

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**APOPTÓZA A PROLIFERACE**  
**V NÁDOROVÝCH BUNĚČNÝCH LINÍCH:**  
**Radiační a medikamentózní ovlivnění**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Mgr. Aleš Tichý**

**Ústav lékařské biochemie**

**Hradec Králové 2008**

*Dovoluji si poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi, CSc., za odborné vedení, vytvoření příznivých pracovních podmínek a velmi lidský osobní přístup. Děkuji svým nejbližším spolupracovníkům, kteří mi pomohli při koncepčním směřování, jakož i v technikách či s formální stránkou disertační práce, a to, prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. a doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD. Dále doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc. a Mgr. Darině Záškové děkuji za cenné rady, kritické připomínky a odborné konzultace. Velice si cením nepostradatelné a pečlivé technické spolupráce ze strany paní Jaroslavy Prokešové, Nadi Mazánkové, Evy Vodákové a Bc. Lenky Mervartové.*

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>5</b>
<b>1 PŘEDMLUVA</b> .....	<b>6</b>
<b>2 PŘEHLED SOUČASNÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1 ATM - ataxie-telangiektasie mutovaná kinas</b> .....	<b>8</b>
2.1.1 Kontrola buněčného cyklu .....	8
2.1.2 Reparační DNA a vliv kofeinu .....	12
<b>2.2 Apoptóza</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 Receptorový mechanismus spouštění apoptózy .....	16
2.2.2 Rodina kaspasových enzymů .....	16
2.2.3 Mitochondriální mechanismus spouštění apoptózy .....	17
<b>2.3 Rodina proteinů Bcl-2</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Bcl-2-příbuzné faktory přežití .....	19
2.3.2 Bax-příbuzné faktory smrti .....	20
2.3.3 BH3-příbuzné proapoptotické faktory smrti .....	22
<b>2.4 Ionizující záření a biodozimetrie</b> .....	<b>24</b>
<b>3 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>26</b>
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Buněčné kultury a kultivační podmínky</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 Gama ozáření</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3 Elektroforéza a Western blotting</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4 Průtoková cytometrie</b> .....	<b>28</b>
4.4.1 Stanovení apoptózy pomocí vazby annexinu V .....	28
4.4.2 Analýza obsahu DNA a analýza buněčného cyklu .....	28
4.4.3 Stanovení apoptózy pomocí vazby protilátky APO 2.7 .....	29
<b>4.5 Imunocytochemie</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6 Barvení Diff-Quick</b> .....	<b>30</b>
<b>4.7 ELISA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8 Statistické hodnocení výsledků</b> .....	<b>31</b>
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 Vliv záření na reparaci poškození DNA v buňkách MOLT-4</b> .....	<b>32</b>
5.1.1 Aktivace ATM a Chk-2.....	32
5.1.2 Reparační proteiny .....	32
5.1.3 Protein p53 .....	37
5.1.4 Vliv kofeinu na fosforylaci proteinu p53 .....	42
<b>5.2 Vliv záření na indukci apoptózy v buňkách HL-60 a MOLT-4</b> .....	<b>45</b>
5.2.1 Vzestup Mcl-1 po nízkých dávkách záření .....	45
5.2.2 Aktivace Bid na proapoptotický t-Bid .....	45
5.2.3 Uvolnění cytochromu c z mitochondriální matrix do cytoplazmy .....	46
5.2.4 Aktivace iniciačních kaspas-8 a -9.....	52
5.2.5 Apoptóza v buňkách HL-60 .....	55
5.2.6 Apoptóza v buňkách MOLT-4 .....	58
<b>6 DISKUSE</b> .....	<b>61</b>
<b>6.1 Zářením aktivovaná ATM-dependentní signalizace v buňkách MOLT-4</b> .....	<b>61</b>
<b>6.2 Inhibice ATM-dependentní dráhy kofeinem v buňkách MOLT-4</b> .....	<b>65</b>

6.3	Význam proteinů rodiny Bcl-2 v kontrole apoptózy leukemických buněk.....	66
6.4	Indukce apoptózy v leukemických buňkách .....	70
7	<i>SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ</i> .....	73
8	<i>ZÁVĚR</i> .....	74
9	<i>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</i> .....	76
10	<i>PŘÍLOHY</i> .....	87
10.1	Příloha 1 (Tichý et al., 2008).....	87
10.2	Příloha 2 (Tichý et al., 2007).....	88
10.3	Příloha 3 (Tichý, 2006).....	89
10.4	Příloha 4 (Řezáčová et al., 2008) .....	90
10.5	Příloha 5 (Řezáčová et al., 2005) .....	91

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATM	ataxie telangiektasie-mutovaná kinasa
CLL	chronická lymfocytární leukemie
cyt-c	cytochrom c
DSB	dvojitý zlom DNA
FITC	fluorescein isothiokyanát
Gy	Gray
$\gamma$ H2A.X	histon H2A.X fosforylovaný na Ser <sup>139</sup>
HR	homologní rekombinace
IRIF	ionizujícím zářením indukovaná ložiska
IZ	ionizující záření
Mcl-1	protein myeloidní buněčné line-1
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 komplex
NHEJ	nehomologní spojování konců
PBS	fosfátový pufr v médiu fyziologického roztoku (pH 7,4)
p53	protein kódovaný tumor-supresorovým genem TP53
t-Bid	štěpený protein Bid
wt	wild type

*Zkratky a názvy genů a proteinů, pro něž není zařítý český ekvivalent, nejsou uvedeny.*

# 1 PŘEDMLUVA

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí nejen v ČR ale i ve světě, proto se význam studií zaměřených na objasnění molekulárních mechanismů v nádorových buňkách neustále zvyšuje. Podle American Cancer Society je chronická lymfocytární leukemie (CLL) nejběžnější formou leukemie západního světa, čítající jenom v USA zhruba 12 000 nových případů a prevalenci 50 000 až 60 000 pacientů ročně. CLL je typickým příkladem lidské malignity způsobené zejména defektní apoptózou a naproti tomu akcelerovaným buněčným dělením, proliferací. Maligní lymfocyty, které se akumulují u pacientů s CLL, jsou převážně klidové necyklující buňky vykazující prodlouženou životnost díky selhávající programované buněčné smrti (Reed, 1998a).

Za normálních podmínek je životnost buněk udržována delikátní rovnováhou antiapoptotických a proapoptotických genů, které fungují jako elektrický reostat (Korsmeyer et al., 1993), jenž zaručuje, že denní produkce cca 50 až 70 miliard buněk v lidském těle bude kontrolována jejich programovanou smrtí, apoptózou. Nerovnováha genů kontrolujících apoptózu pak vytváří živnou půdu pro vznik nádorových onemocnění. Porozumění daným dějům na molekulární úrovni, poznání změn apoptotických mechanismů v lidských nádorových buňkách a určení způsobu, jakým terapeutika indukují apoptózu, může nabídnout nové strategie a racionální přístupy v kombinované terapii nádorů.

Proto bylo cílem této studie bylo zjistit, jaké signální dráhy vedou ke spuštění programované smrti leukemických buněk po působení fyzikálních (ionizující záření) a chemických (kofein) faktorů a objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí signalizace a reparace poškození DNA a následné indukce apoptotického procesu.

Jako modelovou buněčnou linií jsme použili buňky MOLT-4, které jsou odvozeny od lidské T-buněčné leukémie, nesoucí imunofenotypické charakteristiky thymocytů s expresí CD1<sup>+</sup> 49 %, CD4<sup>+</sup> 55 %, CD5<sup>+</sup> 72 % a CD7<sup>+</sup> 77 % (Greenberg et al., 1998) a jsou vhodným modelem pro studium molekulárních mechanismů zářením indukované apoptózy u T-lymfocytů. Druhou linií byly buňky HL-60 s nízkou úrovní diferenciací reprezentující lidskou promyelocytární leukémií. Použité linie se liší expresí významného nádorového supresoru TP53.

Obecně lze říci, že indukce apoptózy u buněk MOLT-4 (p53-*wild type*; wt) po expozici dávkám do 10 Gy je rychlejší než u buněk HL-60 (p53-negativní). Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po expozici ionizujícímu záření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Při testování klonogenity MOLT-4 byla určena

hodnota  $D_0$  jako 0,87 Gy (dávka snižující počet přežívajících buněk na 37 %) a tyto buňky jsou relativně radiosenzitivní ve srovnání s buňkami HL-60, jejichž  $D_0$  je 2,2 Gy (Vávrová et al., 2004). Buňky HL-60 se po dávkách do 5 Gy akumulují zejména v G2-fázi a narozdíl od buněk MOLT-4, přítomnost v G2-bloku má výrazný vliv na jejich radiorezistenci a do apoptózy vstupují později.

## 2 PŘEHLED SOUČASNÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 ATM - ataxie-telangiectasie mutovaná kinasa

Působení fyzikálních nebo chemických faktorů může vést ke vzniku lézí DNA jako jsou poškození bazí, intramolekulární zesíťování vláken DNA, jednoduché či dvojité zlomy vláken a další (Khanna et al., 2001). Dvojité zlomy DNA (*double strand breaks*, DSB) způsobují remodelaci chromatinu a formování tzv. foků (*ionising radiation-induced foci*, IRIF), kde se již během prvních minut po ozáření lokalizují proteiny podílející se na opravě radiačního poškození jako jsou ATM kinasa (ATM), Mre11, Rad50, Nbs1 (proteiny reparačního komplexu MRN), Mdc1, 53BP1 (p53-vazebný protein 1) a BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2006).

Jedním z prvních kroků spojených s odpovědí savčích buněk na vznik DSB po expozici ionizujícím záření (IZ) je aktivace ATM (Lavin et al., 1995). ATM se odvozuje od ataxie-telangiectasie (A-T), lidské autosomálně recesivní poruchy, jejíž odpovědný gen je mutovaný. Již před 30 lety Taylor (1978) navrhl, že neobyčejně vysoké množství chromosomálních aberací indukovaných radiací v buňkách A-T pacientů v porovnání s normálními vzniká v důsledku neopravených DSB, a že je to i příčina vysoké radiosensitivity A-T pacientů, která byla pozorována v klinické praxi. Kastan et al. (1991) přinesli důkaz o tom, že A-T je onemocnění s defektním kontrolním bodem (*checkpoint*) buněčného cyklu, kde nedochází k p53-dependentnímu G1/S bloku.

A-T buňky vykazují specifický genotyp a kromě zvýšené radiosensitivity nalezneme u těchto buněk i genomovou nestabilitu, nádorové predispozice a zvýšenou citlivost k radiomimetikům a inhibitorům topoizomeras aj. (Lavin & Shiloh, 1997). ATM, defektní gen v tomto pleiotropním onemocnění (progresivní cerebrální ataxie, okulokutánní telangiectasie, imunodeficience), kóduje serin/threoninovou kinasu patřící do rozsáhlé rodiny fosfatidylinozitol-3 kinas. Význam ATM je nesporný, neboť reguluje všechny tři kontrolní body buněčného cyklu. Dále funguje při opravě DNA a regulaci apoptózy a je tedy klíčovým a kontrolním článkem buněčné odpovědi na vznik DSB (Khanna et al., 2001).

#### 2.1.1 Kontrola buněčného cyklu

V průběhu let byla identifikovaná celá řada substrátů, které ATM pomocí fosforylace aktivuje. My se zaměříme na ty, které jsou vyžadovány pro zástavu buněčného cyklu a DNA reparaci a participují na G1/S kontrolním bodu. Kromě toho, že vyžadují aktivní ATM, jsou



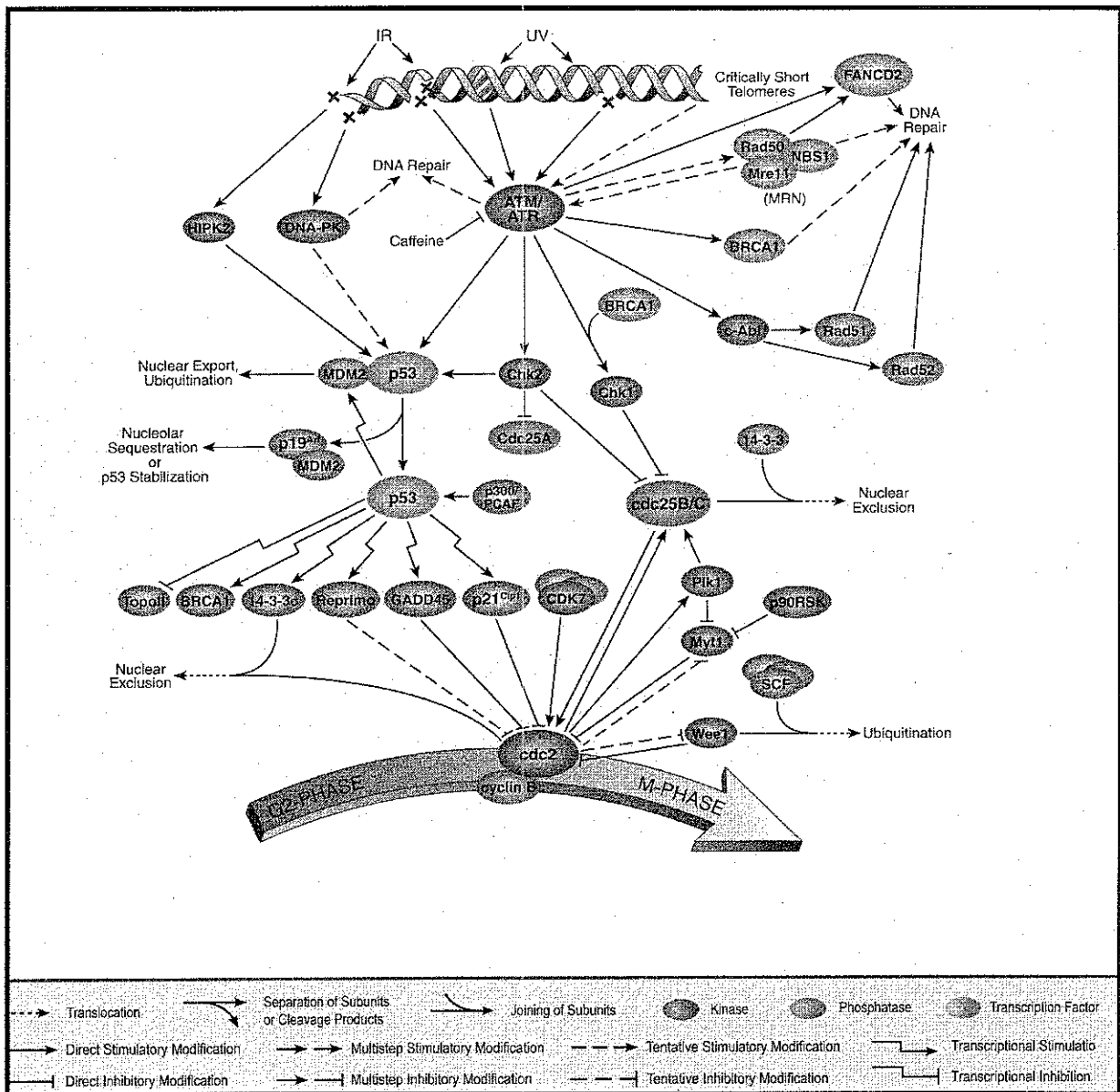
také závislé na p53 (Kastan et al., 1991). Jsou jimi murine-double minute protein (Mdm2) a checkpoint kinasa-2 (Chk-2). ATM je využívá k tomu, aby nastavila patričnou aktivitu a stabilitu p53.

