.** The time and dose response of acetylation of nuclear histones H3 and H4. MOLT-4 cells were treated with 4 mM VA for indicated period (time response) and with different concentrations of VA for 24 h (dose response). Immunoblots were performed.

irradiation by the dose of 1 Gy apoptosis induction is significantly increased in comparison to only irradiated cells, where 14 days after the irradiation by the dose of 1 Gy only live cells are detected. Similar effect was described by Kim *et al.*<sup>13</sup> during their studies of combined effect of TSA and ionizing radiation at glioma cells.

Mechanism of joint action of VA and ionizing radiation still remains an open question—it can include interactions with repair mechanisms or transduction cascade signals. VA chemically belongs to the group of short chain carboxylic acids, such as butyrate or phenylbutyrate. Similarly as most of HDACI<sup>15</sup> VA causes acetylation of histones H3 and H4.<sup>16</sup> Also in our work with leukemic cells we proved this acetylation, but not before 24-h long incubation, while increased levels of p53 and phosphorylation of p53 on serine 392 we detected already 2 and 4 h after the beginning of the incubation. A total of 24 h after the beginning of incubation the changes of p53 disappeared. Changes of p53 therefore precede changes observed on histones. These results were agreeing for both concentrations of VA—2 and 4 mM.

Under normal circumstances p53 is quickly degraded by ubiquitination catalyzed by Mdm2 protein. It seems that phosphorylations of p53 caused by



**FIGURE 4.** Flow cytometric analysis of light scattering properties of MOLT-4 leukemia cells. Intensity of light scattered in forward direction correlates with cell size, side scatter correlates with granularity. Abundance of apoptic cells reaches the maximum from 3–6 days after irradiation with the dose of 1 Gy, in cells treated with 0.5 mM VA the peak appears later, in the case of cells treated with combination, the effects of both the two insults are potentiated.

ionizing radiation prevent binding of Mdm2 to p53 and therefore decrease p53 degradation and simultaneously they enable p53 acetylation. Acetylation protects p53 from export into the cytoplasm and from degradation, as it blocks ubiquitin binding sites.<sup>17</sup> Pretreatment of cells with TSA presumably enhances the p53 mechanism and radiosensitizes tumor cells.<sup>13</sup> Contrarywise, presence of Mdm2 induces HDAC1 activity, which cleaves acetyl residues from the ubiquitin binding sites, which enables p53 degradation.<sup>10</sup> In our experiments we evaluated activating phosphorylation of Mdm2 on serine 166 and we obtained similar results as in the case of phosphorylation of p53.

At different tumor cells, even those lacking functional p53, an increase of p21 was found 6–24 h after beginning of HDACI treatment.<sup>7,8</sup> Also at MOLT-4

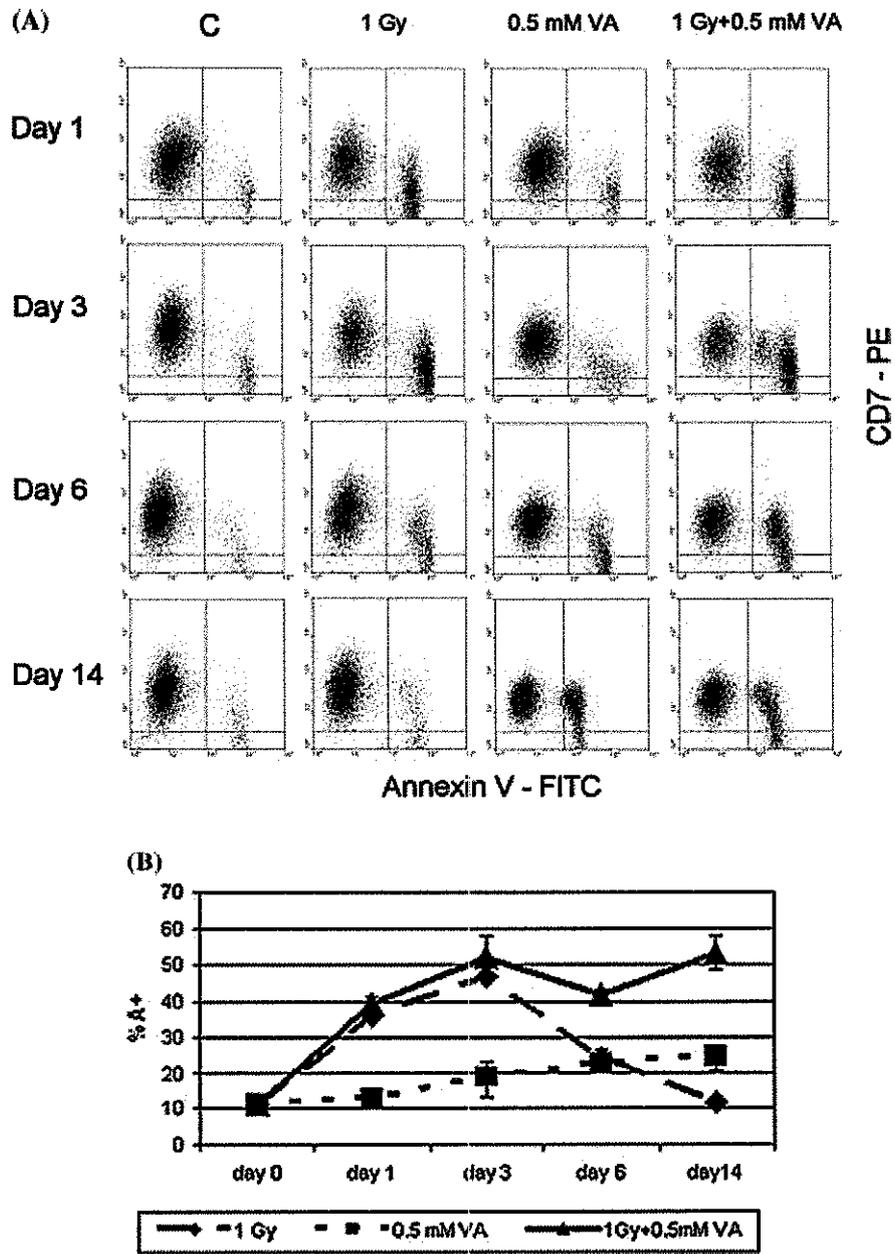


FIGURE 5. (A, B): Percentage of annexin V positive cells. MOLT-4 cells were irradiated with 1 Gy or treated with 0.5 mM VA or with combination of both factors. In indicated time periods cells of three groups were analyzed by flow cytometric analysis.

cells after incubation with 2 mM VA. expression of p21 was observed already 6 h after the beginning of the cultivation. The increase of p21 reached its maximum after 24 h of treatment, after 48 h it was normalized again, and no p21 was detected during incubation with 4 mM VA. Importance of p21 is in cell cycle arrest in G1 phase and is therefore related to cytostatic effect VA. Longer time of cultivation or higher doses of VA induce apoptosis, which is p21 independent. The question remains, whether the p21 expression after treatment of leukemic cells by VA is related to increased expression and phosphorylation of p53, as it was also proved after HDACI treatment of cells lacking p53.<sup>18,19</sup>

Munshi *et al.*<sup>14</sup> proved acetylation of histone H4 after exposure to NaB in both, melanoma cell lines and normal fibroblasts. However, a radiosensitizing effect of NaB they proved only at melanoma cell lines. Therefore it seems that radiosensitizing effect is not dependent on histone acetylation status. They also do not link radiosensitizing effect with changes of cell cycle distribution and in p21 expression, which are apparent in both, melanoma cells (p53 mutant) and normal fibroblasts (p53 wild type). However, in melanoma cell lines they proved increase of proapoptotic protein Bax, which indicates amplification of mitochondrial pathway of apoptosis induction after combined effect of HDACI and ionizing radiation.

Reparation processes proceeding in response to ionizing radiation are of great importance in clonogenic survival of tumor cells after combined influence of HDACI and ionizing radiation. Some results suggest<sup>14</sup> that HDACI decrease reparative capacity of tumor cells. Phosphorylation of histone H2AX appears very early after irradiation at many tumor and nontumor cells. NaB alone does not cause phosphorylation of H2AX. When these cells are irradiated by the dose of 2 Gy after 24-h long preincubation with NaB, the phosphorylation of histone H2AX 30 min after irradiation is increased and also the duration of the phosphorylation is extended,<sup>14</sup> which proves decreased ability of the tumor cells to repair DSB. Some papers prove<sup>6</sup> increase of nuclear clusterin after incubation with HDACI. Nuclear clusterin is an ionizing radiation-inducible protein that binds Ku-70 (protein important in nonhomologous end joining reparation) and triggers apoptosis when overexpressed in tumor cells.<sup>20</sup> Thus it seems that radiosensitizing effect of HDACI is closely related to molecular mechanisms which decrease ability of the cells to repair DSB caused by ionizing radiation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Grant Agency of Czech Republic (Grant Project No. 202/04/0598) and Ministry of Education of Czech Republic (Project No. MSM 0021620820) for financial support.

## REFERENCES

1. BLAHETA, R.A. & J. CINATL, JR. 2002. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med. Res. Rev.* **22**: 492–511.
2. ŘEZÁČOVÁ, M., J. VÁVROVÁ, D. VOKURKOVÁ & D. ZÁŠKODOVÁ. 2006. Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **25**(1): 65–79.
3. SZKANDEROVÁ, S., J. VÁVROVÁ, M. ŘEZÁČOVÁ, *et al.* 2003. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia. Biol. (Praha)* **49**: 191–196.
4. VÁVROVÁ, J., M. MAREKOVÁ & D. VOKURKOVÁ. 2001. Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplasma* **48**: 26–33.
5. BAKKENIST C.J. & M.B. KASTAN. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499–506.
6. GLASER, K.B., M.J. STAVER, J.F. WARING, *et al.* 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.
7. GUI, C.-Y., L. NGO, W.S. XU, *et al.* 2004. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21<sup>WAF</sup> involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 1241–1246.
8. RICHON, V.M., T.W. SANDHOFF, R.A. RIFKIND & P.A. MARKS. 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21<sup>WAF1</sup> expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10014–10019.
9. APPELLA, E. & C.W. ANDERSON. 2001. Post-translation modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2764–2772.
10. ITO, A., Y. KAWAGUCHI, C.-H. LAI, *et al.* 2002. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J.* **21**: 6236–6245.
11. KAWAGOE, R., H. KAWAGOE & K. SANO. 2002. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and independent apoptotic signaling pathways. *Leuk. Res.* **26**: 495–502.
12. ROSATO, R. & S. GRANT. 2004. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **13**: 21–38.
13. KIM, J.H., J.H. SHIN & I.H. KIM. 2004. Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59**: 1174–1180.
14. MUNSHI, A., J.F. KURLAND, T. NISHIKAWA, *et al.* 2005. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res.* **11**: 4912–4922.
15. YOSHIDA, M., M. KIJIMA, M. AKITA & T. BEPPU. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**: 17174–17179.
16. GOTTLICHER, M., S. MINUCCI, P. ZHU, *et al.* 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**: 6969–6978.
17. CHEHAB, N.H., A. MALIKZAY, E.S. STAVRIDIS & T.D. HALAZONETIS. 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13777–13782.