Protein p53 (TP53 nádorový supresor) je v normálních buňkách přítomen v latentní formě s nízkou afinitou ke specifickým sekvencím DNA, ovšem po genotoxickém stresu se tato afinita mnohonásobně zvyšuje. Pokud je aktivován, působí p53 jako klíčový regulátor buněčného osudu, jelikož má schopnost iniciovat zástavu buněčného cyklu, senescenci či apoptózu cestou transaktivace p53 cílových genů (Ko & Prives, 1996; Vogelstein et al., 2000). Řada prací také spojuje jeho aktivaci s procesem DNA reparace (Sengupta & Harris, 2005).

Lidský p53 je polypeptid složený z 393 aminokyselin (53 kDa) a v roztoku zaujímá konformaci tetrameru (Friedman et al., 1993; Wang et al., 1994). Gene pro p53 je umístěn na krátkém raménku chromozomu 17. Tento protein je složen z několika domén: transaktivační (1-67), prolinové (67-98), centrální (98-303), lokalizační (*nuclear localisation signal-containing region*; 303-323), oligomerizační (323-363) a C-terminální domény (363-393), přičemž centrální doména je zodpovědná za vazbu ke specifickým sekvencím DNA v blízkosti promoterové oblasti p53 cílových genů (Cho et al., 1994). Na rozdíl od jiných transkripčních faktorů obsahuje také druhou DNA vazebnou (C-terminální) doménu, pomocí které vytváří stabilní komplexy s nesespecifickými sekvencemi jako jsou jednoduché či dvojitě zlomy DNA nebo nesprávně párovaná DNA (Bakalkin et al., 1995; Lee et al., 1995). Fosforylace na Ser<sup>392</sup> lokalizovaném v této doméně zvyšuje schopnost p53 vázat se na specifické sekvence DNA (Criswell et al., 2003).

Protože fosforylace a defosforylace p53 může kriticky ovlivnit osud buňky, je zapotřebí velmi účinných regulačních mechanismů. Regulace aktivity p53 po expozici IZ (ne však UV-zářením) je do velké míry závislá právě na ATM a může být kontrolována třemi způsoby: a) pomocí subcelulární lokalizace; b) zpětnou vazbou - proteolytickou degradací zprostředkovanou ubiquitinem; c) pomocí allosterické modulace na hlavní DNA vazebné doméně (Criswell et al., 2003).

Jelikož p53 působí v jádře, je změna subcelulární lokalizace logickým způsobem regulace jeho aktivity. Přenos do cytoplazmy však vyžaduje předchozí spojení s ubiquitinem (*targeting*), který je zprostředkován onkoproteinem Mdm2, tedy E3 ubiquitin ligasou (Honda et al., 1997; Boyd et al., 2000). Mdm2 je esenciální pro efektivní degradaci p53 (Roth et al., 1998) a *in vitro* bylo prokázáno, že je fosforylován na Ser<sup>166</sup> a Ser<sup>395</sup> způsobem závislým na



**Obr. 1. Schema ATM-p53 dependentní dráhy a ovlivnění G2 kontrolního bodu buněčného cyklu. Převzato z [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com).**

ATM (Khosravi et al., 1999; Maya et al., 2001). Současný model vnímá p53 a Mdm2 v pevné autoregulační vazbě. Protein p53 indukuje transkripci Mdm2 a ten se obratem váže na N-konec p53, čímž znemožní další transkripční aktivity a podpoří jeho degradaci (Michael & Oren, 2003).

Pokud je buňka vystavena stresu indukujícímu tvorbu DSB jako je IZ, je tato pevná vazba přerušena a p53 je fosforylován s cílem blokovat efekt Mdm2. Model p53-Mdm2 je kontrolován přímo fosforylací p53 na Ser<sup>15</sup> a nepřímo fosforylací na Ser<sup>20</sup>, kterou zajišťuje

Chk-2 aktivovaná opět ATM na Thr<sup>68</sup> (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Hirao et al., 2000; Matsuoka et al., 2000). Tyto fosforylace stabilizují p53, činí jej odolnějším vůči inhibičním efektům Mdm2 a navíc podněcují jeho transkripční aktivitu (Shieh et al., 1997; Chehab et al., 1999).

Transkripční aktivitu p53 také podporuje 53BP1 (p53-vazebný protein 1). Obsahuje dvě BRCA1 C-koncové domény pro vazbu s p53 a jednu doménu zodpovědnou pro vazbu s fosforylovaným histonem H2A.X, která je nutná pro retenci 53BP1 v místě DSB (Mochan et al., 2004). Jeho největší význam spočívá v tvorbě IRIF důležitých pro reparaci DSB a v nádorové supresi (Schultz et al., 2000; Ward et al., 2003).

Hlavním transkripčním cílem p53, který ovlivňuje G1/S blok, je protein p21 (WAF1/Cip/Sdi1), který spolu s p27 a p57 tvoří rodinu proteinů sdílejících schopnost inhibovat celou řadu cyklin-dependentních kinas (cdk; Schwartz, 2002).

G1/S kontrolní bod je kontrolován interakcí proteinu rodiny E2F (*essential transcription factors*) s pRb (*retinoblastoma susceptibility protein*). E2F je asociován s DNA v promoterové oblasti; defosforylovaný pRb se k němu pevně váže a atrahuje do svého okolí histondeacetylasy - enzymy odstraňující acetylové skupiny z N-konců histonů. Deacetylase histonů indukuje jejich komprimaci a díky sevřené prostorové konformaci je znemožněn přístup dalších molekul a nemůže dojít k transkripci určitých genů. Proto dochází za přítomnosti defosforylovaného pRb k represi specifických genů potřebných k progresi buněčného cyklu a kontrolní bod je uzavřen. Pokud však p21 neinhibuje cdk4 a cdk6, mohou se spojit s cyklinem D-typu a indukovat fosforylaci pRb. Ten disociuje z komplexu s E2F a buněčný cyklus může pokračovat (Pollard & Earnshaw, 2002).

Mimo zástavy buněčného cyklu disponuje p21 dalšími antiproliferativními funkcemi jako je podpora diferenciací a buněčného stárnutí (Child & Mann, 2006) a je také schopen modulovat apoptózu interakcí s kaspasou-3 (Suzuki et al., 1998; 1999).

ATM reguluje kromě G1 bloku také vnitřní blok S-fáze, který podmiňuje fenotyp tzv. radiorezistentní DNA syntézy. Tento jev byl poprvé identifikován u A-T pacientů jako neschopnost suprese replikace DNA v rámci odpovědi na poškození DNA způsobené IZ (Löbrich & Jeggo, 2005). U tohoto kontrolního bodu Chk-2 (aktivovaná přes ATM) fosforyluje fosfatasu Cdc25A, což vede k její vazbě na 14-3-3 protein a degradaci Cdc25A (Falck et al., 2001). Degradovaná Cdc25A pak nemůže fosforylovat cdk2, bez čehož nemůže dojít k syntéze DNA. Falck et al. (2001) ukázali, že mutace v ATM/Chk-2/Cdc25A/cdk2 cestě vedou k neschopnosti buněk inhibovat syntézu DNA. Stejná skupina také přinesla důkaz

o tom, že existuje paralelní cesta, kterou ATM kontroluje vnitřní blok S-fáze, vyžadující MRN komplex (Falck et al., 2002).

Posledním kontrolním bodem buněčného cyklu regulovaným ATM je G2/M bod, nutný pro blok buněk, které byly v čase ozáření v G2-fázi. Procesy v tomto bloku jsou závislé na Chk-1 a Chk-2. Jejich aktivní formy mohou inhibovat aktivaci fosfatasy Cdc25C. Bez aktivní Cdc25C nedochází k aktivaci cyklinu B1 a cdk1 a k progresi buněčného cyklu (Lukas et al., 2004).

ATM tedy prostřednictvím fosforylace ovlivňuje celou řadu cílových molekul. Kromě výše zmíněných se účastní zástavy buněčného cyklu také Nbs1, Brca1, FancD2 a SMC1 v přechodném bloku S-fáze (Taniguchi et al., 2002; Yazdi et al., 2002; Xu et al., 2002) a Brca1 a Rad17 v G2/M kontrolním bodu (Xu et al., 2001; Bao et al., 2001). V této práci jsme se zabývali aktivací ATM a jejích substrátů spojených s G1 kontrolním bodem (p53, Mdm2 a Chk-2). ATM kontroluje nejen průběh buněčného cyklu, ale přes p53 zasahuje i do kontroly reparace poškozené DNA a programované buněčné smrti. Proto jsme se věnovali i dalším substrátům ATM jako jsou histon H2A.X a proteiny spojené s reparací DNA - proteiny komplexu Mre11/Rad50/Nbs1 (viz níže).

### 2.1.2 Reparace DNA a vliv kofeinu

Při aktivaci ATM po ozáření hraje hlavní roli rychlá intermolekulární fosforylace na Ser<sup>1981</sup>, která způsobuje disociaci inaktivního dimeru a spouští aktivitu ATM (Bakkenist & Kastan, 2003). Pro její aktivaci je však zapotřebí také specifického komplexu proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 neboli MRN komplexu (Uziel et al., 2003). Tento komplex je vlastním senzorem DSB a bylo prokázáno, že bez něj ATM aktivována není a že mutace komponentů MRN vedou ke genetickým poruchám jako jsou neurologické abnormality, radiosenzitivita, defekty buněčného cyklu, genomová nestabilita a nádorové predispozice (Lavin, 2004). MRN komplex je asociován s chromatinem během replikace DNA a je schopen rozpoznat DSB a předat tuto informaci ATM tím, že atrahuje ATM k poškozeným molekulám DNA (Lee & Paull, 2005).

Důležitým poznatkem je skutečnost, že Nbs1 je sice postradatelný pro aktivaci ATM, ale jeho C-terminální motiv je nutný pro lokalizaci ATM v místě poškození (Falck et al., 2005). Velmi neobvyklé autosomálně recesivní onemocnění „*Nijmegen Breakage Syndrome*“ je charakterizované mikrocefalií, imunitní deficiencí a predispozicí k hematologickým maligním onemocněním. Syndrom je způsoben mutací Nbs1 genu (Digweed & Sperling, 2004). Rad50 zase působí jako ochranný chromozomální faktor. Brání nadměrně rychlému

zkracování telomer a tzv. *end-to-end* spojování konců sesterských chromatid (Vannier et al., 2006). Jednotlivé proteiny MRN komplexu také vzájemně regulují svou aktivitu. Například Nbs1 atrahuje Mre11 do jádra a Mre11 zase zvyšuje stabilitu Nbs1 (Löbrich & Jeggo, 2005). Ghosal et al. (2007) ve své studii provedené na kvasinkách informovali, že Mre11 vykazuje specifickou endonukleasovou aktivitu na DNA s DSB a Rad50 tuto endonukleasovou aktivitu blokuje. Proto navrhli, že vytvoření komplexu mezi Mre11 a Rad50 je důležité pro zamezení nepatříčného štěpení DNA a udržení délky telomer.

Radiosensitivita A-T buněk tkví v jejich snížené schopnosti opravit poškozenou DNA (Taylor, 1978). Dva základní mechanismy podílející se na reparaci DSB jsou nehomologní spojování konců (*non-homologous end-joining* - NHEJ) a homologní rekombinace (HR), přičemž prvně jmenovaný je v savčích buňkách dominantní (Jeggo, 1998). Na rozdíl od HR, která se řídí homologní sekvencí DNA, při NHEJ je prezenze homologního templátu vyžadována minimálně (Haber, 2000).

NHEJ je mechanismus, který je využíván především k reparaci v G1 a časně S-fázi, ale je aktivní v průběhu celého buněčného cyklu (Ma et al., 2005). Jeho nevýhodou je, že může docházet ke značnému počtu irelevantních spojů v případě, že tento aparát přesně nerozpozná, které části DNA mají být spojeny. V *Saccharomyces cerevisiae* se NHEJ účastní přinejmenším čtyři molekuly (Ku70, Ku80, DNA ligasa IV a XRCC4) jakožto hlavní reparační proteiny (Smith & Jackson, 1999).