18. VRANA, J.V., R.H. DECKER, C.R. JOHNSON, *et al.* 1999. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, c-Jun, and p21<sup>CIP1</sup>, but independent of p53. *Oncogene* **18**: 7016–7025.
19. BLAGOSKLONNY, M.V., R. ROBEY, D.L. SACKETT, *et al.* 2002. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest and cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **1**: 937–941.
20. LESCOV, K.S., D.Y. KLOKOV, J. LI, *et al.* 2003. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 11590–11600.

**11.4. Vávrová J, Janovská S, Řezáčová M, Hernychová L,  
Tichá Z, Vokurková D, Zášková D, Lukášová E:**

Proteomic analysis of MOLT-4 cells treated by valproic acid.

Molecular and Cellular Biochemistry **2007**;303(1-2):53-61



## Proteomic analysis of MOLT-4 cells treated by valproic acid

Jiřina Vávrová · Sylva Janovská · Martina Řezáčová ·  
Lenka Hernychová · Zuzana Tichá · Doris Vokurková ·  
Darina Zášková · Emilie Lukášová

Received: 6 February 2007 / Accepted: 14 March 2007 / Published online: 11 April 2007  
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

**Abstract** The effect of valproic acid (VA) on protein expression in human T-lymphocytic leukemia cells MOLT-4 was studied. VA is an inhibitor of histone deacetylases and has a potential use as antitumor agent in leukemia treatment. The authors in this work prove that 4 h long incubation with 2 mmol/l VA causes phosphorylation of histone H2A.X and its colocalization with 53BP1 in nuclear foci. Their co-localization is typical for DSB signaling machinery. These foci were detected in cells after 4 h exposure without increase of Annexin V positive apoptotic cells. Slight increase in apoptosis (Annexin V positivity) after 24 h is accompanied by more intensive increase in phosphorylation of H2A.X and also by formation of nuclear foci containing  $\gamma$ H2A.X and 53BP1. Treatment of cells with 2 mmol/l VA resulted in induction of apoptosis affecting about 30% of cells after incubation for 72 h. The changes in protein expression were examined

after cell incubation with 2 mmol/l VA for 4 h. Proteins were separated by two-dimensional electrophoresis and quantified using image evaluation system. Those exhibiting significant VA-induced abundance alterations were identified by mass spectrometry. Changes in expression of 22 proteins were detected, of which 15 proteins were down-regulated. Proteomic analysis resulted in successful identification of three proteins involving  $\alpha$ -tubulin 3, tubulin-specific chaperone and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F. Expression of seven proteins was up-regulated, including heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B. Identified proteins are related to microtubular system and hnRNP family. Suppression of microtubular proteins and changes of balance among hnRNPs can contribute to proliferation arrest and apoptosis induction.

**Keywords** Valproic acid · 2DE · Tubulin changes · Gamma H2A.X

J. Vávrová (✉) · S. Janovská · L. Hernychová ·  
Z. Tichá

Department of Radiobiology and Department of Molecular Pathology, School of Military Health Sciences Hradec Králové, University of Defense Brno, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic  
e-mail: vavrova@pmfhk.cz

M. Řezáčová · D. Zášková

Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

D. Vokurková

Institute of Clinical Immunology and Allergology, Faculty Hospital Hradec Králové, Hradec Kralove, Czech Republic

E. Lukášová

Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Brno, Czech Republic

### Introduction

Local architecture of chromatin is an important factor, which regulates the gene expression. Actively transcribed genes generally have highly acetylated core histones. On the other hand, deacetylation of histones is related to gene silencing and repression of transcription. Acetylation of histones is regulated by two families of enzymes: histone acetyl-transferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC). Despite the fact that inhibitors of histone deacetylases (HDACI) are structurally different, they cause accumulation of acetylated histones in both, tumor and normal cells [1]. Possible hypothesis explains their anti-tumor effect by reactivation of expression of tumor-suppressor genes, which are often silenced in tumor cells.

Valproic acid (VA) is well established drug in treatment of epilepsy. As other HDACI it increases acetylation of core histones H3 and H4 [2, 3]. In MOLT-4 cells (human T-lymphocyte leukemia) we detected the acetylation of H3 and H4 only 24 h after the beginning of treatment [1]. Acetylation of H4 was increased even by 0.5 mmol/l VA, while lowest concentration of VA which increased acetylation of H3 was 2 mmol/l. 2 mmol/l VA has cytostatic effect on MOLT-4 cells, after incubation for 2 h and 4 h with 2 mmol/l VA an increase in p53 and its phosphorylation on serine 392, was observed followed by increase in p21 after 8 h from the beginning of incubation [4]. These molecular processes are then followed by the decrease in number of cells in S phase of the cell cycle and by colony-forming efficiency, EC50 value calculated for 72 h long exposure of MOLT-4 cells to VA is 1.76 mmol/l [5]. Three days long incubation with 2 mmol/l VA induced the significant apoptosis in MOLT-4 cells (detected by Annexin V binding). 4 mmol/l VA induced the apoptosis very quickly without previous increase of p21 and during 72 h almost all cells were apoptotic (binding Annexin V) [5].

Glaser et al. [6] studied gene expression at tumor cell lines T24 bladder and MDA breast carcinoma after treatment with three HDACI: SAHA, TSA and MS-275. Despite the widely different structure of all the three HDACIs used, the changes in gene expression were very similar, which shows that these changes are related with mechanism of action of the studied substances and not with their structure. Only 13 genes (less than 10% of studied genes) were changed – expression of five genes decreased and eight increased. One of the genes whose expression increased was the gene for p21. Also other regulator of cell cycle–p27–increased in response to HDACI. Also Ragione et al. [7] proved (using DNA micro-array method) that HDACI affect only a small number of genes (1–7%) at colon carcinoma cell line HT-29. They compared changes of gene expression after exposure to two HDACI – butyrate and TSA. They also found that both agents influence identical gene groups, indicating the importance of the inhibition of HDAC. Decreased expression was found only in two genes, lactoferrin  $\delta$  and MAPKAP kinase, other 21 genes showed increased expression. A number of genes with increased expression (tob-1, GATA-2, GADD45, PKC  $\delta$ ) controls cell cycle regulation, signal transduction, DNA reparation and genome transcription. Expression of two of these genes – GATA-2 and tob-1 – increased more than 10 fold. GATA-2 is nuclear transcriptional factor, which is released in large quantities during tissue differentiation of cells. GATA protein level increase was also confirmed after incubation with butyrate. Second analyzed gene tob-1 is antiproliferative factor related to terminal differentiation of muscle cells, which was also found to be increased during osteoblasts differentiation [8].

During experiments analyzing gene changes in response to HDACI, it was found that some differences exist between different HDACI. It was proved that some MS-275-induced gene changes are different compared to changes induced by TSA and SAHA. MS-275 does not cause accumulation of acetylated tubulin alpha and also has no affect on cell cycle regulator tob-1. Acetylation of tubulin is probably regulated by HDAC 6. Differences of the effect of particular HDACI on this deacetylase can be important for changes in expression of some genes [6].

In response to double strand breaks of DNA (DSB) caused by ionizing radiation a rapid phosphorylation of histone H2A.X on serine 139 occurs, which enables formation of nuclear foci, responsible for radiation damage repair [9]. H2A.X phosphorylation is catalyzed by ATM kinase. DSBs are also formed during terminal phases of apoptosis, when chromosomal DNA is cleaved to oligonucleosomal fragments. Mukherjee et al. [10] proved that while ATM kinase is degraded during apoptosis before fragmentation of DNA, DNA-PKcs is activated by autophosphorylation on serine 2056 and catalyses phosphorylation of H2A.X in late phases of apoptosis.

In this study we have applied a proteomic approach to determine quantitative changes in protein composition after incubation of MOLT-4 cells with 2 mmol/l VA for 4 h. In this time the formation of foci of phosphorylated H2A.X with 53BP1 were detected without increase of apoptotic cells positive for Annexin V (A+).

## Material and methods

### Cell culture and culture conditions

MOLT-4 cells were obtained from American Type Culture Collection (University Blvd., Manassas, USA). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) supplemented with 20% fetal calf serum (PAA Laboratories GmbH, Austria), 2 mM glutamine (Sigma), 100 UI/ml penicillin (Sigma) and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma) at 37°C, controlled 5% CO<sub>2</sub> and humidified atmosphere. The cultures were divided every 2nd day by dilution to a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml. Cell counts were detected with a hemocytometer, cell membrane integrity was determined using the Trypan Blue exclusion technique. Cells in the maximal range of 20 passages were used for this study.

### Incubation of cells with VA

VA (Sigma) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) to achieve stock solution of 1 mol/l and stored at –20°C until use. Cells in exponential growth were seeded at  $2-4 \times 10^5$ /ml in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks and

supplemented with 2 mmol/l VA. Cells were harvested, washed and used for other assays in desired intervals.

#### Flow cytometric analysis and Apoptosis detection

The ability of cells to scatter light in a forward direction (FS) correlates with cell volume, while their ability to scatter light in side direction (SS) correlates with cell granularity. We analyzed VA-treated cells for changes in the intensity of FS and SS as compared to untreated control cells. For apoptosis detection we used Apoptest-FITC kit (DakoCytomation, Brno, Czech Republic). During apoptosis, cells expose phosphatidylserine at the cell surface. Annexin V (A) is a phospholipid binding protein which, in the presence of calcium ions, binds selectively and with high affinity to phosphatidylserine. Cells with permeable cell membrane (late apoptotic or necrotic) were detected by propidium iodide (PI) staining.