Centrální součástí systému je heterodimerní komplex DNA-dependentních proteinkinas Ku70/Ku80, který zajišťuje iniciaci NHEJ. Pomocným proteinem je XRCC4 (*X-ray cross complementing*), který byl objeven ve vysoce radiosenzitivních liniích s defektní reparací DSB (Thacker & Zdzienicka, 2003). Tento protein se spojuje s DNA ligasou IV v komplex důležitý mimo jiné pro neurogenezi. U myši bez genu pro XRCC4 nebo DNA ligasu IV se rozvíjí masivní apoptóza neurálních buněk. Mutace buněčné linie fibroblastů 180BR (odvozena od pacienta s lymfatickou leukémií) vedoucí ke zvýšené radiosenzitivitě, byla spojena právě s DNA ligasou IV a neschopností reparovat radiační poškození pomocí NHEJ (Riballo et al., 1999).

Systém HR využívá homologní sekvenci DNA jako nepoškozenou matici, podle které opětovně spojí DSB, což umožňuje opravu a správné spojení konců DNA. HR probíhá od pozdní S- do G2-fáze, kdy dochází přednostně k rekombinaci mezi replikovanými chromatidami, neboť tehdy jsou k dispozici identické sekvence (Reliene et al., 2007). Klíčový pro realizaci je komplex MRN.

ATM zasahuje do tohoto reparačního procesu také účastí na fosforylaci a asociaci s proteinem BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene product*). BRCA1 je také fosforylován ATM nepřímo (přes Chk-2), aby se mohl následně spojit s proteinem Rad51 (Lee et al., 2000). Ten katalyzuje ATP-dependentní párování a výměnu vláken mezi homologními úseky DNA a jeho aktivitu moduluje fosforylací další ATM podřízený substrát, c-Abl (Yuan et al., 1998). ATM zřejmě také participuje na HR prostřednictvím modulace struktury chromatinu a/nebo změnou fosforylace a acetylace histonů. ATM po ozáření asociuje s chromatinem a také s histondeacetylasami, čímž usnadňuje přístup HR proteinů k místům poškození DNA (Khanna et al., 2001).

Velmi časný krok v odpovědi na poškození DNA je fosforylace histonu subtypu H2A, třídy H2A.X. Je to děj, který mohou nezávisle na sobě provést dvě kinasy - ATM a DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PK) - a proto je pozorován i v A-T buněčných liniích (Stiff et al., 2004). Fosforylovaný H2A.X na Ser<sup>139</sup> ( $\gamma$ H2A.X) může být vhodnou protilátkou vizualizován za pomoci imunofluorescence jako diskretní skvrna (fokus), a bylo zjištěno, že je lokalizován v oblasti do  $2 \times 10^6$  bazí od místa DSB (Rogakou et al., 1999). Ačkoliv H2A.X není pro NHEJ a HR savců esenciální, zdá se, že obě cesty významně moduluje (Bassing et al., 2002). Spíše než pro vazbu je  $\gamma$ H2A.X zřejmě nutný pro retenci některých proteinů účastnících se na reparaci DNA a sestavení reparačního komplexu v místě DSB (Celeste et al., 2002).

Z výše uvedeného přehledu není pochyb o významu ATM v molekulárních cestách aktivovaných po ozáření nejen nádorových buněk. IZ vyvolává její aktivaci a je také jedním z nejrozšířenějších prostředků protinádorové terapie. Významným krokem v radioterapii je však hledání dalších agens, které mohou zvýšit senzitivitu buněk k cytotoxickým účinkům IZ. Farmakologické zrušení G2 kontrolního bodu by mohlo být jednou z potenciálních možností, jak zvýšit efekt radioterapie, jelikož by u buněk nedošlo k zástavě buněčného cyklu potřebné pro reparaci poškozené DNA.

Jednou z látek, které disponují touto vlastností, je kofein. U něj byla prokázána schopnost zrušit blok v G2/M přechodu na široké škále buněk (např.: Jacquet et al., 1995; Vávrová et al., 2003; Wang et al., 2007). Mechanismus působení kofeinu není zcela znám. Podle autorů Tempela & Zallinger (1997) je efekt kofeinu pravděpodobně podložen tvorbou aduktů s DNA. V současné době převládá názor, že kofein inhibuje ATM a také ATR (*ATM-related*) kinasu, ovšem nejsou to jediné enzymy, které inhibuje; většina jeho fyziologických účinků je vysvětlována interakcí s cAMP fosfodiesterasou (Kaufmann et al., 2003).

Míra inhibice ATM je závislá na koncentraci kofeinu. V této práci jsme používali koncentraci 2 mmol/l, což je koncentrace, při níž kofein ještě efektivně ruší G2 blok buněčného cyklu a zvyšuje cytotoxicitu IZ, ale sám ještě není toxický (Sarkaria et al., 2003). Efekt kofeinu se specificky vztahuje na G2 blok; například Kaufmann et al. (2003) prokázali, že za podmínek, při nichž kofein zrušil zářením indukovaný G2 blok, ke G1 bloku nedochází.

DSB jsou letální formou poškození DNA navozenou pomocí IZ. Poškození je tak závažné a složité, že každý čas poskytnutý buňkám „navíc“ přispívá k efektivní opravě a zvyšuje pravděpodobnost jejich přežití. Zisk jedné či dvou hodin pro reparaci před vstupem do mitózy, kdy kondenzace chromosomů již trvale blokuje další opravu, je tedy jasným benefitem. Jak prokázala řada studií, použití kofeinu či podobných inhibitorů G2 bloku jako je UCN-01 (Russel et al., 1995; Wang et al., 1996) zdvojnásobilo toxicitu IZ u lidských nádorových buněčných linií. I v této práci jsme se zabývali kombinovaným vlivem IZ a kofeinu na molekulární signalizaci a reparaci poškození DNA (ATM-p53 signální dráha) a indukci apoptózy u leukemických buněk MOLT-4.

## **2.2 Apoptóza**

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza je proces buněčného zániku s charakteristickými morfologickými rysy, který je důležitý jak pro embryonální vývoj a udržení buněčné homeostázy, tak pro patogenezi mnoha nemocí (Thompson 1995; Vaux & Korsmeyer, 1999). V boji s těmito onemocněními může být vhodně indukovaná apoptóza užitečnou zbraní, je však zapotřebí detailně porozumět jejím mechanismům na molekulární úrovni. Ke spuštění apoptózy je zapotřebí specifických impulsů, které vedou na rozdíl od nekrózy nikoli k zánětu a dalším patologickým stavů, nýbrž k organizovanému štěpení důležitých celulárních komponent, jehož výsledkem je zabalení buňky do neškodné formy - apoptotického tělíska. Tyto stimuly jsou buď fyzikální (IZ, UV-záření, teplota) nebo chemické (specifické smrtící ligandy, nedostatek růstových faktorů a celá řada chemikálií).

V inicializaci tohoto geneticky uchovávaného programu smrti mají hlavní slovo dva základní mechanismy, a to vnější, která zprostředkovává přenos signálu do nitra buňky membránovým receptorem smrti, a vnitřní, iniciovaná vznikem DSB, kde hrají důležitou roli mitochondrie. Oba tyto mechanismy vedou k zásadnímu a pro apoptózu charakteristickému ději. Tím je aktivace specifických proteas, kaspas, které jsou označovány za exekutory apoptózy. Jsou zodpovědné za zánik buňky (štěpení strukturálních, jaderných a dalších proteinů) a výsledný morfologický obraz (Thornberry & Lazebnik, 1998).

### 2.2.1 Receptorový mechanismus spouštění apoptózy

Pro spuštění apoptózy receptorovou cestou je zásadní přítomnost tzv. smrtících receptorů (*Death Receptors*) na povrch buněčné membrány, které vážou specifické smrtící ligandy (*Death Ligands*). Tyto ligandy patří do rodiny faktorů TNF (*Tumor Necrosis Factors*). Nejznámějšími jsou TNF $\alpha$ , TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), FasL (též CD95L) a TWEAK (*TNF-like WEAK inducer of apoptosis*; Locksley et al., 2001). Po navázání ligandy dochází k trimerizaci odpovídajícího receptoru, k čemuž je využívána sekvence sedmdesáti až osmdesáti aminokyselin, zvaná doména smrti (*Death Domain*, DD). Změna prostorové konformace působí zvýšení afinity a navázání tzv. adaptorového proteinu TRADD (*TNF-receptor-1 Associated DD*) a/nebo FADD (*Fas-Associated DD*). Adaptorové proteiny však obsahují ještě další interakční motiv. Jde o efektorovou doménu smrti (*Death Effector Domain*, DED), na níž se váže inaktivní proteasa, prokaspasa-8 (viz dále). Takto obsazený receptorový trimer s adaptorovými proteiny a prokaspasou-8 se nazývá smrt indukující signální komplex (*Death Inducing Signaling Complex*, DISC).

### 2.2.2 Rodina kaspasových enzymů

Esenciálním krokem exekuční fáze apoptotického programu je kaskádovité štěpení a aktivace cystein-aspartátových proteas, kaspas. V intaktních buňkách jsou minimálně aktivní, uchovávané ve formě zymogenů, které vyžadují specifickou enzymatickou aktivaci. Během té je z kaspasového prekursoru postupně odštěpena nekatalytická doména a dvě katalytické podjednotky (cca 10 a 20 kDa; Muzio et al., 1998). Katalytické podjednotky se spojují v tetramer - aktivní kaspasu. Každá kaspasa má dvě aktivní místa; jedno s hlubokou kapsou vázající aspartát substrátu (P<sub>1</sub>) a druhé s širší a mělčí kapsou vázající tři předcházející aminokyseliny (P<sub>2</sub> - P<sub>4</sub>), které je specifické pro každou jednotlivou kaspasu (Miller et al., 1997; Thorberry et al. 1997).

Kaspasy mohou být rozděleny na iniciační, zahrnující tzv. apikální kaspasy -2, -8, -9, -10 a pravděpodobně i -11 a exekuční, mezi než řadíme kaspasu-3, -6 a -7 (Philchenkov, 2004). Aktivní iniciační kaspasy se objevují na začátku receptorové cesty a jsou charakterizovány přítomností rozsáhlých N-terminálních domén DED nebo CARD (*caspase recruitment domain*). Pomocí nich kaspasy váží specifické konstrukční nebo adaptorové proteiny, např. TRADD a FADD, které jsou komplementárně nabitě (Liang & Fesik, 1997). Ty zajišťují blízkost kaspas, umožňující autoproteolytický způsob aktivace prokaspasových molekul (Robertson et al., 2002).



Zmiňovaným proteolytickým štěpením v komplexu DISC se štěpí prokaspasa-8 v aktivní iniciační kaspasu-8 a ta zesiluje a přenáší smrtící signál dál k exekučním kaspasám. Exekuční kaspasy jsou efekторы apoptózy a štěpí buněčné substráty. Jsou zodpovědné za celou řadu morfologických a biochemických rysů apoptózy jako rozklad jádra či cytoskeletu, formaci apoptotických tělísek, expozici fosfatidylserinu na povrch buňky, což je pro makrofágy signálem k fagocytóze, a další.

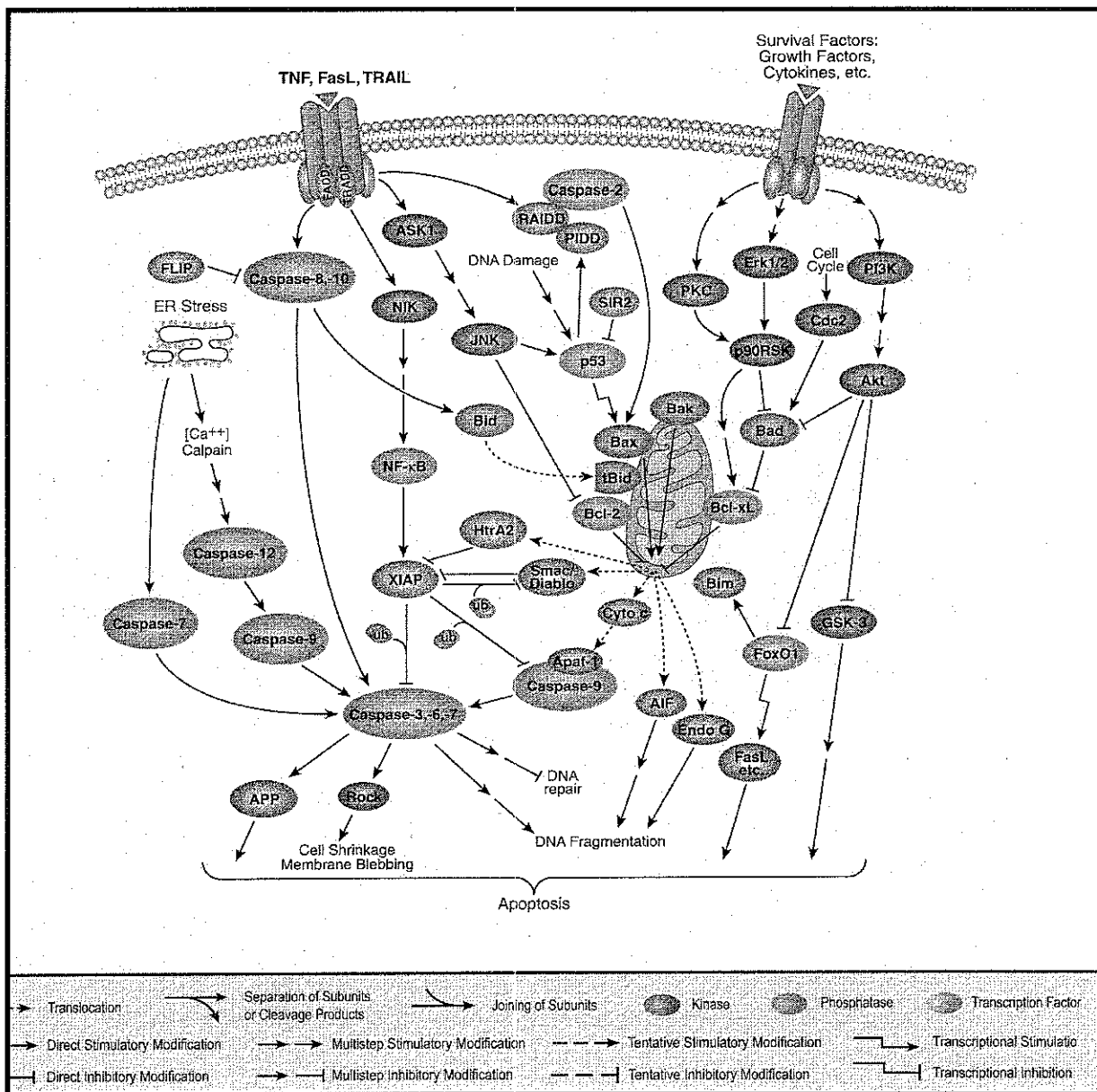
Receptorová cesta je tedy uplatňována prostřednictvím receptorů smrti a faktorů TNF rodiny. Existuje však také pozitivní zpětná vazba, kterou se tato cesta prolíná s mitochondriální cestou. K amplifikaci dochází v případě slabé iniciace kaspasy-8. Za těchto podmínek aktivuje kaspasa-8 proapoptotický protein Bid, který se translokuje na povrch mitochondrie a indukuje zde aktivaci vnitřní cesty (Belka & Budach, 2002). Proto je také hlavní regulace receptorové cesty spojena s homologem kaspasy-8, proteinem c-FLIP. Tento obsahuje vlastní DED a interaguje s adaptorovými proteiny receptoru smrti, ovšem není schopen štěpit další kaspasy a tím tuto cestu inhibuje (Medema et al., 1997). Kromě toho ještě může dojít ke kompetitivní inhibici IAP (tzv. proteiny inhibitory apoptózy; Shi, 2002).

### 2.2.3 Mitochondriální mechanismus spouštění apoptózy

Řada apoptotických stimulů nezávislých na receptorech smrti může spustit apoptózu vnitřní neboli mitochondriální cestou: IZ, UV-zářením, chemoterapeutika, viry, bakterie, nedostatek cytokinů a růstových faktorů či *anoikis* – oddělení od extracelulární matrix (Borner, 2003). Za určitých podmínek mohou i TNF faktory (přes kaspasu-8) spustit mitochondriální cestu.

Přesný mechanismus sice není znám, ale ví se, že vnější mitochondriální membrána se stává propustnou pro některé proteiny. A tyto po uvolnění z mitochondriální matrix vytvářejí podmínky potřebné pro aktivaci kaspasy-9. Nejznámější a nejprozkoumanější z mitochondriálních proteinů je cytochrom (cyt-c). Tento protein se evolučně téměř nezměnil a vyskytuje se v rostlinné i živočišné říši, ale i v jednobuněčných organismech. Cyt-c je stabilní, relativně malý hemoprotein (104 aminokyselin, 12 kDa) kovalentně vázící hem jako prostetickou skupinu. Jeho nejznámější biochemická role spočívá v přenosu jednoho elektronu mezi komplexem III a IV dýchacího řetězce (Skulachev, 1998).

Při indukci apoptózy však zastává neméně důležitou roli. Cyt-c byl identifikován jako faktor nutný ke spuštění apoptózy v extraktu HeLa buněk po přidání dATP (Liu et al., 1996).



© 2002 - 2007 Cell Signal

Obr. 2. Schema indukce apoptózy. Převzato z www.cellsignal.com.

Cyt-c se v cytoplazmě spojuje s doménou WD-40 proteinu Apaf-1 a tím indukuje ATP-dependentní oligomerizaci a formaci tzv. apoptosomu, velkého apoptosomálního komplexu (1,4 MDa). Tento komplex přitahuje kaspasu-9 a allostericky zvyšuje její aktivitu (asi tisíckrát). Aktivovaná kaspasa-9 pak štěpí prokaspasu-3 a -7 (Rodriquez & Lazebnik, 1999). K uvolnění cyt-c z mitochondrie dochází prostřednictvím mitochondriálního póru. Bylo zjištěno, že cyt-c působí na inositol-trifosfátové receptory na membráně endoplasmatického retikula a indukuje tak uvolnění Ca<sup>2+</sup>. Zvýšení hladiny Ca<sup>2+</sup> pak způsobuje spolu s dalšími

faktory (viz kap. 2.3.2.2) formou pozitivní zpětné vazby masivní uvolnění cyt-c (Breckenridge et al., 2003).

Kromě cyt-c se z mitochondrií uvolňují asi tři desítky dalších proteinů (Patterson et al., 2000). Patří mezi ně například Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) a serinová proteasa Htr2A/Omi, jejímž úkolem je zajistit sekvestraci a degradaci dalších cytoplazmatických proteinů - inhibitorů apoptózy. Oba tyto proteiny zabraňují jejich inhibičnímu působení vůči kaspasám (Van Loo et al., 2002). Nejdůležitějšími regulátory mitochondriální cesty jsou však proteiny rodiny Bcl-2 (Kutuk & Basaga, 2006).

### **2.3 Rodina proteinů Bcl-2**

V eukaryotických buňkách se vyskytuje asi 30 homologních proteinů rodiny Bcl-2, které mohou mít protichůdný vliv na osud buňky tím, že indukují nebo inhibují proces apoptózy. Závisí to na jejich strukturálních rysech, kterými jsou tzv. Bcl-2 homologní domény (BH). Proteiny podporující přežití obsahují všechny domény BH1, BH2, BH3 a BH4, na druhou stranu proteiny vedoucí buňku k zániku mohou obsahovat různé domény, ale nikdy jim nechybí BH3 (Fridman et al., 2001). Jejich klasifikace je odvozena od homologů kódovaných v *Caenorhabditis elegans* (hlíst, na kterém byly provedeny první apoptotické studie) a člení se do tří podskupin: a) antiapoptotické Bcl-2-příbuzné faktory přežití jako Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10 a Bcl-B; b) proapoptotické Bax-příbuzné faktory smrti jako Bax, Bak, Bok/Mtd a Bcl-x<sub>S</sub>; a konečně c) BH3-příbuzné proapoptotické faktory smrti mající jen doménu BH3 (tzv. BH3-onlies) jako Bid, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim<sub>L</sub>/Bod, Bad, Noxa, PUMA/Bbc3 a Bmf (Borner, 2003).

#### **2.3.1 Bcl-2-příbuzné faktory přežití**

Každý ze skupiny Bcl-2-příbuzných antiapoptotických faktorů obsahuje 3 až 4 homologní domény (BH1-BH4). Hlavním strukturálním rysem je hydrofobní kapsa tvořená doménami BH1-BH3, která je stabilizována na opačné straně N-terminální BH4 doménou (Aritomi et al., 1997). Petros et al. (2000) publikovali práci, kde popsali strukturu komplexu Bcl-x<sub>L</sub> s proapoptotickými faktory Bak a Bad. Poukázali na význam BH3 domény těchto faktorů, která má sice nahodilé uspořádání, pokud je protein v roztoku sám, ale má-li dojít ke spojení s Bcl-x<sub>L</sub>, zaujme tvar  $\alpha$ -šroubovice, jež přesně zapadne do hydrofobní kapsy, čímž je umožněna tvorba heterodi/oligomerů.

Ačkoli je tento model velmi atraktivní, ukázalo se, že antiapoptotické Bcl-2-příbuzné faktory jsou schopné tvořit komplexy i s proteiny, které neobsahují BH3 doménu. S výše uvedeným můžeme polemizovat na základě výsledků řady autorů.

Zaprvé, BH3 domény nejsou vždy a ve všech proteinech dostupné pro další proteiny (viz níže) a je zapotřebí posttranslačních modifikací a konformačních změn (Sattler et al., 1997). Za druhé, u celé řady proteinů (jako R-Ras, Raf-1, kalcineurin, Bap31, BAG-1/Hsc70 nebo p53 binding protein-2) byla také prokázána schopnost vázat Bcl-2-příbuzné faktory přežití přesto, že neobsahují BH3 doménu (Reed, 1998b). Za třetí, odhalení struktury Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> přineslo překvapivé zjištění, že tyto proteiny vykazují strukturální homologii s bakteriálními toxiny tvořícími póry jako jsou kolicin či toxin diftérie (Aritomi et al., 1997; Petros et al., 2001). Je tedy pravděpodobné, že Bcl-2-příbuzné faktory přežití mohou využít část své hydrofobní kapsy k jiným než vazebným účelům, zejména k formaci iontových či proteinových kanálů (Schendel et al., 1999).

Protein Bcl-2 může také zamezit peroxidaci lipidů vychytáváním kyslíkových radikálů (Hockenbery et al., 1993; Amstad et al., 2001) a inhibicí kaspas (Borner et al., 2003) a fungovat tak jako antioxidant. Navíc musíme brát v úvahu efekt dalších regulačních proteinů, které nejsou přítomny při vazbě proteinů v podmínkách *in vitro*.

Mechanismus vzájemné interakce je tedy zřejmě složitější. Víme však, že Bcl-2-příbuzné faktory přežití jsou zakotveny v intracelulárních membránách (mitochondriální, jaderné, retikulární) a fungují jako „vychytávače“ proapoptotických faktorů a na rozdíl od faktorů smrti tak činí bez výrazné změny v subcelulární lokalizaci (Borner, 2003).

### 2.3.2 Bax-příbuzné faktory smrti

Tuto podskupinu tvoří v savčích buňkách pouze tři proteiny. První, který byl izolován, byl pojmenován Bax (od *Bcl-2 associated protein X*, protože imunoprecipitoval spolu s Bcl-2 a také blokoval jeho aktivitu (Oltvai et al., 1993). Dva další homology jsou Bak a Bok/Mtd (Farrow et al., 1995; Inohara et al., 1998). Bax-příbuzné faktory smrti obsahují BH1-BH3 domény a jejich proapoptotické chování bylo původně spojováno s nepřítomností stabilizující domény BH4, jejíž absence by mohla spustit konformační změny, které by udělovaly molekule proapoptotickou aktivitu.

Nicméně dnes již víme, že existují i další bílkoviny jako Mcl-1 nebo A1, které neobsahují BH4 doménu a přitom jsou schopné působit ve smyslu přežití buňky a ne jako faktory smrti (Adams & Corry, 1998). Navíc Bcl-x<sub>L</sub> nemá BH1 a BH2 domény, ale nechybí mu BH4 motiv a působí antiapoptoticky (Boise et al., 1993). Na základě těchto poznatků je

nutno hledat příčinu proapoptotické aktivity Bax-příbuzných faktorů nikoli v jejich struktuře nýbrž v subcelulární lokalizaci.

### 2.3.2.1 Mitochondriální zacílení

Mitochondriální zacílení (*targeting*) označuje modifikaci struktury nutnou pro cílenou změnu subcelulární lokalizace proteinu z cytoplazmy do mitochondrie. Strukturální rozdílnost proteinů se zdá být krucální jak pro mitochondriální *targeting*, tak pro pozdější proapoptotickou aktivitu. Například šroubovice regionu BH3 proteinu Bax je méně stočena než v Bcl-x<sub>L</sub>, a proto je také více přístupná k vazbě s hydrofobní kapsou Bcl-2-příbuzných faktorů přežití (Sattler et al., 1997). Další zásadní rozdíl je v tom, že protein Bcl-2 má po syntéze volně přístupný kotvící C-konec, kterým je přichycen k mitochondriální membráně, kdežto Bax jej má stočený dozadu v hydrofobní kapse, a proto je jeho vazba na membránu znemožněna, alespoň dokud není C-konec exponován (Nechushtan et al., 1999). Mitochondriální *targeting* Bax, je určován nějakým neznámým proteinem či posttranslační modifikací, která odkryje segment  $\alpha$ , ale přesný mechanismus pro *targeting*, inzerci, oligomerizaci a vytvoření membránového póru na molekulární úrovni dosud není znám.

Jeden model popisuje Bax jako protein slabě vázaný k mitochondriální membráně s intaktní hydrofobní kapsou, který je udržován v neaktivním stavu neznámým inhibičním proteinem či specifickým lipidem. Další model zahrnuje změny konformace molekuly Baxu ve smyslu odkrytí BH3 domény, což umožní buď inhibiční efekt Bcl-2-příbuzných faktorů a buňka přežije nebo stabilní zabudování do mitochondriální membrány, oligomerizaci a/nebo interakci s napěťovým kanálem a přenašečem VDAC-ANT (*voltage-dependent anion channel - adenosine nucleotide transporter*). Následně vytvořeným pórem či kanálem je pak uvolněn cyt-c a dochází k aktivaci kaspasové kaskády (Borner, 2003).

### 2.3.2.2 Mechanismus působení Bax-příbuzných faktorů není zcela objasněn

Většina studií, které se zabývaly objasněním role rodiny proteinů Bcl-2 v apoptóze, byla zaměřena na mitochondrie. Důvodů bylo hned několik: při apoptotickém procesu dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, dále k uvolnění proapoptotických faktorů včetně cyt-c a k aktivaci kaspas po porušení integrity mitochondriální membrány (Fridman et al., 2001). Zdá se, že je to spíše důsledek formace kanálu a jeho pozdější řízené otevření než náhodná ruptura membrány.