Flow cytometric analysis was performed on a Coulter Epics XL flow cytometer equipped with a 15 mW argon-ion laser with excitation capabilities at 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). A minimum of 10,000 cells was collected for each 2-colour sample in a list mode file format. List mode data were analyzed using Epics XL System II software (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA).

#### Immunocytochemistry

The cells were fixed with 4% freshly prepared paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT), rinsed quickly in PBS, than washed 3 × 5 min in PBS, permeabilized in 0.2% Triton X-100/PBS for 15 min at RT, rinsed in PBS and washed 2 × 5 min. Before incubation with primary antibodies (overnight at 4°C), the cells were blocked with 7% inactivated FCS + 2% bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature (RT). Antibodies from two different hosts (rabbit and mouse) were used in each slide to detect two different antigens in the same nuclei. For detection of  $\gamma$ H2A.X, mouse monoclonal anti-phospho-Histone H2A.X (Upstate) and for detection of 53BP1 rabbit polyclonal antibody (CellSignalling) were used. Secondary antibodies: Affinity pure donkey anti-mouse-FITC-conjugated and affinity pure donkey anti-rabbit-Cy3-conjugated were purchased from Jackson Laboratory, (Bar Harbor, ME). The mixture of both antibodies was applied to each slide (after their pre-incubation with 5.5% of donkey serum in PBS for 30 min at RT) and incubation for 1 h in dark succeeded by washing (3 × 5 min) in PBS. Counterstaining was performed by TOPRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) in saline sodium citrate prepared fresh from the stock solution.

Images were obtained by high-resolution confocal cytometer based on a completely automated Leica DM RXA fluorescence microscope equipped with CSU-10a confocal unit (Yokogawa, Japan) and a CoolSnap HQ charged-coupled device camera (Photometrix, Melbourne, Australia). Forty optical sections at 0.3  $\mu$ m sections were acquired for each nucleus and stored in the computer memory. The exposition time and dynamic range of camera in the red, green and blue channels were adjusted to the same values for all slides to obtain quantitatively comparable images. Integral optical density was measured using image analysis software ImagePro 4.11 (MediaCybernetics, USA).

#### Western blotting

MOLT-4 cells were washed with a PBS at various times after treatment with VA. The lysates containing an equal amount of protein (30  $\mu$ g) were loaded into each lane of a polyacrylamide gel. After electrophoresis, the separated proteins were transferred to a PVDF membrane. The membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and 5% non-fat dry milk and then incubated with primary antibody (gamma H2A.X, Cell Signaling) at 4°C overnight. After washing, the blots were incubated with secondary antibody (Dako) and the signal was developed with a chemiluminescence (ECL) detection kit (Boehringer).

#### Sample preparation for 2-DE

The extraction of nuclear protein from MOLT-4 cells for 2-D sample preparation was carried out using the kit from Pierce (Rockford, IL). Briefly, nuclear extracts were desalted using spin columns pre-equilibrated in 2-D sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS). After desalting, 2 mM TBP and 1% carrier ampholytes pH 4–7 were added to nuclear samples.

#### 2-DE

Commercial strips with nonlinear immobilized pH 4–7 gradient were used for first dimension-IEF. The samples containing 75  $\mu$ g of nuclear proteins were loaded by in-gel dehydration onto commercial strips. The separation was carried out using Multiphor II apparatus (Amersham Pharmacia Biotech) overnight (100 kVh, 20°C). Immediately after being focused, isofocusing gels were equilibrated for 15 min in 6 M urea, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol and 1% DTT, then for 15 min in the same solution except that DTT was replaced with 5% w/v iodoacetamide. In the second dimension, 9–16%

gradient SDS-PAGE was used. The gels were cast in a Protean™ Multi-Gel Casting Chamber and SDS-PAGE was performed using a Protean™ 2-D Multi-Cell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) at 40 mA per gel for 5 h. Proteins were visualized by silver staining [11], and silver-stained gels were digitized using a CCD camera (Image Station 2000R, Eastman Kodak, Rochester, NY).

#### Analysis of gel images

The computerized image analysis was carried out using a Melanie 3 software package (Bio-Rad). Proteins separated by 2-DE were quantified in terms of their relative spot volumes (%vol) i.e., digitized staining intensity integrated over the area of an individual spot divided by the sum of integrated staining intensities of all spots and multiplied by 100. The quantitative data from three independently prepared samples were analyzed with Student *t*-test software for determination of significant differences at the levels of  $P < 0.05$ .

#### In-gel digestion

For the micropreparative 2-DE, 500 µg of protein was loaded on isofocusing strips. Selected spots stained with Colloidal Blue Staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) were excised and covered with 200 µl of 100 mol/l Tris/HCl (pH 8.5) in 50% acetonitrile for 20 min at 30°C. Then, 200 µl of equilibration buffer (50 mmol/l ammonium bicarbonate, pH 7.8, in 5% acetonitrile) was added to the gel pieces. The gel pieces were subsequently vacuum dried, swollen at 4°C in a mixture consisting of 0.1 µg of sequencing grade trypsin in 0.5 µl of 50 mM acetic acid (Promega, Madison WI) and 4.5 µl of equilibration buffer. After 20 min, 15 µl of equilibration buffer was added. The tubes with gel pieces were mildly shaken overnight at 37°C.

#### Mass spectrometry

For each protein, 1 µl of peptide mixture was spotted onto the target plate, air-dried and covered with 1 µl of matrix solution (2,5-dihydroxybenzoic acid, 50 mg/ml in 33% acetonitrile, 0.3% trifluoroacetic acid). The mass spectra were recorded with a MALDI mass spectrometer Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) equipped with delayed extraction. External calibrations were carried out with standards – angiotensin I, angiotensin II, adrenocorticotrophic hormone (clip 1–17) and (clip 18–39) (Laser Bio Labs, France) covering the 1000–2500 Da mass range. The mass spectra were evaluated by Data Explorer program (Voyager™ 5.1 Software with Data Explorer,

Applied Biosystems). Proteins were identified by peptide mass fingerprinting using MS-FIT algorithm of ProteinProspector program (Version 3.4.1., University of California, San Francisco Mass Spectrometry Facility).

## Results

#### Apoptosis and DNA damage

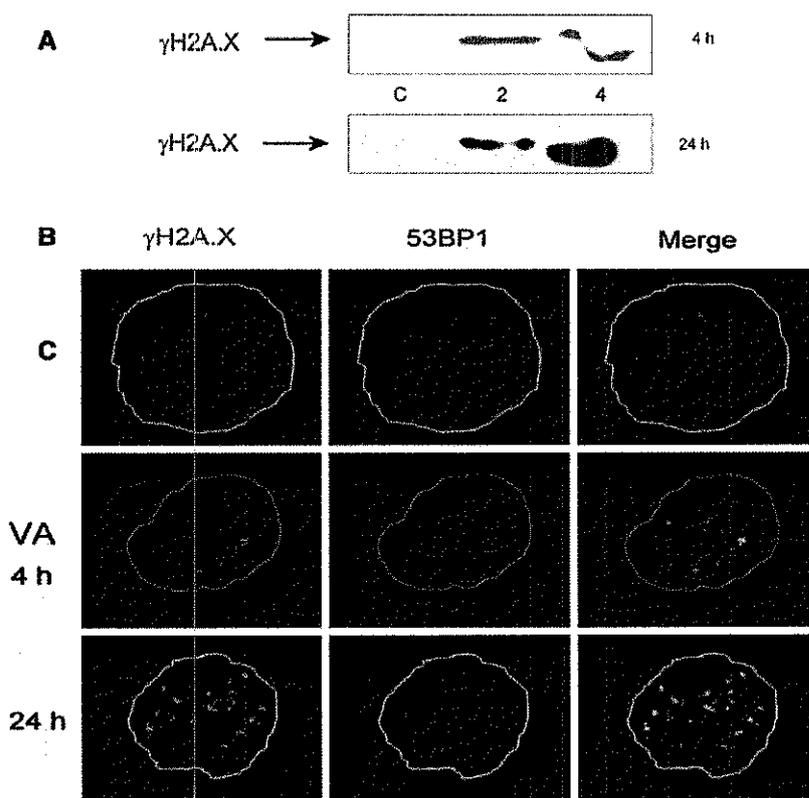
DNA damage of MOLT-4 cells after 4h incubation with 2 mmol/l VA was detected by phosphorylation of histone H2A.X on serine 139 by both western blot and immunocytochemistry. Confocal microscopy of immunostained phosphorylated proteins H2A.X and 53BP1 in individual cells revealed formation of protein foci containing both of these proteins. Their co-localization is typical for DSB signaling machinery. Similar effects were observed in cells incubated for 24 h (Fig. 1). The presence of these foci in cells exposed to VA indicates effect of this agent on DNA damage.

Using Annexin V (A<sup>+</sup>), slight increase of apoptosis can be detected after 24 h of treatment of MOLT-4 cells with 2 mmol/l VA. In control cells 8.5% was A<sup>+</sup> and 2.8% was simultaneously A<sup>+</sup> and PI<sup>+</sup> (A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>); in cells incubated with VA for 24 h, 16.2% was A<sup>+</sup> and 10.1% A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>. The number of apoptotic cells increased with time of there exposure to VA. After 72 h 30.8% of the cells were A<sup>+</sup> and 6.8% A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>.

#### Proteomics analysis of VA-treated MOLT-4 cells

For proteome studies we chose cells exposed to 2 mmol/l VA for 4 h as in this interval increase of apoptosis detected by Annexin V and PI penetration into the cell was not observed (Control cells 8.5% A<sup>+</sup>, 2.8% A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>; VA 4 h 9.7% A<sup>+</sup>, 2.3% A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). The protein patterns of these cells and control MOLT-4 cells were compared. Protein maps obtained by high-resolution two-dimensional electrophoresis were evaluated using comparative image analysis. Three parallel gels of each treatment were analyzed. Comparative analysis of 2-D protein patterns revealed 22 protein spots exhibiting significant abundance alterations induced by VA. The positions of these protein spots are shown in the representative silver-stained gel in Fig. 2. Of these 22 protein spots, 15 exhibited statistically significant down-regulated expression and seven of them were completely inhibited by VA (boxed on Fig. 2). Additional seven protein spots manifested significant up-regulation of expression after exposure of MOLT-4 cells to 2 mmol/l VA for 4 h. The relevant protein spots were isolated from the gel and analyzed by peptide mass fingerprinting. Up to

**Fig. 1** Phosphorylation of histone H2A.X on serine 139 in MOLT-4 cells incubated for 4 h and 24 h with VA. (A) Western blot analysis of  $\gamma$ H2A.X in the lysates of MOLT-4 cells treated with VA of 2 and 4 mmol/l for 4 and 24 h. Antibody specific for H2A.X phosphorylated on serine 139 was used for detection. C- lysates from control cells non treated with VA. (B) Examples of nuclei of MOLT-4 cells treated with 2 mmol/l VA for 4 and 24 h, fixed, and co-immunostained with antibodies against  $\gamma$ H2A.X and 53BP1. Cell nuclei are marked by solid line



now, only four proteins have been successfully identified (Table 1). Peptide mass fingerprinting spectrum of one of the successfully identified proteins is shown in Fig. 3.