Stále však není jasné, zda Bax interaguje s již existujícím kanálem nebo jej přímo tvoří. Takovým existujícím kanálem by mohl být tzv. PT-pór (*permeability transition*), jehož

hlavními komponenty jsou VDAC a ANT (viz výše) ve vnitřní membráně a cyklofilin D v mitochondriální matrix. Tímto pórem mohou projít pouze molekuly do 1,5 kDa a je možné, že Bax interaguje s PT-pórem tak, že zvětšuje jeho velikost až na 15 kDa a potom se jím mohou dostat ven i takové molekuly jako cyt-c (Zamzami & Kroemer, 2001). Ať už Bax-příbuzné faktory smrti formují póry nebo interagují s proteiny tvořícími póry, spolupracují s Bcl-2-příbuznými faktory přežití jako reostat života či smrti. Bcl-2-příbuzné faktory jsou C-koncem zakotveny v různých intracelulárních membránách, sekvestrují Bax faktory a vzájemným poměrem nastavují onen reostat směrem k proliferaci či apoptóze (Korsmeyer, 1992; 1993).

Nicméně přesný mechanismus působení Bax-příbuzných faktorů není zcela objasněn. Ba co víc, v literatuře můžeme nalézt spoustu kontroverzních faktů dokládajících, že způsob, kterým Bax-příbuzné faktory ovlivňují mitochondriální membránu, je velmi složitý. Například stále není jasné, zda oligomerizace Bax-příbuzných faktorů je nutná pro jejich proapoptotickou funkci nebo je to vedlejší efekt *in vitro* analýz, protože mutace předpokládané oligomerizační domény proteinů Bax a Bak jim překvapivě ponechala jejich proapoptotickou aktivitu (Borner, 2003).

Pozoruhodné bylo též zjištění, že jejich interakce s Bcl-2-příbuznými faktory může být spuštěna přítomností neiontových detergentů (např. Triton X-100) v extračním pufru (Hsu & Youle, 1997; 1998). Přesto jiné práce prokázaly, že Bax/Bcl-2 heterodimery se v buňkách vyskytují (Nechushtan et al., 2001).

### 2.3.3 BH3-příbuzné proapoptotické faktory smrti

Proapoptotické faktory smrti, které společně s ostatními členy Bcl-2 rodiny sdílejí pouze BH3 doménu, neboli BH3-onlies, fungují jako mediátory signálu smrti a senzory buněčné integrity (např. Bim pro integritu cytoskeletu, Bad pro nedostatek růstových faktorů, Bid jako senzor signalizace receptorového mechanismu; viz níže). Aby se předešlo nepatřičné aktivaci apoptotických signálních drah, jsou savčí BH3-příbuzné faktory udržovány v inaktivním stavu a jsou aktivovány jedním nebo několika následujícími mechanismy. Každý faktor je regulován rozdílně v závislosti na povaze proteinu a původu apoptotického stimulu.

Jedním mechanismem je indukce transkripce. Protein p53 je transkripční faktor, který indukuje expresi BH3-příbuzných faktorů smrti PUMA/Bbc3 a Noxa po poškození DNA chemoterapeutiky, IZ a UV-zářením (Lakin & Jackson, 1999). Nedostatek cytokinů či růstových faktorů (*anoikis*) nebo vazba ligand na receptory smrti může indukovat další způsoby aktivace BH3-příbuzných faktorů - posttranslační modifikace (fosforylace/defosforylace). Například fosforylovaný Bad je inaktivní a udržován v

cytoplazmě pomocným proteinem 14-3-3 (Zha et al., 1996). Defosforylace Badu řízená kalcineurinem (Wang et al., 1999) jej uvolní a umožní interakci s Bcl-2-příbuznými faktory přežití, čímž dojde ke spuštění apoptotického procesu.

Další aktivační mechanismus je založen na proteolýze. Týká se zejména Bidu, který není při spuštění receptorové cesty aktivní. Funkční kaspasa-8 štěpí Bid (22 kDa) na menší fragment, tzv. t-Bid (15 kDa) a odstraňuje tak N-terminální (inhibiční) doménu. Také se odhalí vazebné místo pro navázání miristoylového zbytku na N-konci (Zha et al., 2000), což způsobuje vysokou afinitu t-Bidu k mitochondriálnímu kardiolipinu (Lutter et al., 2000) a podněcuje mitochondriální *targeting* (Li et al., 1998). Navíc dochází ke změně náboje a mitochondriální membrána je jednou z nejvíce negativně nabitých biologických membrán (Burlacu, 2003). To vše přispívá k translokaci t-Bid k mitochondrii a jeho integraci do mitochondriální membrány. Zdá se, že t-Bid pak mění složení lipidů vnější mitochondriální membrány a ta je pak více permeabilní (Esposito, 2002).

Kromě toho je t-Bid schopen zrušit vazbu Bax-příbuzných faktorů na Bcl-2-příbuzné faktory a dále stimulovat oligomerizaci a membránovou inzerci Baxu a Baku (Desagher et al., 1999; Wei et al., 2000). Proapoptotická role Bidu je nesporná, avšak pravděpodobně vysoce závislá na typu buněk (Yin et al., 1999). Bid může být navíc štěpen i jinými kaspasami (Li et al., 1998) a dokonce i nekaspasovými proteasami jako je katepsin B (Stoka et al., 2001). K tomuto štěpení ale dochází až po mitochondriální perforaci a má význam jako pozitivní zpětná vazba.

Poslední způsob aktivace vychází z faktu, že BH-3 příbuzné faktory smrti jsou v buňce vázány v inaktivním stavu na důležité makromolekulární struktury jako stresové senzory. Například Bim je vázán na dynein mikrotubulů. V přítomnosti taxolu polymerizujícího mikrotubuly se Bim uvolňuje a váže se s Bcl-2/ Bcl-x<sub>L</sub> (Puthalakath et al., 1999).

Obecně se dá říci, že když jsou BH3-příbuzné proapoptotické faktory posttranslačně aktivovány, interagují s Bcl-2-příbuznými faktory přežití a inaktivují je tak, aby nemohly zabránit oligomerizaci Bax-příbuzných faktorů smrti. Tyto volné Bax-příbuzné faktory pak mohou podléhat určitým konformačním změnám a následně naruší vnější mitochondriální membránu, což má za následek uvolnění dalších proapoptotických a kaspasy aktivujících faktorů (Lettaí et al., 2002).

V této práci jsme se zabývali proteiny Mcl-1 (zástupce antiapoptotických) a Bid (zástupce proapoptotických členů Bcl-2 rodiny), cytochromem c a iniciačními kaspasami-8 a -9, abychom zhodnotili jejich chování a funkci v apoptóze indukované IZ v lidských leukemických buňkách.

## 2.4 Ionizující záření a biodozimetrie

V této práci jsme pracovali s IZ typu gama ( $^{60}\text{Co}$ ), které má povahu velmi krátkých elektromagnetických vln schopných ionizovat hmotu. Jeho fotony vyzařované atomovými jádry interagují s orbitálními elektrony hmoty za vzniku ionizace (Comptonův jev) či excitace atomu (fotoelektrický jev). V elektrickém poli se chovají neutrálně (Österreicher & Vávrová, 2003).

Účinek IZ lze z časového hlediska rozdělit na tři fáze. Nejdříve probíhá vlastní interakce s organismem, tj. fyzikální fáze. Na toto období navazuje chemická fáze, kdy dochází k produkci volných radikálů reagujících se všemi komponentami ozářených buněk. Poslední je fáze biologická, která zahrnuje odpověď na úrovni molekulární, buněčné, tkánové, orgánové i na úrovni organismu jako celku. Klíčovou makromolekulou, jejíž radiační poškození může mít za následek smrt buňky, je DNA (viz kap. 2.1). V důsledku ozáření dochází k poklesu replikační i transkripční aktivity (Österreicher & Vávrová, 2003).

Radiační poškození DNA má vážné biologické důsledky. Jelikož v současnosti narůstá význam IZ v medicíně či průmyslu ale i riziko teroristického zneužití, narůstá i nebezpečí, že bude záření vystavena osoba bez osobního dozimetru. Proto stoupá i význam biodozimetrie. Tento obor využívá nejrůznějších molekulárních technik pro zpětný odečet dávky, který absorboval daný biologický systém.

Již v roce 1975 charakterizoval Dostál lymfocyty jako droboučké biologické dozimetry, které se zcela náhodně pohybují a rozdělují po organismu. Ozáření lymfocytů vede k zlomům DNA a vzniku chromosomových a chromatidových aberací. K nejčastějším aberacím patří vznik dicentrických a kruhových chromosomů. Takovéto chromosomy jsou po obarvení dobře viditelné a jejich hodnocení je součástí metody užívané ke stanovení obdržené dávky záření, která patří k tzv. zlatému standardu biologické dozimetrie již mnoho let. Obecně je akceptováno, že touto metodou je možno měřit dávky od 0,25 Gy; je však třeba analyzovat alespoň  $10^3$  buněk (Blakely et al., 2002). Metoda má některé svoje limity. Především je po vyšších dávkách těžké nalézt tak velké množství buněk v mitóze, protože dochází k oddálení mitózy (blok v některé fázi buněčného cyklu, jako reakce na poškození buňky), interfázové smrti lymfocytů a jejich depleci.

Pro stanovení DNA mutací a chromosomálních aberací lze využít také interfázových lymfocytů. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je metoda, kterou lze stanovit nejen dicentricky, ale také translokace. V biodozimetrii mohou být využity některé další metody jako např. řetězová polymerázová reakce (PCR), kdy touto metodou mohou být analyzovány



mutace DNA na lidských lymfocytech. PCR technologie umožňuje detekovat přítomnost mutací v relativně malých množstvích. Prasanna et al. (2002) popsali metodu *in situ* PCR ke kvantifikaci mutací mitochondriální DNA na interfázových lymfocytech. Významným limitem, který je společný pro všechny zmiňované metody, je velká časová i technická náročnost.

IZ vede ke změnám genové a proteinové exprese, které by mohly být využity jako biologické indikátory obdržené dávky, zejména při ozáření nízkými dávkami záření (Blakely et al., 2002). Jedná se především o expresi genů spojených s indukci apoptózy případně onkogenů či tumor-supresorových genů. Proto jsme se v této práci kromě molekulárních mechanismů zabývali i hodnocením dávkových závislostí studovaných proteinů. Významným limitem, který je společný pro všechny zmiňované biodozimetrické metody, je velká časová i technická náročnost. Z toho důvodu jsme se snažili použít metody technicky nenáročné a jednoduše aplikovatelné.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem této studie bylo zjistit, jaké signální dráhy vedou k reparaci poškození DNA a následně ke spuštění apoptózy lidských leukemických buněk po působení fyzikálních (ionizující záření) a chemických (kofein) faktorů. Použité buněčné linie se liší expresí proteinu p53 (T-lymfocytární MOLT-4 - p53-pozitivní a promyelocytární HL-60 - p53-negativní) a předpokládáme tedy i rozdílné molekulární mechanismy odpovědi na ozáření. Jednotlivé cíle byly stanoveny takto:

- objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí signalizace a reparace poškození DNA,
- objasnit molekulární mechanismy, které stojí v pozadí následné indukce apoptotického procesu,
- zhodnotit chování proteinů účastnících se zmíněné signalizace v kontextu obdržené dávky s ohledem na využití v biologické dozimetrii.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 *Buněčné kultury a kultivační podmínky*

Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 a T-lymfocytární leukemie MOLT-4 jsme získali z evropské sbírky buněčných kultur (European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány v Iskově modifikaci Dulbeccova media (Sigma, Saint Luis, MS, USA - přidáno 20% fetální bovinní sérum, 0,05% L-glutamin, 150 UI/ml penicilin, 50 µg/ml streptomycin) ve vlhčeném inkubátoru při 37 °C a v kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Kultury byly rozděleny každý třetí den ředěním na koncentraci  $2 \times 10^5$  bb/ml. Buňky byly spočítány s použitím hemocytometru; integrita buněčné membrány byla stanovena technikou barvení trypanovou modří. V této práci byly použity buňky, které prošly maximálně 20 pasážemi.

### 4.2 *Gama ozáření*

Exponenciálně rostoucí buňky byly suspendovány v koncentraci  $2 \times 10^5$  bb/ml. Aliquoty 10 ml buněčné suspenze byly v lahvičkách (Nunc - 25 cm<sup>2</sup>) ozářeny při pokojové teplotě za použití zářiče <sup>60</sup>Co dávkovým příkonem 0,4 - 0,5 Gy/min, ze vzdálenosti 1 m od zdroje. Po ozáření byly lahvičky umístěny do inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a alikvotní části byly odebrány v různých časech. Pro následnou analýzu byly buňky spočítány a viabilita byla určena metodou barvení Trypanovou modří.

V experimentech s medikamentózním ovlivněním, byl 30 min před ozářením do kultivačních nádob s buňkami přidán kofein (Sigma, Saint Luis, MS, USA). Kofein byl rozpuštěn v čerstvém médiu těsně před experimentem tak, aby finální koncentrace byla 2 mmol/l.

### 4.3 *Elektroforéza a Western blotting*

Buňky byly v různých časech po ozáření promyty PBS a zlyzovány. Celobuněčné lyzáty byly připraveny lýzou v 500 µl lyzačního pufru (137 mmol NaCl, 10% glycerol, 1% n-oktyl-β-glukopyranosid, 50 mmol NaF, 20 mmol Tris, pH=8, 1 mmol Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 tableta Complete<sup>TM</sup> Mini, Roche, Mannheim, GER). Mitochondriální frakce byla připravena za použití Mitochondria Isolation kitu (Pierce, Rockford, IL, USA) podle návodu dodaného výrobcem. Vzorky obsahující ekvivalentní množství proteinu (30 µg) byly nanесeny na 10-12% SDS polyakrylamidový gel.