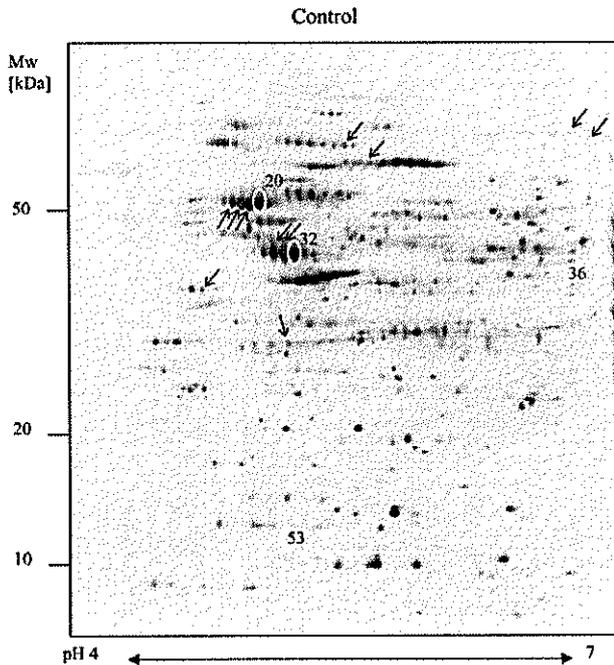
Three of these proteins exhibited VA-induced decrease in protein abundance. This group involved alpha-tubulin 3, tubulin-specific chaperone A and heterogenous nuclear ribonucleoprotein F. Other identified protein, heterogenous nuclear ribonucleoprotein AB, showed VA-induced up-regulation. Representative sections of 2-DE images showing differences in the protein expression level of spots exhibiting significant abundance alterations after VA treatment are shown in Fig. 4.

## Discussion

Tumor cells, in comparison to normal cells, have increased activity of HDAC. This facilitates deacetylation of histones and transcription regulators and probably affects expression of antitumor genes. All inhibitors of HDAC shift the balance towards acetylation of histones H3 and H4, however, their selectivity for inhibition of particular HDACs and overall effect on protein expression are not yet fully elucidated. Glasser et al. [6] studied effect of HDAC inhibitors MS-275 and SAHA *in vitro* and they did not prove selectivity in HDAC inhibition. Phiel et al. [12]

proved that VA *in vitro* inhibits activity of human HDAC1 in concentration  $IC_{50} = 0.4$  mmol/l. For further evaluation of affinity of VA to various HDACs, nuclear extract from HeLa cells containing HDAC 1, 2, 3, 4 and 8 has been used. The effect of VA on other HDACs was comparable to inhibition of HDAC1. However, the question of *in vivo* selectivity is still open. VA has teratogenic effect, which is probably dependent on the HDAC inhibition, similarly as teratogenic effect of TSA.

As we shown recently [5], VA in concentrations 1–2 mmol/l has mainly cytostatic effect for MOLT-4 cells (T-lymphocyte leukemia), it inhibits proliferation rate and reduces number of cells in S phase. Most studies [6, 7] analyzed changes of gene expression after 24 h-long incubation with HDAC inhibitor and found that relatively few genes (less than 10%) are affected. In this study we show that 24 h-long incubation of MOLT-4 cells with 2 mmol/l VA induces apoptosis, while the number of apoptotic cells detected after shorter time of incubation (4 h) is minimal and comparable to that in control cells. However, using the immunolabeling of phosphorylated H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) and 53BP1, we could detect changes in chromatin structure after this short time of incubation with VA, similar to those induced by ionizing radiation [13]. These changes consist of foci formation in which  $\gamma$ H2A.X colocalises with 53BP1. These  $\gamma$ H2A.X foci represent



**Fig. 2** The representative 2-D silver-stained protein pattern of human T-lymphocyte leukemia MOLT-4 cells separated in gradient of pH 4–7. Separation in the second dimension was performed using a polyacrylamide gradient (9–16%). Changes in expression of 22 proteins were detected. 15 protein spots exhibiting statistically significant changes after the exposure to 2 mM VA for 4 h are marked by arrows (not identified) and circles (identified). Expression of 7 proteins was completely inhibited by VA and therefore the significance could not be statistically evaluated. These proteins are boxed

reaction to DNA DSBs induced in MOLT-4 cells by VA. This supposition is supported by our recent finding that incubation of MOLT-4 cells with 2 mmol/l VA for 4 h triggers phosphorylation of p53 on serine 392 and phosphorylation of Mdm2 on serine 166 [4].

It has been described by many studies [9, 14, 15] that one of the earliest responses of eukaryotic cells to DNA

DSB induced by ionizing radiation is the phosphorylation of histone H2A.X on serine 139. This modification occurs in chromatin flanking DSB within minutes after the irradiation. H2A.X phosphorylation is accomplished by ATM kinase activated by chromatin changes in the sites of DSB [16] quickly after DNA damage and triggers down-stream pathways of repair and/or cell death. At this time various other proteins are recruited to these sites, forming intranuclear “ionizing radiation inducing foci” (IRIF) [9]. The most important function of IRIF is repair of radiation-induced damage of DNA. Significant decrease of number of initially formed IRIF detected by cytochemical evaluation in live cells is apparent during 24 h after the irradiation. However, our results show large number of cells containing  $\gamma$ H2A.X foci colocalizing with 53BP1 after incubation with 2 mmol/l VA for 24 h. Phosphorylation of H2A.X in the sites of DNA fragmentation during apoptosis was recently suggested [10]. The authors [10] show that  $\gamma$ H2A.X occurs simultaneously with apoptotic DNA fragmentation and is limited to nuclei with condensed chromatin. They found that H2A.X phosphorylation during apoptosis is catalyzed by DNA-PKcs, while ATM is dispensable for the process.

Treatment of MOLT-4 cells with 2 mmol/l VA show slight increase of apoptosis after 24 h of incubation, and its further intensification during 72 h. Therefore, increasing number of cells containing foci of  $\gamma$ H2A.X detected 24 h after beginning incubation of cells with VA is very probably related to the progression apoptosis rather than to direct damage of DNA by VA.

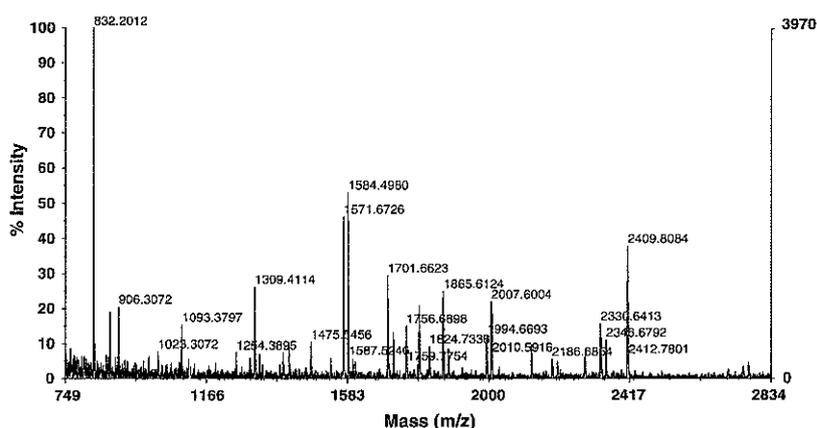
Owing to very early changes in MOLT-4 cells exposed for 4 h to VA we suppose that the changes in proteome found in these cells are not yet significantly influenced by apoptosis. Using analysis of two-dimensional electrophoretic maps we observed that down-regulation of proteins prevailed upon up-regulation. We detected significant decrease or complete disappearance of 15 protein spots. Three of these proteins were identified using mass

**Table 1** Identified proteins exhibiting significant alterations in abundance induced by VA

Spot no.	Name	Accession no.	Sequence coverage	No. of peptides	Mw (kDa)/ theoret. pI	Database/program	Change
20	Tubulin alpha-3 chain (Alpha-tubulin 3)	Q71U36	38%	14	50.1/4.9	Swiss Prot / Protein Prospector	↓
32	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F)	P52597	21%	7	45.5/5.4	Swiss Prot / Protein Prospector	↓
36	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB, isoform b	13905354	21%	6	30.6/7.7	NCBI / Protein Prospector	↑
53	Tubulin-specific chaperone A	O75347	18%	4	12.7 / 5.3	Swiss Prot / Protein Prospector	↓

The table summarises data of identified proteins, which exhibit statistically significant alterations in abundance caused by 4h-long cultivation of MOLT-4 cells with 2mmol/l VA. The proteins have been successfully identified by MALDI-TOF MS

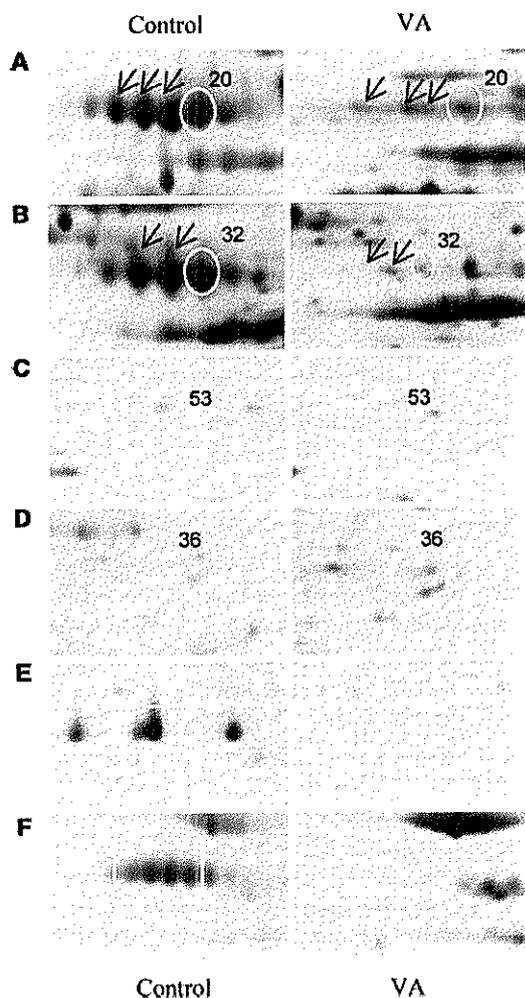
**Fig. 3** Representative MALDI-MS spectrum of one protein identified as tubulin alpha-3 chain



spectrometry. Two of down-regulated proteins are related to microtubules: alpha-tubulin 3 and tubulin-specific chaperone A. Tubulin is ubiquitously present in eucaryotic cells and undergoes reversible assembly to form microtubules. This dynamic system is essential for cellular functions such as mitosis, transport and cell motility. HDAC inhibitors have been shown to increase acetylation of tubulin. This process is related mainly to inhibition of histone-deacetylase 6 (HDAC6) [17]. Some correlation has been found between  $\alpha$ -tubulin acetylation and microtubule stability; acetylated microtubules are more likely to resist drug-induced disassembly [18]. Blagosklonny et al. [19] studied effect of three HDAC inhibitors: TSA, sodium butyrate and depsipeptide on acetylation and polymerization of tubulin. Only TSA increased acetylation of tubulin after 1 h-long incubation. In our experiments with VA we did not detect increased acetylation of tubulin after treatment of MOLT-4 cells with VA (not published). Tubulin-specific chaperone A is the first component of the  $\beta$ -tubulin folding pathway. It stabilizes the  $\beta$ -subunit and probably acts as a reservoir of tubulin folding intermediates. Polymerization of tubulin is blocked by microtubular toxins, such as taxanes or taxanes. HDAC inhibitors studied by Blagosklonny et al. [19] did not affect ratio of soluble and insoluble tubulin. However, VA in concentration above 2 mmol/l inhibits assembly of bovine brain microtubular protein (comprised of 85% tubulin and 15% microtubule-associated proteins) into microtubules [20]. We speculate that down-regulation alpha-tubulin 3 and tubulin-specific chaperone A could result in inefficient microtubule assembly and contribute to growth inhibition of MOLT-4 cells caused by 2mmol/l VA. It is not yet clear whether this process is also affected by deregulation of tubulin.

Other two identified proteins affected by VA are members of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family. These proteins bind with pre-mRNA and mRNA and participate in a variety of nuclear events such as

transcriptional regulation, telomere length maintenance, immunoglobulin gene recombination, alternative splicing, and 3'-end processing. A subset of hnRNP proteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm playing various roles in mRNA export, cytoplasmic mRNA localization, translational regulation, and cytoplasmic mRNA degradation [21]. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) was down-regulated by VA, while heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B) was up-regulated. Both hnRNP F and hnRNP A/B control alternative splicing of pre-mRNA. Except splicing, hnRNP F also regulates polyadenylation and specifically recognizes poly(G) sequences. Splicing regulation executed by hnRNP F involves numerous pre-mRNAs, among others the Bcl-x. Bcl-x pre-mRNA can be alternatively 5'-spliced to produce the anti-apoptotic Bcl-x<sub>L</sub> protein or the pro-apoptotic Bcl-x<sub>S</sub> isoform. It has been found by Garneau et al. [22] that hnRNP F facilitates production of pro-apoptotic Bcl-x<sub>S</sub> isoform. At the cellular level, hnRNP F is, with few exceptions, predominantly expressed in the cytoplasm, while tumor tissues reveal a broad expression of hnRNP F in the nuclei as well as in the cytoplasm [23]. They also found hnRNP F down-regulated in hepatocellular carcinoma and up-regulated in gastric carcinoma. Balasubramani et al. [24] detected up-regulation of hnRNP F in colon cancer tissue and suggest hnRNP F expression as potential marker of progression of colorectal carcinoma. Out of all the member of the family, the expression profile of hnRNP A2/B1 in cancer tissues has been the most extensively studied, and in most tumors the expression of hnRNP A2/B1 is up-regulated [25]. In our study we detected decreased amount of hnRNP F and increased amount of hnRNP A/B after 4 h-long exposure of T-lymphocytic leukemia cells MOLT-4 to VA. Impairment of balance among particular members of hnRNP family and different splicing and translation of various other genes can offer a hypothesis of VA effect on proliferation and



**Fig. 4** Representative sectors of gels showing down-regulation of protein spots. No. 20, identified as alpha-tubulin 3, and of three other unidentified proteins (A); down-regulation of protein spot no. 32, identified as heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and of two other unidentified proteins (B); and down-regulation of protein spot no. 53, identified as tubulin-specific chaperone A (C). Expression of protein in spot no. 36 was up-regulated by VA. (D), and it was identified as heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB. Seven protein spots completely disappeared on all three parallel gels after exposure to VA. 3 of these proteins have MW about 10 kDa (E) and 4 of these proteins have MW about 90 kDa (F). We did not succeed to identify these proteins

differentiation of tumor cells. HDAC inhibitor sodium butyrate was also found to affect expression of hnRNPA1 at colorectal carcinoma cells HCT-116 [26]. Using 2-D electrophoresis the authors identified five protein spots related to hnRNPA1, two spots, corresponding to phosphorylated variant of hnRNPA1 (26 kDa), were up-regulated and other three (38 kDa) down-regulated. Tan et al. [26] also proved that these changes are related to growth inhibition and apoptosis induction caused by sodium butyrate at HCT-116 cells.

The results of this work show that incubation of leukemic cells with valproic acid changes expression of 22 proteins. Successfully identified proteins are related to microtubular system and hnRNP family. Studies are currently underway to identify further protein spots exhibiting significant abundance alterations after VA-treatment. Suppression of microtubular proteins and changes of balance among hnRNPs can contribute to proliferation arrest and apoptosis induction. Apoptosis induced by VA is linked with acetylation of histone H3 and H4, condensation of chromatin and fragmentation of DNA, which triggers H2A.X phosphorylation and assembly of protein complexes alerting the cell on this DNA damage threatening its viability.

**Acknowledgements** The authors thank to Grant Agency of Czech Republic (grant project no. 202/04/0598) and Ministry of Defense of Czech Republic (MOOFVZ0000501) for financial support.

## References

- Rosato RR, Grant S (2004) Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 13:21–38
- Gottlicher M (2004) Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann Hematol* 83:S91–S92
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P et al (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO* 20:6969–697
- Zášková D, Rezáčková M, Vávrová J et al (2006) Effect of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on cell death and molecular changes caused by low-dose irradiation. *Ann N Y Acad Sci* 1091:385–398
- Rezáčková M, Vávrová J, Vokurková D et al (2006) Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys* 25:65–79
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF et al (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
- Ragione FD, Criniti V, Pietra VD et al (2001) Gene modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 499:199–204
- Beck GR Jr, Zerler B, Moran E (2001) Gene array analysis of osteoblast differentiation. *Cell Growth Differ* 12:61–83
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R et al (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *Cell Biol* 173:195–206
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J et al (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2A.X during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 5:575–590
- Hochstrasser DF, Merril CR (1988) Catalysts' for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl Theor Electrophor*; 1:35–40
- Phiel CJ, Zhang FM, Huang EZ et al (2001) Histone deacetylase is direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276:36734–36741
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A et al (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151:1381–1390

14. Stiff T, ÖDriscoll M, Rief N et al (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2A.X after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 64:2390–2396
15. Banáth J.P, MacPhail SH, Olive PL (2004) Radiation sensitivity, H2A.X phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 64:7144–7149
16. Barma S, Chen BP, Murphy M et al (2001) ATM phosphorylates histone H2A.X in response to double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276:42462–42467
17. Hubbert C, Guardiola A, Shao R (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature (Lond)* 417:455–458
18. Takemura R, Okabe S, Umeyama T et al (1992) Increased microtubule stability and alfa-tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103:953–964
19. Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL et al (2002) Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 11:937–941
20. Cannell GR, Bailey MJ, Dickinson RG (2002) Inhibition of tubulin assembly and covalent binding to microtubular protein by valproic acid glucuronide in vitro. *Life Sci* 71:2633–2643
21. Kim VN, Dreyfuss G (2001) Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. *Mol Cells* 12:i–10
22. Garneau D, Revil T, Fiset JF et al (2005) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem* 280:22641–22650
23. Honore B, Baandrup U, Vorum H (2004) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp Cell Fes* 294:199–209
24. Balasubramani M, Day BW, Schoen RE et al (2006) Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogenous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. *Cancer Res* 66:763–769
25. Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A et al (2006) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochim Biophys Acta* 1765:85–100
26. Tan HT, Zubaidah RM, Ran S et al (2006) 2-D DIGE analysis of butyrate-treated HCT-116 cells after enrichment with heparin affinity chromatography. *J. Proteome Res* 5:1098–10106



**11.5. Řezáčová M, Zášková D, Vávrová J, Vokurková D,  
Tichý A:**

Antileukemic activity of the combination of ionizing radiation with valproic acid in promyelocytic leukemia cells HL-60.