Po skončení elektroforézy (200 V, 240 mA, 50 min) byly proteiny přeneseny (100 V, 250 mA, 120 min) na polyvinylidfluoridovou membránu (Immun-blot PVDF for Protein Blotting, Bio-Rad, Herkules, CA, USA) a hybridizovány s příslušnou protilátkou; tj. anti-ATM (Ser<sup>1981</sup>) klon 10H11.E12 - 1:250, anti-Chk-2 (Thr<sup>68</sup>) - 1:250, anti-COX IV - 1:2.000, anti-Mdm2 (Ser<sup>166</sup>) - 1:1.000, anti-Mre11 - 1:1.000 a anti-Nbs1 (Ser<sup>343</sup>) - 1:250 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA); anti-p53 1:1.000 a anti-p53 (Ser<sup>392</sup>) - 1:1.000 (Exbio, Prague, CZE); anti-p53 (Ser<sup>15</sup>) - 1:1.000 (Calbiochem, San Diego, CA, USA); anti-lamin B - 1:750 (Oncogene, Cambridge, MA, USA); anti-Bid - 1:1.000 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA); anti-kaspasa-8 - 1:500, anti-kaspasa-9 - 1:250 a anti-Nbs1 klon EE15 - 1:500 (Upstate, Chicago, IL, USA); anti-Mcl-1 - 1:1.000, anti- $\beta$ -aktin - 1:10.000, anti-p21 klon CP74 - 1:500 a anti-Rad50 - 1: 500 (Sigma, Saint Luis, MS, USA); anti-cytochrom c klon 7H8.2C12 - 1:1.000 (NeoMarkers, Westinghouse, CA, USA).

Po promytí v TBS (250 mmol Tris-HCl, pH=7,4) byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidasou (1:1.000 - 1:10.000 podle dané protilátky; Dako, High Wycombe, UK) a signál byl vyvinut pomocí chemiluminiscenčního kitu (BM Chemiluminiscence - POD, Roche, Mannheim, GER) a exponován na film (Foma, Hradec Králové, CZE).

Filmy byly naskenovány na skaneru Expression 1680Pro (Epson, Long Beach, CA, USA) densitometricky analyzovány v programu ImagePro 5.1 (MicroImage, MD, USA). Densita skvrn byla vypočítána jako integrovaná optická densita dané oblasti.

#### ***4.4 Průtoková cytometrie***

##### **4.4.1 Stanovení apoptózy pomocí vazby annexinu V**

Promytá buněčná suspenze byla resuspendována ve vazebném pufru a značena annexinem V konjugovaným fluorescein isothiokyanátem (annexin V-FITC) a propidium iodidem (PI) z APOPTTEST kitu (DakoCytomation, Glostrup, DEN) podle instrukcí výrobce. Poté byla podrobena analýze na průtokovém cytometru Coulter Electronic (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) a/nebo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

##### **4.4.2 Analýza obsahu DNA a analýza buněčného cyklu**

Jedním z časných dějů při apoptóze je aktivace endonukleas, které preferenčně štěpí DNA v internukleosomální (spojovací) sekci. Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství

DNA v buňce a z tohoto důvodu vznik tzv. "sub-G1 vrcholu", který tvoří apoptotické buňky. Přibližně  $5 \times 10^5$  buněk v buněčné suspenzi bylo dvakrát promyto ledovým PBS, fixováno v 70% ethanolu (minimálně 30 min při 4 °C). Po centrifugaci (200 g, 10 min, 4 °C) a odstranění ethanolu byly buňky promyty ledovým PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml fosfátového pufru (192 ml 0,2 mmol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 8 ml 0,1 mmol kyseliny citrónové, pH=7,8) a inkubovány 5 min při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Nakonec byly buňky barveny v 0,5 ml Vindelova roztoku (1 ml 1 mol Tris, pH=8, 1mg RNAsy, 100  $\mu\text{l}$  TRITON, 60 mg NaCl, 5 mg PI a destilovaná voda do 100 ml (Vindelov, 1977) v termostatu 1 hod při 37 °C a dále podrobeny analýze na průtokovém cytometru Coulter Electronic (Hialeah, FL, USA). V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk. Takto získané výsledky byly zpracovány pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA) a bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

#### **4.4.3 Stanovení apoptózy pomocí vazby protilátky APO 2.7**

Antigen APO2.7 (někdy nazývaný antigen 7A6), který je rozeznáván klonem 2.7A6A3, je 38 kDa protein lokalizovaný na mitochondriální membráně, jehož exprese je omezená na buňky zadané do apoptózy. Vzhledem k intracelulární lokalizaci tohoto antigenu je užívána metoda jednak bez permeabilizace a jednak s permeabilizací buněčné membrány. Jako vhodné permeabilizační agens je používán digitonin. Buňky byly dvakrát promyty PBS obsahujícím 5% fetální telecí sérum (FCS). Následně bylo  $1 \times 10^5$  buněk resuspendováno v 0,5 ml PBS s 5% FCS a inkubovány s myší monoklonální protilátkou APO2.7 konjugovanou fykoerytrinem. V případě použití permeabilizace byly buňky nejprve permeabilizovány inkubací ve 100  $\mu\text{l}$  roztoku digitoninu (Sigma, Saint Luis, MS, USA) v PBS o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 20 min na ledu. Po inkubaci byly buňky promyty a barveny protilátkou APO2.7 po dobu 30 min při 4 °C a analyzovány na průtokovém cytometru Coulter Electronic.

#### **4.5 Imunocytochemie**

Buňky byly fixovány 4% čerstvě připraveným paraformaldehydem 10 min při pokojové teplotě (RT), promyty v PBS, permeabilizovány 0,2% Triton X-100/PBS a promyty v PBS. Před inkubací s primární protilátkou (přes noc při 4 °C), byly buňky blokovány 7% inaktivovaným fetálním bovinním sérum s 2 %BSA v PBS po dobu 30 min při pokojové teplotě. Pro detekci  $\gamma\text{H2A.X}$  byly použity myší monoklonální protilátka anti- $\gamma\text{H2A.X}$

(Upstate, Chicago, IL, USA) a polyklonální králičí protilátka anti-53BP1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Jako sekundární protilátky byly použity oslí anti-myší-FITC-konjugovaná protilátka a anti-králičí-Cy3-konjugovaná protilátka (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Protilátky byly aplikovány na jednotlivá sklíčka (po jejich pre-inkubaci s 5,5% oslím sérem v PBS po 30 min při pokojové teplotě) a inkubovány 1 h ve tmě a následně promyty v PBS. Jádra byla značena pomocí TOPRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) v čerstvě připraveném citrátovém pufru.

Fotografie byly získány na konfokálním cytometru s vysokým rozlišením pomocí automatizovaného fluorescenčního mikroskopu DM RXA s CSU-10a konfokální jednotkou (Leica, Yokogawa, JAP) a CoolSnap HQ kamerou (Photometrix, Melbourne, Rakousko). Pro každé jádro bylo zaznamenáno 40 řezů po 0,3  $\mu\text{m}$ . Expoziční čas a dynamika pásma kamery v červeném, zeleném a modrém kanále byla pro všechny fotografie srovnávané počítačovou analýzou obrazu nastavena na stejné hodnoty. Integrální optická denzita jednotlivých jader (IOD) byla měřena pomocí analýzy obrazu s použitím software ImagePro 4.11 (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### **4.6 Barvení Diff-Quick**

Pro přípravu cytospinových preparátů bylo použito  $2 \times 10^5$  buněk. Buňky byly omyty v 0,2 ml PBS a stočeny při 200g (5 min). Preparáty byly fixovány ve fixačním roztoku a obarveny pomocí soupravy Diff-Quick (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA). Souprava obsahuje roztoky umožňující rychlé barvení nátěrových nebo cytospinových preparátů s výsledky podobnými klasickému cytologickému barvení Giemsa-May-Grünwald. Pro stanovení procenta apoptotických buněk byla hodnocena morfologie minimálně 400 buněk. Apoptotické buňky byly identifikovány podle přítomnosti kondenzovaných a fragmentovaných jader a protruze buněčné membrány.

#### **4.7 ELISA**

Pro analýzu fosforylace proteinu p53 na Ser<sup>15</sup> byl použit PathScan ELISA Sandwich kit (Upstate, Chicago, IL, USA). Buňky byly 2 h po ozáření dávkami 0,5 - 7,5 Gy promyty PBS a zlyzovány. Celobuněčné lyzáty byly připraveny přidáním 500  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru (137 mmol NaCl, 10% glycerol, 1% n-oktyl- $\beta$ -glukopyranosid, 50 mmol NaF, 20 mmol Tris pH=8, 1 mmol Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol fenylmethylsulfonyl fluorid) a vzorky byly zpracovány v 96-ti mikrojамkové destičce podle pokynů výrobce. Byly provedeny tři nezávislé experimenty s protilátkou proti nefosforylované a fosforylované (Ser<sup>15</sup>) formě proteinu p53.

Výsledná optická densita (OD) byla měřena při 450 nm a vynesena do grafu proti dávce D (v Gy) a výsledné křivky jevíly sigmoidní tvar kompatibilní s Michaelis-Mentenové kinetikou:  $OD = a + b * D / (c + D)$ . Analýza byla ověřena pomocí Lineweaver-Burkova postupu (Lineweaver & Burk, 1934), který prokázal přímou závislost  $1/D$  a  $1/OD$ .

#### **4.8 Statistické hodnocení výsledků**

Hodnoty použité v grafech a obrázcích představují průměr s příslušnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů. Významnost rozdílů mezi jednotlivými soubory (resp. rozdílů mezi parametry polohy jednotlivých souborů) byla stanovena dvouvýběrovým t-testem v rámci tabulkového procesoru Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Homogenita rozptylů byla vždy stanovena F-testem a v závislosti na výsledku F-testu byla hypotéza o shodě či neshodě středních hodnot (tj. parametrů polohy) porovnávaných výběrů hodnocena pomocí Studentova t-testu pro nezávislé uspořádání pokusů variantou pro shodné či rozdílné rozptyly (Knížek et al., 2000).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Vliv záření na reparaci poškození DNA v buňkách MOLT-4

#### 5.1.1 Aktivace ATM a Chk-2

Při experimentech na buněčné linii MOLT-4 jsme pomocí Western blot analýzy našli zvýšené množství fosforylované ATM (Ser<sup>1981</sup>) velmi brzy po ozáření, tj. již za 0,5 h. Tato fosforylace přetrvávala 6 h po ozáření dávkou 1,5; 3 nebo 7,5 Gy (obr. 3 a 4), tedy do času, kdy byl štěpen lamin B a byla indukována apoptóza. Aktivní (fosforylované) ATM bylo 0,5 h po ozáření 1,5 nebo 3 Gy méně než po 7,5 Gy.

Chk-2 byla také fosforylována (Thr<sup>68</sup>) během 0,5 h po ozáření, ale na rozdíl od ATM bylo její množství v tomto čase nejvyšší po dávce 1,5 Gy a se vzrůstající dávkou se snižovalo. Zatímco fosforylovaná forma ATM přetrvávala po všech dávkách stejně dlouho (po 2 h došlo k poklesu a po 6 h již nebyla detekována vůbec), fosforylovaná forma Chk-2 přetrvávala 4 h po ozáření dávkou 1,5 Gy, 2 h po dávce 3 Gy a 1 h po dávce 7,5 Gy. Jak fosforylace ATM, tak fosforylace Chk-2 však předcházely akumulaci proteinu p53.

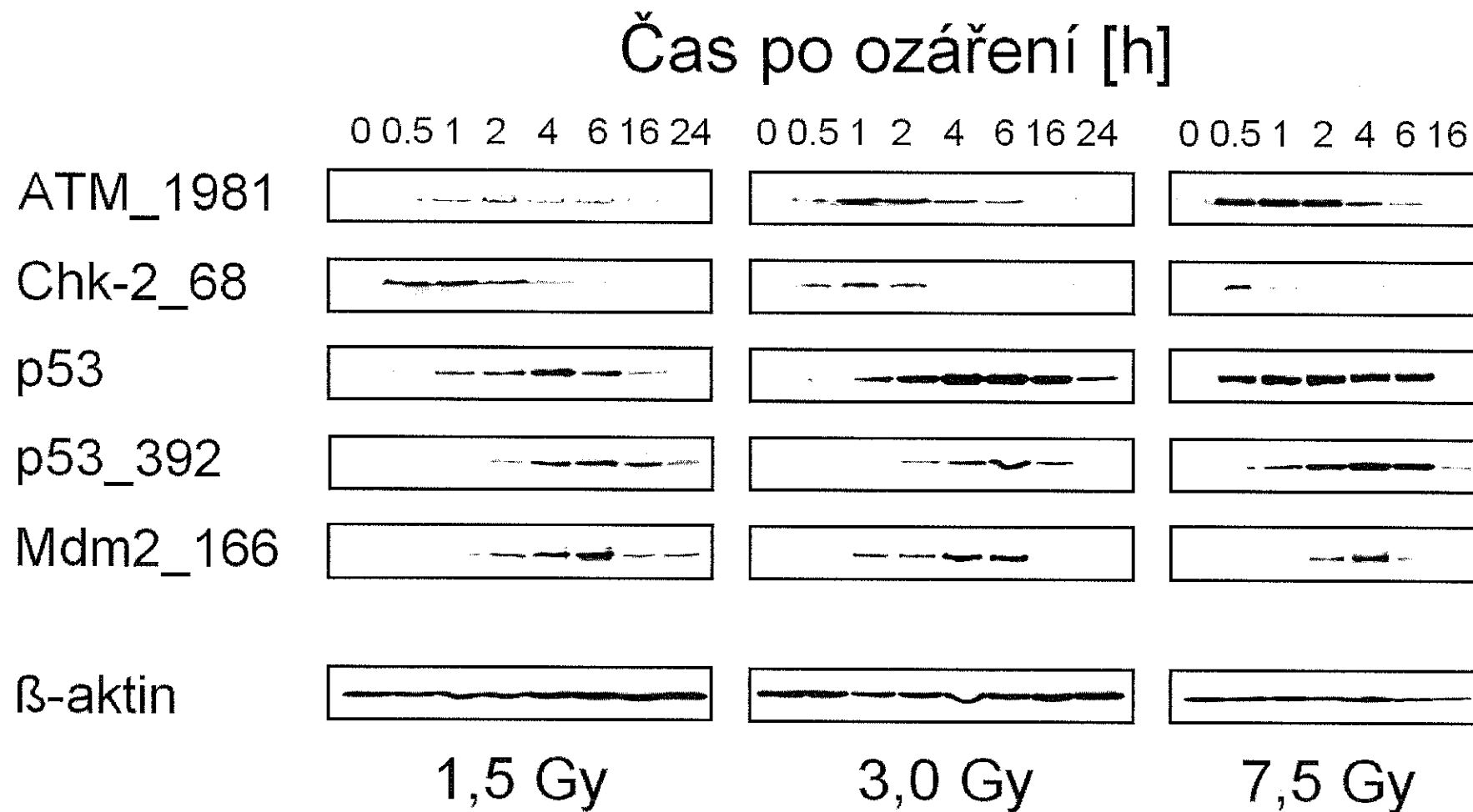
Ačkoliv se množství aktivní ATM v časných intervalech po ozáření zvyšuje s dávkou, nezaznamenali jsme žádnou signifikantní dávkovou závislost 1 h po ozáření dávkami 1 až 10 Gy, a také fosforylace Chk-2 nevykazovala v tomto čase žádnou dávkově závislou odpověď (obr. 9).