Neoplasma 2008;6



## **Antileukemic activity of the combination of ionizing radiation with valproic acid in promyelocytic leukemia cells HL-60**

**M. Řezáčová<sup>1</sup>, D. Zášková<sup>1</sup>, J. Vávrová<sup>2</sup>, D. Vokurková<sup>3</sup>, A. Tichý<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Biochemistry and <sup>3</sup>Institute of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, and Faculty Hospital Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Radiobiology, School of Military Health Sciences Hradec Králové, University of Defense Brno, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové Czech Republic

Corresponding author: Martina Řezáčová, Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, PO BOX 38, Simkova 870, Hradec Kralove 1, 500 38, Czech Republic, [rezacovam@lfhk.cuni.cz](mailto:rezacovam@lfhk.cuni.cz)

### **ABSTRACT**

Valproic acid (VA) possesses anticonvulsant as well as anticancer properties of histone deacetylases inhibitor. Incubation of human promyelocytic leukemia cells HL-60 with VA leads to acetylation of nuclear histones H3 and H4. Using 2 mmol/l concentration we proved the expression of protein p21, which relates to the arrest of cell proliferation and decrease in number of cells in S phase of cell cycle. Treatment of HL-60 cells with VA causes their differentiation, proved as increase in CD11b expression. The most widely used method in cancer treatment is radiotherapy. 24 hours after irradiation by the therapeutical dose of 2 Gy, 56% of HL-60 cells are accumulated in G2 phase of cell cycle. VA had no influence on this accumulation, but 24 h-long pretreatment of cells with 1 mmol/l VA provoked higher decrease in cell number in S phase (18%) comparing with only irradiated cells (25%). The results of our work show that VA possesses radiosensitizing properties when applied 24 hours prior irradiation and that during parallel long-term action of VA and IR the cells undergo differentiation and faster apoptosis induction. Radiosensitizing effect of VA is not caused by abrogation of G2/M cell cycle arrest, but VA induces p21 and leads to differentiation of HL-60 cells.

Key words: apoptosis, ionizing radiation, p21, radiosensibilisation, valproic acid

---

DSB - double strand break; EC50 - the concentration, after which 50% of cells retain their clonogenic capacity and form colonies; EC70 - the concentration, after which 30% of cells retain their clonogenic capacity and form colonies; HAT - histone acetyl transferase; HDAC - histone deacetylase; HDACi - histone deacetylase inhibitor; IR - ionizing radiation; NaB - sodium butyrate; TSA - trichostatin A; VA - valproic acid

## INTRODUCTION

Histone acetylation is a posttranslational modification of the core histones that affects chromatin structure and gene expression. Defects in both histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activities have been described in a variety of cancers. Inhibitors of HDAC activity (HDACi) induce differentiation, growth arrest and apoptosis of transformed cells in culture and inhibit tumor growth in animals [1,2].

Radiotherapy is frequently used method in the treatment of cancer. Therapeutical potential of radiotherapy can be increased by application of radiosensitizing agents before irradiation. Despite intensive research of these agents, such as iodo-2-pyrimidinone-2-deoxyuridine [3] or misonidazole [4] the radiosensitizers are not used in clinic. Radiation-induced damage of DNA is related to chromatin structure. One of the processes involved in chromatin remodeling is histone acetylation, regulated by HDAC; therefore HDAC inhibition might have radiosensitizing effect. As soon as in 1985 [5] radiosensitizing effect of sodium butyrate (NaB), short-chain fatty acid, has been proved on colon cancer cells. Biade et al.[6] during studies of trichostatin A (TSA) linked its radiosensitizing effect with hyperacetylation of histones. Karagiannis et al.[7] stated, that 24 hours long incubation of human chronic myelogenous leukemia cells K562 with trichostatin A increased radiation sensitivity. Dose modification factor ranged from 1.1 when cell were incubated with 0,1 umol/l TSA to 2.3 at 1 umol/l TSA. Camphausen et al. [8] observed maximal acetylation of nuclear histones H3 and H4 after 24 and 48 hours long incubation of prostate carcinoma (DU145) and glioma (U251) cells with HDAC inhibitor MS-275. The cultivation of cells with MS-275 after irradiation had only weak effect, whereas the best results were obtained with a 48 hours long incubation prior and continuously following the irradiation. Munshi et al. [9] compared radiosensitizing effect of NaB in melanoma cells with normal fibroblasts. They proved NaB to reduce significantly the expression of reparation proteins Ku70 and Ku86, but only in cancer cells, capacity of reparation proteins in normal fibroblasts stayed unchanged. It can be concluded that radiosensitizing effect of HDACi in melanoma cells is linked to the inhibition of reparation of DNA damage induced by ionizing radiation (IR).

Chemical structure of valproic acid (2-propylpentanoic acid, VA) is similar to NaB. However, NaB has a very short half-life (30 min), which makes it inconvenient for clinical application. On the other hand, VA has well known anti-convulsant properties and it is routinely used in treatment of epilepsy. Moreover, during the past years it has become evident that valproic acid possesses antitumor properties related to inhibition of histone deacetylases

[10]. It has been proved by Phiel et al.[11] that antiepileptic activity of VA is not related to inhibition of HDAC.

Three days-long incubation of leukemic cells HL-60 and MOLT-4 with VA causes proliferation arrest and decrease in number of cells in S phase of the cell cycle [12]. Despite the same EC50 value determined by colony-forming assay (1.8 mmol/l) both cell lines react differently to VA. In MOLT-4 cells VA induces primarily apoptosis, while in HL-60 cells it leads to differentiation (increase in CD11b and CD86) and proliferation arrest. Apoptosis in HL-60 cells was observed only after exposure to high concentrations of VA (4 mmol/l). During long cultivation (14 days) of HL-60 cells with VA significant protective effect of cytokines cocktail (IL-3, SCF and G-CSF) has been proved [12].

In our previous studies of VA effects in T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4 we proved synergic action of VA and IR. Continual exposure of MOLT-4 cells to VA increases apoptosis and decreases colony-forming capacity of the cells irradiated with small dose of radiation. EC70 value dropped from 0.97 to 0.38 mmol/l when the cells were irradiated with a dose of 1 Gy before the continual cultivation with VA. Also 3 days-long preincubation of MOLT-4 cells with VA before irradiation has radiosensitizing effect [13].

HL-60 cells do not express functional protein p53 and they react to irradiation by long cell cycle arrest in G2/M phase. During this cell cycle arrest the HL-60 cells repair radiation-induced damage, which grants them relatively high radioresistance. Abrogation of G2/M phase arrest by application of caffeine (inhibitor of ATM kinase) has significant radiosensitizing effect [14]. Inhibition of cellular proliferation is result of increased expression of protein p21.

In this study we evaluated radiosensitizing effect of VA on human promyelocyte leukemia cells HL-60 and the effect of irradiation combined with continuous presence of low concentrations of VA.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell cultures and culture conditions**

The human promyelocyte leukemia cells HL-60 from the European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, UK) have been cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) supplemented with a 20% fetal calf serum in a humidified incubator at 37°C and a controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cultures have been divided every 2<sup>nd</sup> day by a dilution to a concentration of 2x10<sup>5</sup> cells/ml. The cell counts have been performed with a

hemocytometer, the cell membrane integrity has been determined by using the Trypan blue exclusion technique. The cell lines in the maximal range of up to 20 passages have been used for this study.

#### Gamma irradiation

The exponentially growing HL-60 cells have been suspended at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml in a complete medium. Aliquots of 10 ml have been plated into 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc) and irradiated using a <sup>60</sup>Co gamma-ray source with a dose-rate of 0.4 Gy/min. After the irradiation the flasks have been placed in a 37° C incubator with 5% CO<sub>2</sub> and the aliquots of the cells have been removed at various times after irradiation for analysis.

#### Valproic acid (VA)

VA (Sigma-Aldrich) has been added into the cultivation flask for various time (1 - 12 days) in a final concentration of 0.5 - 4 mmol/l. The VA (sodium salt, Sigma) was dissolved in PBS to a stock concentration of 100 mM and stored at -20 °C.

#### In vitro clonogenic survival assay

The survival curves have been generated using an in vitro clonogenic assay. The untreated control ( $10^2$  cells/ml) and the irradiated and treated HL-60 cells ( $10^2$ – $10^5$  cells/ml) were plated in Iscove's medium containing 0.9% methylcellulose and 30% FBS. HL-60 cells were stimulated by 10% conditioned medium of human cell line 5637 (urine vessel carcinoma) per 1 ml of medium. 1 ml of the plating mixture has been dispersed into 35 mm tissue culture Petri dishes. The colonies (containing 40 or more cells) have been counted after 14 days of the incubation in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and the curves have been generated. All semi-solid cultures have been performed in duplicates. Two independent experiments (4 measurements) have been performed.

#### Cell cycle analysis

Following the incubation, the cells were washed with cold PBS, fixed by 70% ethanol and stained with propidium iodide (PI) in Vindelov's solution for 30 minutes at 37°C. Fluorescence (DNA content) was measured with Coulter Electronic (Hialeah, FL, USA) apparatus. A minimum of 10 000 cells analyzed in each sample served to determine the percentages of cells in each phase of the cell cycle, using Multicycle AV software. Three independent experiments were performed.

### CD11b antibody, apoptosis detection

For apoptosis detection we used APOPTEST-FITC (DakoCytomation, Brno, Czech Rep.). For detection of cell surface markers in HL-60 cells we used PE-conjugated anti-human CD11b (Bear1, IgG1-IM2581) - obtained from Immunotech, Marseille, France. Flow cytometric analysis was performed on a Coulter Epics XL flow cytometer equipped with a 15mW argon-ion laser with excitation capabilities at 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). A minimum of 10,000 cells was collected for each 2-colour sample in a list mode file format. List mode data were analyzed using Epics XL System II software (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA).

### Western Blotting

At various time after VA treatment and irradiation the HL-60 cells have been washed with a PBS. The lysates containing an equal amount of protein (30 µg) have been loaded into each lane of a polyacrylamide gel. After electrophoresis, the proteins were transferred to a PVDF membrane. The membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 and 5% non-fat dry milk and then incubated with primary antibody (p21 - Sigma; acetylated histone H3 and H4 - Cell Signaling Technologies) at 4°C overnight. After washing, the blots were incubated with secondary antibody (Dako) and the signal was developed with a chemiluminescence (ECL) detection kit (Boehringer).

## RESULTS

### Acetylation of histones H3 and H4 and expression of p21

To characterize response of HL-60 cells to VA we studied changes in protein expression and acetylation after treatment with 2 and 4 mmol/l VA. We proved increased acetylation of histone H4 on lysine 12 at HL-60 cells exposed to both concentrations of VA 48-72 h after the beginning of incubation. Acetylation of histone H3 on lysine 9 was detected only after exposure to 4 mmol/l VA, 72 h after the beginning of cultivation. Incubation of the cells with 4 mmol/l VA caused increase in inhibitor of cyclin dependant kinases p21 as soon as after 24 h, while after the lower concentration of VA (2 mmol/l) p21 was detected later, 48-72 h after the beginning of the incubation. Maximal increase in p21 thus precedes maximal acetylation of histones H3 and H4 (Fig1).

### Radiosensitizing effect of VA

To evaluate radiosensitizing effect of VA the HL-60 cells were cultivated 24 h in presence of VA and then irradiated by gamma rays. The cells were exposed to increasing concentration of VA, irradiated, and colony-forming assay was performed. 24 h-long preincubation with VA decreases clonogenic survival of HL-60 cells only in high concentrations. EC70 value calculated for VA alone was 3.4 mmol/l. Irradiation by the dose of 2 Gy itself decreases clonogenic survival to 50%. When the cells were incubated with VA 24 h before the irradiation by the dose of 2 Gy, EC70 decreased to 1.4 mmol/l VA (Fig. 2A). Figure 2B compares DNA content analysis of HL-60 cells irradiated with or without 24 h-long preincubation with 1 mmol/l VA. VA itself in concentration 1 mmol/l does not significantly change distribution of cells throughout the cell cycle. Irradiation of HL-60 cells by the dose of 2 Gy causes pronounced accumulation of the cells in G2/M phase (56%) and decrease in percentage of cells in S phase (26%) 24 h after the irradiation. When the cells were incubated with VA 24 h before the irradiation by the dose of 2 Gy, G2/M phase arrest was not abrogated (65% of cells in G2/M), but the percentage of the cells in S phase (18%) was more decreased than in only irradiated cells. Radiosensitizing effect of preincubation with VA thus cannot be explained by abrogation of G2/M phase arrest.

### Concomitant effect of irradiation and VA

We studied effect of simultaneous application of VA and irradiation by gamma rays. HL-60 cells were irradiated and continuously exposed to VA in concentration 1 and 3 mmol/l. Figure 3A shows decrease in proliferation during 12 days of continuous incubation with VA, which causes decrease in number of viable cells to 65% (1 mmol/l) or 10% (3 mmol/l) of control sham treated cells after 12 days. Irradiation by the dose of 2 Gy decreased proliferation of the cells to 76% of control. When irradiation was applied together with VA, the effect was cumulative: in the case of 1 mmol/l VA + 2 Gy the number of viable cells decreased to 37%, in the case of 3 mmol/l VA + 2 Gy viable cells were almost eradicated. Changes in cell cycle distribution after 12 days are shown in Fig. 3B. At this interval the cells, which were only irradiated already overcome G2/M arrest and the passage of surviving cells through the cell cycle is regenerated. VA in concentration 1 mmol/l does not significantly alter cell cycle, but VA in concentration 3 mmol/l causes significant decrease in number of cells in S phase, which corresponds with limited proliferation as mentioned above. Cell cycle distribution was not significantly altered after combination of 1 mmol/l VA + 2 Gy, but the combination of 3 mmol/l VA + 2 Gy induced massive apoptosis in majority of the cells.

## Differentiation and apoptosis induction after VA and IR

Figure 4 shows changes in expression of CD11b antigen and annexin V in HL-60 cells, three days after irradiation with the dose of 2 Gy and incubation with VA. VA in concentration of 1 mmol/l leads to cell differentiation and increase in CD11b expression (17.75% resp. 0.9%-control) without apoptosis induction, whereas concentration of 3 mmol/l increased CD11b to 78.3% and apoptosis is induced in 64.9% A+ cells (4.6% in control cells). Three days after irradiation of cells with the dose of 2 Gy a slight increase of CD11b to 9% as well as apoptosis induction (11.3% A+ cells) can be seen. Low concentration of VA (1 mmol/l) acting concomitantly with irradiation provoked mainly increase of differentiation that means CD11b positivity (36.3%), effect on apoptosis induction was only additive (15.4% A+ cells). The effect of VA in concentration 3mmol/l applied concomitantly with 2 Gy IR was different: The differentiation was comparable with effect of VA (3mmol/l) alone, but percentage of apoptotic cells raised to 76.2%. Study of flow-cytometric record (Fig.4A) shows that highly positive CD11b cells (well differentiated) are alive without annexin V positivity. Once the cells are annexin V positive, the CD11b expression declines until this differentiation marker is completely lost.

## DISCUSSION

It is evident from this and our previous studies [12,13,15] that both IR and VA possess antileukemic effect in leukemia cell lines HL-60 and MOLT-4. MOLT-4 are lymphoblasts expressing CD4 and CD7 markers, HL-60 represent human promyelocytic leukemia cells and are poorly differentiated - CD34-/CD33+/CD15+.

Mentioned cell lines differ in their p53 status - MOLT-4 have functional wild type p53, which is phosphorylated promptly within hours following irradiation [16]. VA in concentration of 2 mmol/l likewise causes phosphorylation of p53 after 2 hours long incubation. Looking at posttranslational modifications after VA treatment, we proved acetylation of histone H4 48 and 72 hours after beginning of cultivation. Histone H3 acetylation occurred as far as after 72 hours long incubation with 4 mmol/l VA. In MOLT-4 T-lymphocytic leukemia cells acetylation of both nuclear histones H3 and H4 occurs already after 24 h-long incubation with 2 mmol/l VA [13].

In contrast to IR, VA in 2 mmol/l concentration does not implicate accumulation of cells in G2 phase. The arrest of proliferation provoked at HL-60 cells by VA was

accompanied by increased expression of protein p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Since HL-60 cells are p53 negative, increase in p21 induced by VA must be p53 independent. Deubzer et al. [17] stated that differentiation and inhibition of HL-60 cells growth is related to unregulated gene p21. Cyclin/dependent kinase inhibitor p57KIP2 is frequently downregulated in leukemia cells by methylation of appropriate promoters. In parallel to p21 upregulation, Yang et al. [18] proved elevated expression of p57 protein after VA treatment in MOLT-4 and HL-60 cells.

VA acts as a differentiation agent in HL-60 cells in contrary to the effect on MOLT-4. Three day-long incubation with 1 mmol/l VA resulted in elevated expression of antigen CD11b. Irradiation also led to pseudo-differentiation of HL-60 cells, 48 hours after the irradiation with dose of 6 Gy granularity raises, cells are alive and CD11b positive. A part of cells with low granularity and small size is CD11b negative. Those cells express APO2.7 and are apoptotic.

Both the noxes mentioned above provoke rapid apoptosis induction in MOLT-4 cells and their concomitant effect can be observed [13]. Induction of apoptosis is significantly higher in MOLT-4 cells irradiated with 2 Gy and subsequently cultivated for 14 days with VA (0.5 mmol/l) compared to only irradiated cell population.

Yang et al. [18] proved synergistic effect of 5-aza-2-deoxycytidine and VA in MOLT-4 cells in term of inhibition of proliferation, apoptosis induction and rise of antiproliferative proteins p21 and p57. Comparing efficacy of the noxes on different cell lines, they have proved that MOLT-4 cells are more sensitive to VA and HL-60 cells to the action of 5-aza-2-deoxycytidine. Irrespective to upregulation of p21 and p57 they have not proved arrest in any phase of cell cycle neither after VA alone nor after its combination with IR. Combination treatment allows application of relatively low doses of 5-aza-2-deoxycytidine. The common effect of noxes was application schema-independent, they can be applied concomitantly.

We proved that VA has radiosensitizing as well as synergistic effect in long-term cultivation with 2 mmol/l VA after irradiation by 2 Gy. Similarly 24 hours long precubation of HL-60 cells with VA preceding 2 Gy irradiation caused diminution of EC70 value from 3.3 to 1.35 mmol/l. The number of cells in G2 arrest remained unchanged during this precultivation, while the number of cells in S phase decreased. We proved also radiosensitizing as well as concomitant effect of VA and IR in term of apoptosis induction.

While radiosensitizing effect of HDACi has been also reported by others, the mechanism of it remains to be elucidated. Camphausen et al. [19] demonstrated radiosensitizing effect of valproic acid on brain tumor lines SF539 and U251. They relate this

fact to hyperacetylation of H3 and H4 histones, chromatin release and consequently lowered capacity of tumor cells to repair the radiation injury. Munshi et al. [20] showed that Vorinostat (HDACi) reduced the expression of the repair-related genes Ku70, Ku80, and Rad50 in A375 cells as detected by Western blot analysis. Another important phenomenon linked to reparation of radiation caused injury represents the phosphorylation of H2A.X histone, which occurs very early after irradiation in location of DSB and co-localizes with range of others proteins [21]. 24 h-long incubation of melanoma cells with NaB followed by 2 Gy irradiation led to increased phosphorylation of H2AX (30 minutes post radiation) and prolonged period of H2AX phosphorylation [20]. Both observations indicate lowered capacity to DSB repair.

Goh et al. [22] showed that elevated apoptosis induction in tumor cells caused by 24 hours long pretreatment with phenylbutyrate prior radiation is linked to downregulation of antiapoptotic protein bcl-xL and DNA-PK. Cells lacking DNA-PK catalytic activity are defective in DNA DSB repair and extremely sensitive to the effect of ionizing radiation. On the other hand Sutheesophon et al. [23] proved, that HDACi depsipeptide (FK228) led to down-regulation of proapoptotic bcl-2 and apoptosis induction through caspase 9 activation and cytochrom c release from mitochondria in HL-60 cells.

In parallel to radiosensitizing effect of VA we studied the importance of long-term incubation of HL-60 cells with VA. We proved mainly the differentiation and inhibition of proliferation of cells after 12 days incubation with 1 mmol/l VA and 2 Gy irradiation. Differentiation plays a role in decelerating the proliferation and in ultimate phase induces apoptosis. Despite the radiosensitizing effect of VA, the joint action of VA and IR was not so pronounced as in MOLT-4, where VA promoted apoptosis directly without differentiation [13].

The results of our work have shown that VA possesses radiosensitizing properties when applied 24 hours prior irradiation and that during parallel long-term action of VA and IR the cells undergo differentiation and faster apoptosis induction. Radiosensitizing effect of VA is not caused by abrogation of G2/M cell cycle arrest, but VA induces p21 and leads to differentiation of HL-60 cells.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620820) for financial support.