#### 5.1.2 Reparační proteiny

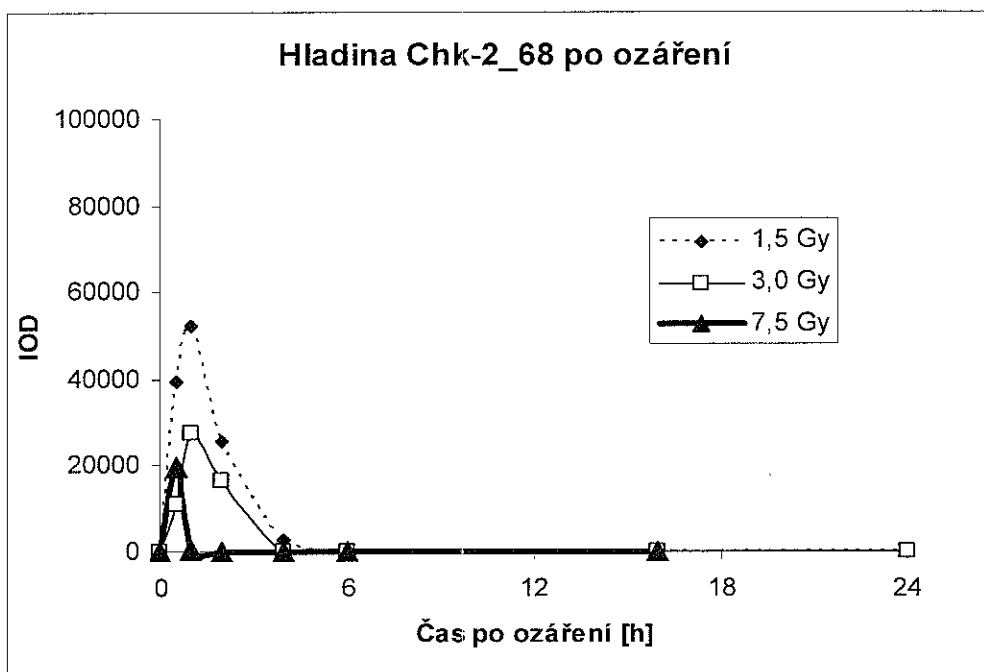
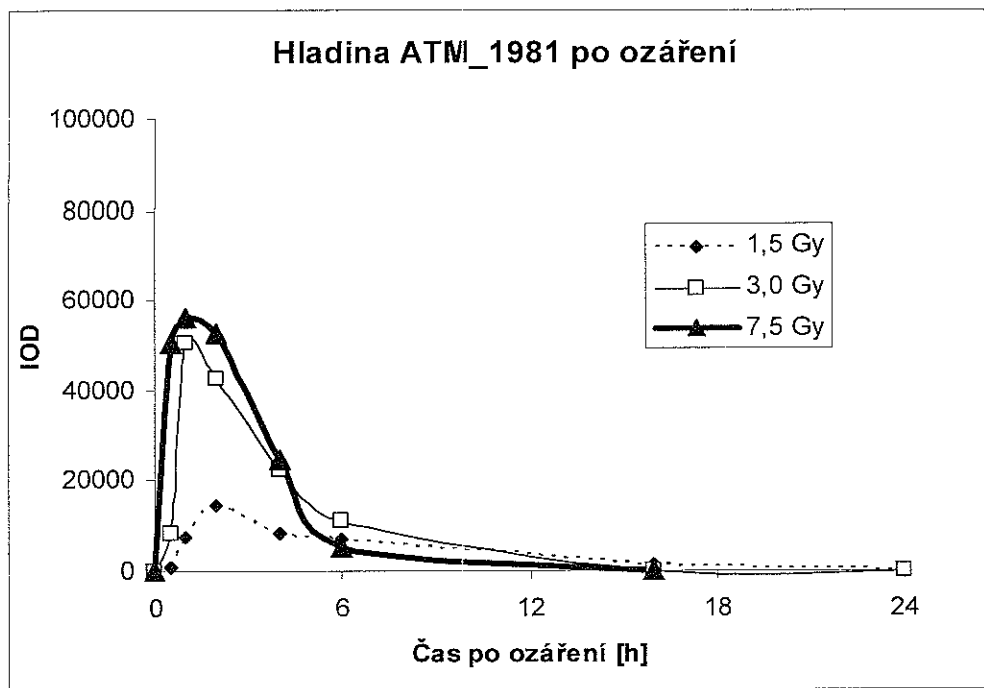
Pomocí metody Western blot jsme pozorovali změny proteinů MRN komplexu. Všechny proteiny tohoto DNA reparačního komplexu (Mre11/Rad50/Nbs1) byly nalezeny v kontrolních buňkách. Buňky MOLT-4 byly ozářeny dávkami 1; 2; 3; 5; 7,5 nebo 10 Gy. 1 h poté, co byly buňky vystaveny dávkám 5 - 10 Gy došlo k poklesu množství všech 3 komponentů MRN. Velmi překvapivé však bylo zjištění, že u buněk MOLT-4 zůstává Nbs1 1 h po ozáření dávkami 1 - 10 Gy navzdory funkční ATM nefosforylován (obr. 5).

Nejzávažnějším poškozením DNA v jádře buňky po ozáření jsou DSB. DSB jsme hodnotili u buněk MOLT-4 pomocí detekce tvorby IRIF. V místě DSB dochází rychle po ozáření k akumulaci  $\gamma$ H2A.X a 53BP1. Na obr. 6 jsou znázorněny IRIF detekované v konfokálním mikroskopu 1 h po ozáření. Buňky jsme vyhodnocovali jednak podle počtu kolokalizací  $\gamma$ H2A.X a 53BP1 a jednak pomocí integrální optické denzity fluorescence FITC, kterým byly značeny protilátky pro detekci  $\gamma$ H2A.X. Oba parametry jeví dávkovou závislost v rozmezí 0 - 3 Gy.

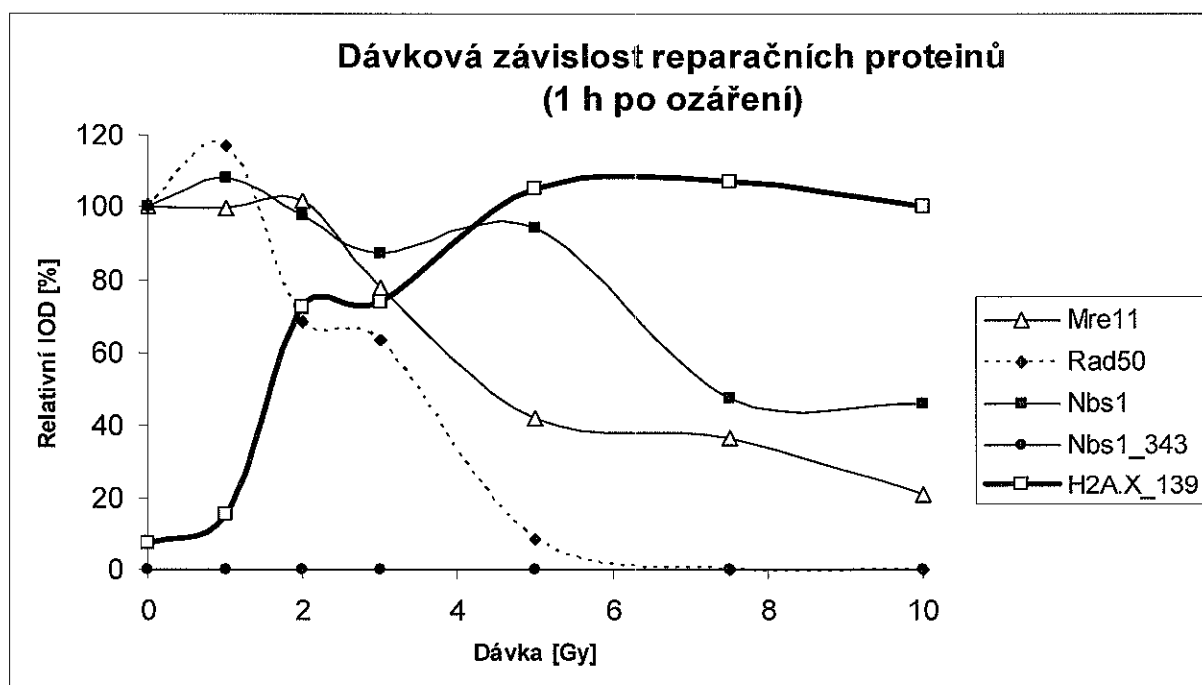
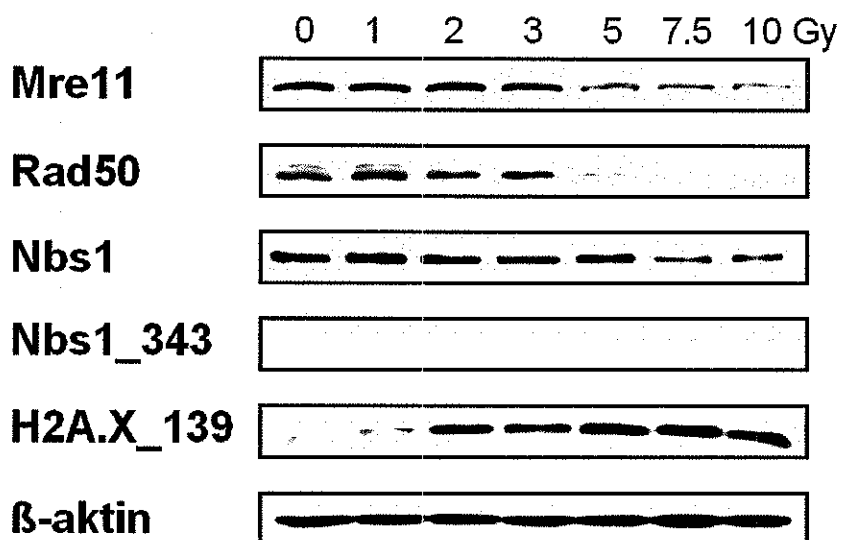