## References

- [1] Luo RX, Dean DC. Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1288-1294.
- [2] Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kamez OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Coco FL, Nervi C, Pelicci PG, Henzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO* 20: 6969-697, 2001.
- [3] Watanabe R, Nikjoo H. Modelling the effect of incorporated halogenated pyrimidine on radiation-induced DNA strand breaks. *Int J Radiat Biol* 2002; 78: 953- 966.
- [4] Chan P, Milosevic M, Fyles A, Carson J, Pintilie M, Rauth M, Thomas G. A phase III randomized study of misonidazole plus radiation vs radiation alone for cervix cancer. *Radiother Oncol* 2004; 70: 295-299.
- [5] Arundel C, Glicksman A, Leith J. Enhancement of radiation injury in human colon tumor cells by the maturational agent sodium butyrate (NaB). *Radiat Res* 1985; 104: 443-448.
- [6] Biade S, Stobbe C, Boyd J, Chapman J. Chemical agents that promote chromatin compaction radiosensitize tumor cells. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 1033-1042.
- [7] Karagiannis TC, Harikrishnan KN, El-Osta A. The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2AX. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 787-793.
- [8] Camphausen K, Burgan WE, Cerra MA, Oswald K, Trepel J, Lee M, Tofilon P. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gamma-H2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. *Cancer Res* 2004; 64: 316-321.
- [9] Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Ismail S, Stevens C, Meyn RE. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* 2005;11: 4912-4922.
- [10] Blaheta RA, Cinatl J Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate. A novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002; 22: 492-511.
- [11] Phiel CJ, Zhang FM, Huang EZ, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734-36741, 2001.
- [12] Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Zášková D. Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys* 2006; 25: 65-79.

- [13] Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A. Effect of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on cell death and molecular changes caused by low-dose irradiation. *Annal N Y Acad Sci* 2006; 29: 739-748.
- [14] Vávrová J, Mareková M, Vokurková D, Szkanderová S, Psutka J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiat Environ Biophys* 2003; 42: 193-199.
- [15] Vávrová J, Mareková M, Vokurková D, Psutka J. Cell cycle alteration and response to low-dose-rate gamma radiation in leukemic cell lines. *Physiol.Res.* 2004; 53: 335-342.
- [16] Szkanderová S, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Pavlová S, Šmardová J, Stulík J. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol (Prag)* 2003; 149:191-196.
- [17] Deubzer H, Busche B, Ronndahl G, Eikel D, Michaelis M, Cinatl J, Schulze S, Nau H, Witt O. Novel valproic acid derivatives with potent differentiation-inducing activity in myeloid leukemia cells. *Leukemia Res.* 2006; 30: 1167-1175.
- [18] Yang H, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Kartarjian H, Garcia-Manero G. Antileukemia activity of combination of 5-aza-2-deoxycytidine with valproic acid. *Leukemia Research* 2005; 1091: 385-398.
- [19] Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, Fine H, Tofilon PJ. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* 2005; 114: 380-386.
- [20] Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1967-1974.
- [21] Bekker-Jensen S, Lukas K, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks *Cell Biol* 2006 ; 173: 195-206.
- [22] Goh M, Chen F, Paulsen MT, Yeager AM, Dyer ES, Ljungman M. Phenylbutyrate attenuates the expression of Bcl-XL, DNA-PK, caveolin-1 and VEGF in prostate cancer cells. *Neoplasia* 2001; 3: 331-338.
- [23] Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku MA, Ozawa K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol* 2006; 115: 78-90.

## Figure legends

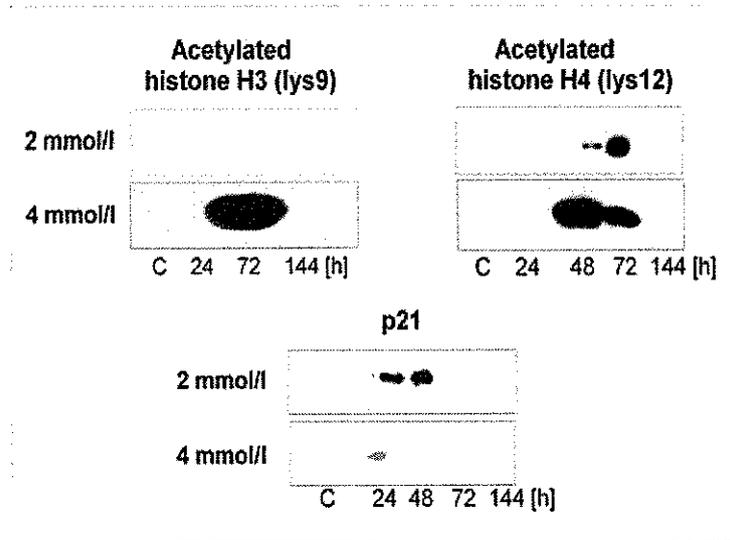


Fig. 1: Changes in protein expression and acetylation of histones after treatment with valproic acid in concentration of 2 and 4 mmol/l in HL-60 cells.

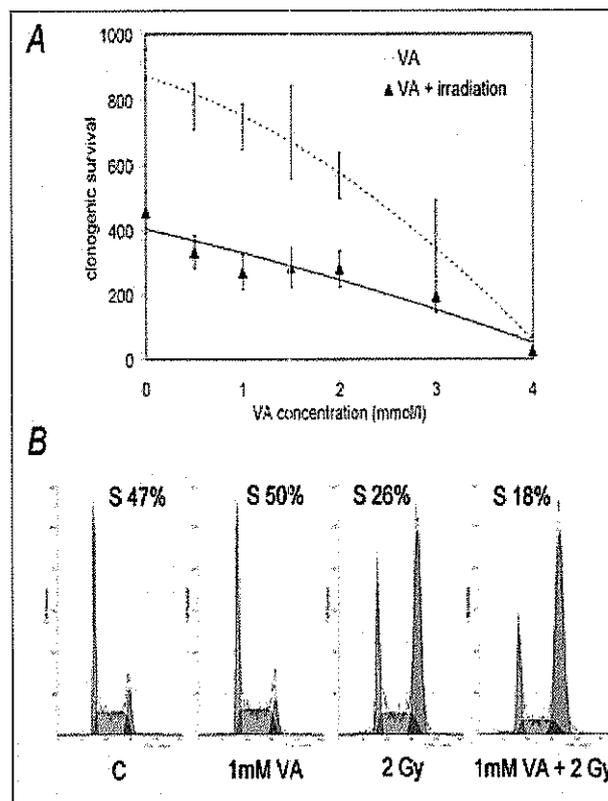


Fig. 2A: Comparison of colony forming capacity of HL-60 cells only treated with valproic acid (EC70=3.4 mmol/l) with cells pretreated with VA for 24 h and then irradiated with the dose of 2 Gy (EC70=1.4 mmol/l). Irradiation by the dose of 2 Gy itself decreases clonogenic survival to 50%. Fig. 2B Flow-cytometric analysis of DNA content of HL-60 cells 24 hours after irradiation with or without 24 h-long preincubation with 1 mmol/l VA. Percentage represents number of cells in S-phase of cell cycle.

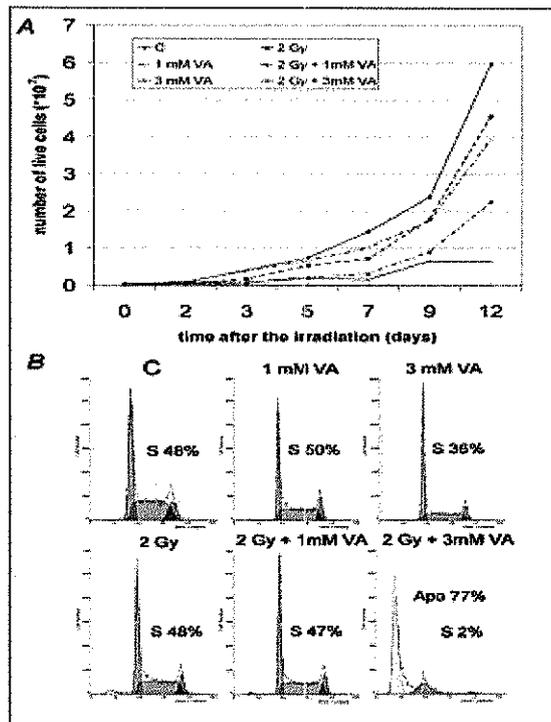


Fig. 3A: Decrease in proliferation during 12 days of continuous cultivation of HL-60 cells with valproic acid in concentration of 1 and 3 mmol/l compared to HL-60 cells irradiated by the dose of 2 Gy and consequently cultivated for 12 days with valproic acid in concentrations mentioned above. Fig. 3B: Changes in cell cycle distribution 12 days after treatment with valproic acid in concentration of 1 and 3 mmol/l compared to cells irradiated by the dose of 2 Gy and subsequently cultivated with valproic acid in the same concentrations. Percentage represents number of cells in S-phase of cell cycle.

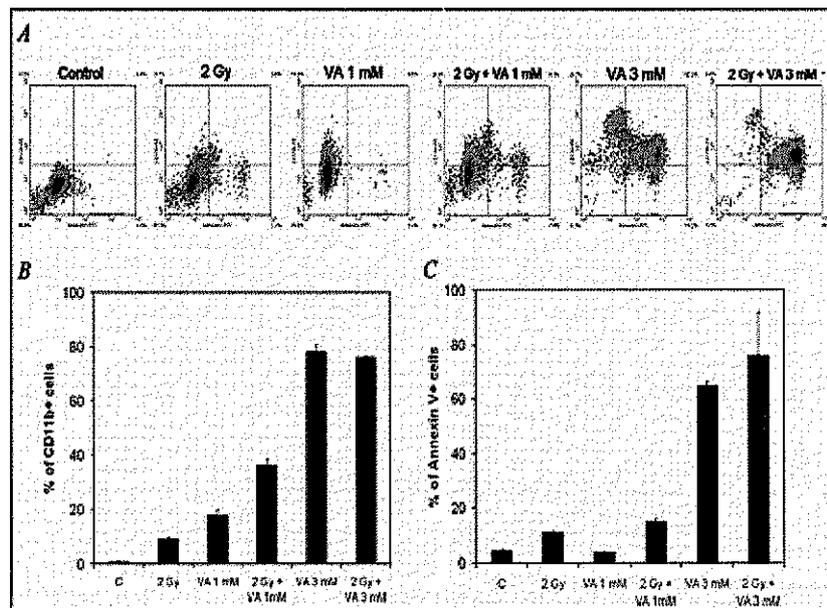


Fig. 4: Flow-cytometric analysis of changes in expression of CD11b antigen and annexin V in HL-60 cells, three days after irradiation with the dose of 2 Gy and incubation with valproic acid in concentrations of 1 and 3 mmol/l.