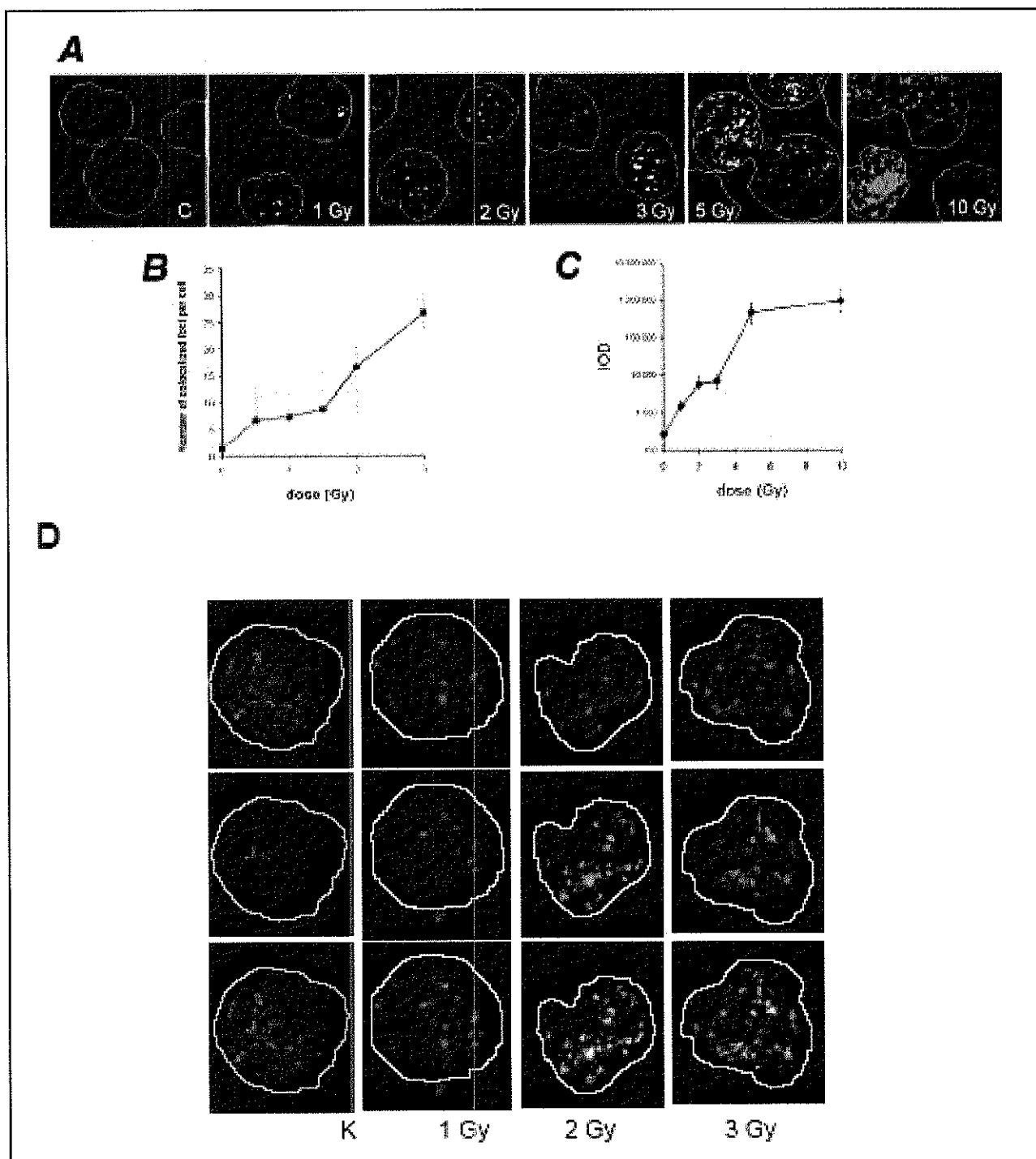
**Obr. 3. MOLT-4. Ionizující záření indukuje fosforylaci ATM kinasy a jejích substrátů.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. IZ indukovalo rychlou fosforylaci ATM a Chk-2, která byla následována upregulací a fosforylací p53 a Mdm2 (viz obr. 8). Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.



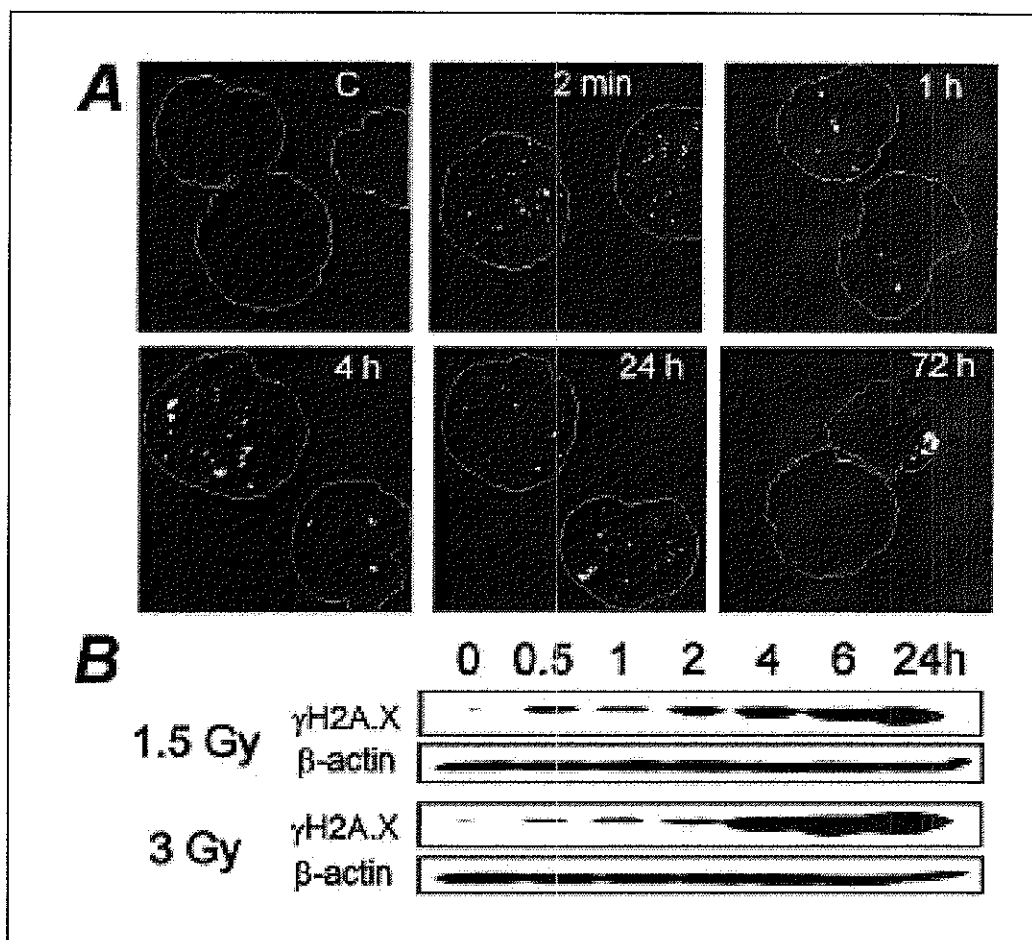
**Obr. 4. MOLT-4. Časná aktivace ATM a Chk-2 po ozáření.** Množství aktivní ATM fosforylované na Ser<sup>1981</sup> v časných intervalech se zvyšuje se vzrůstající dávkou. Na druhou stranu množství aktivní Chk-2 Thr<sup>68</sup> se s rostoucí dávkou snižuje. Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu uvedených na obr. 3 v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická denzita.



**Obr. 5. MOLT-4. Dávková závislost reparačních proteinů.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Ionizující záření nevede k fosforylaci Nbs1 na Ser<sup>343</sup> (nebyla vůbec detekována) a 1 h po ozáření dávkami 5 - 10 Gy je indukován pokles proteinů MRN komplexu. Naopak fosforylace H2A.X na Ser<sup>139</sup> se vzrůstající dávkou stoupá. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty nejméně ze tří nezávislých experimentů. Graf vyjadřuje denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce. *IOD*, integrovaná optická denzita.



**Obr. 6. MOLT-4. Dávková závislost tvorby IRIF  $\gamma$ H2A.X 1 h po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. **(A)** Ložiska  $\gamma$ H2A.X detekovaná imunocytochemicky na konfokálním mikroskopu. **(B)** Počet IRIF (kolokalizace  $\gamma$ H2A.X a 53BP1) na jádro se zvyšuje v závislosti na dávce záření do 3 Gy. **(C)** Dávková závislost vzestupu intenzity fluorescence  $\gamma$ H2A.X (měřeno pomocí software pro analýzu obrazu). Patrná je lineární dávková závislost do 5 Gy. **(D)** Záznam měření z konfokálního mikroskopu (červeně - 53BP1, zeleně -  $\gamma$ H2A.X) ukazuje kolokalizaci obou proteinů u buněk MOLT-4 ozářených dávkami do 3 Gy. *IOD*, integrovaná optická denzita.



**Obr. 7. MOLT-4. Fosforylace histonu H2A.X na Ser1<sup>39</sup> po ozáření.** Buňky byly ozářeny a analyzovány v indikovaných časových intervalech (A) Dynamika fosforylace H2A.X detekované imunocytochemicky na konfokálním mikroskopu po ozáření dávkou 1,5 Gy. (B) Dynamika fosforylace H2A.X detekované Western blottingem. Patrná je masivní fosforylace indukovaná v pozdějších časových intervalech po ozáření.

Na obr. 7 je znázorněna dynamika fosforylace histonu H2A.X v čase po ozáření dávkami 1,5 a 3 Gy. Tato fosforylace je minimální v neozářených buňkách a po ozáření množství  $\gamma$ H2A.X stoupá. Masivní fosforylace však byla detekována až v pozdějších časových intervalech, kdy byla indukována apoptóza.

### 5.1.3 Protein p53

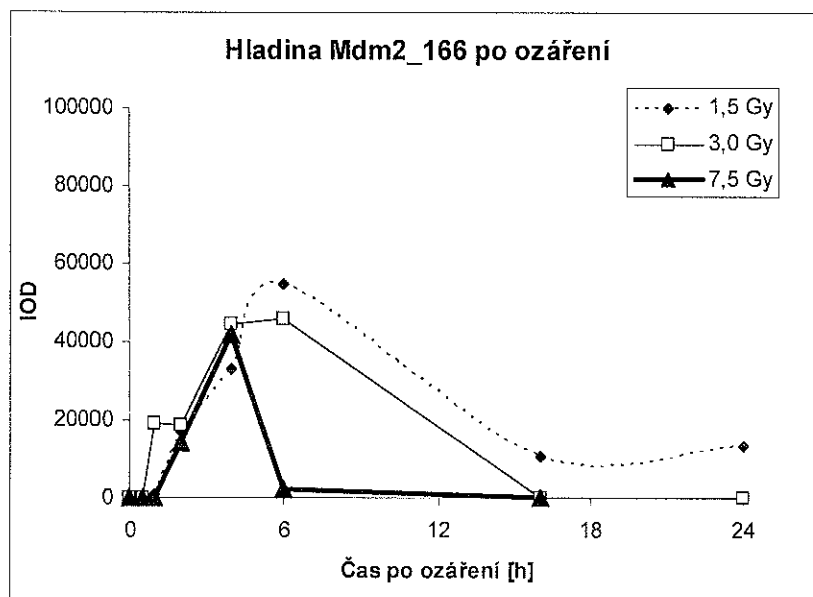
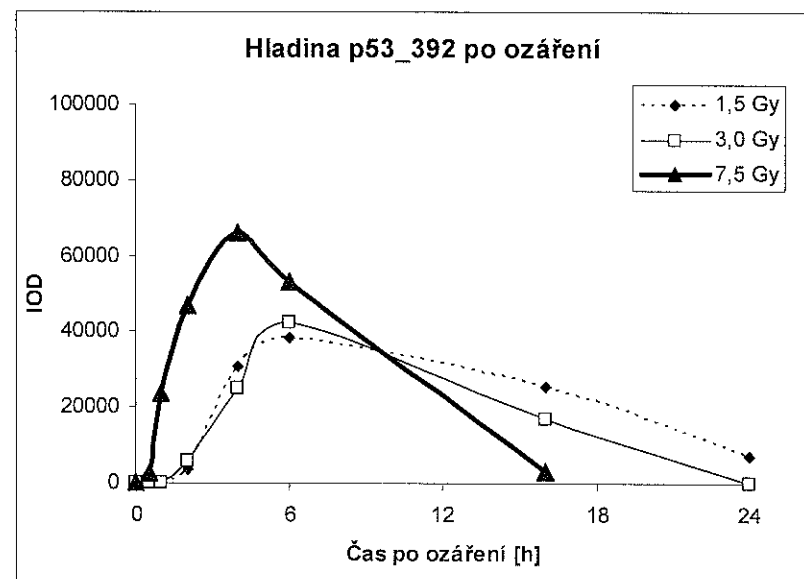
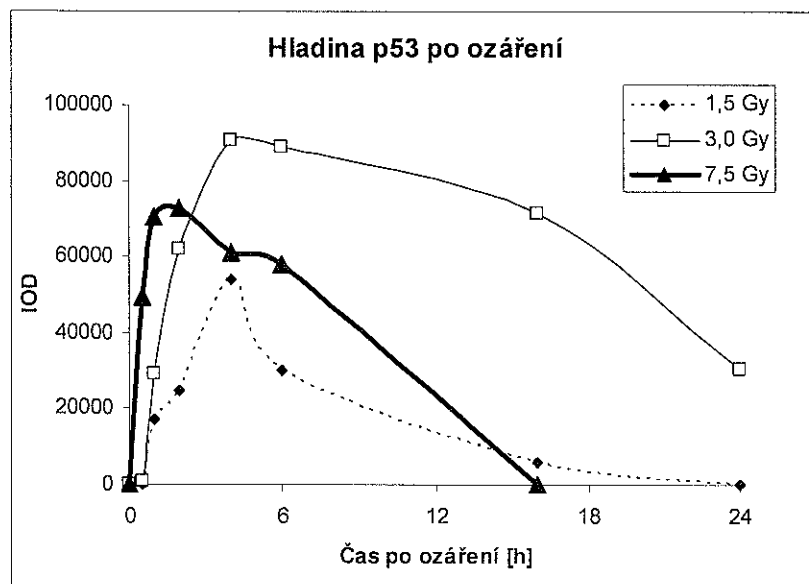
V dalších pokusech jsme pomocí monoklonálních protilátek detekovali protein p53 a některé jeho posttranslačně modifikované formy. Protein p53 byl upregulován od 1 do 16 h po dávce 1,5 Gy s maximem za 4 h. Po dávce 3 Gy byla upregulace p53 detekována od 1 do 24 h s maximem také za 4 h. Dávka 7,5 Gy indukovala p53 velmi rychle a přechodně (od 0,5

do 6 h) s maximem 1 až 2 h po ozáření (obr. 3 a 8). Protein p53 byl následně fosforylován na Ser<sup>392</sup> od 2 h po dávkách 1,5 a 3 Gy nebo od 0,5 h po dávce 7,5 Gy. Fosforylace na Ser<sup>392</sup> přetrvávala až 16 h po dávkách 1,5 a 3 Gy, po dávce 7,5 Gy poklesla za 6 h (obr. 3a 8).

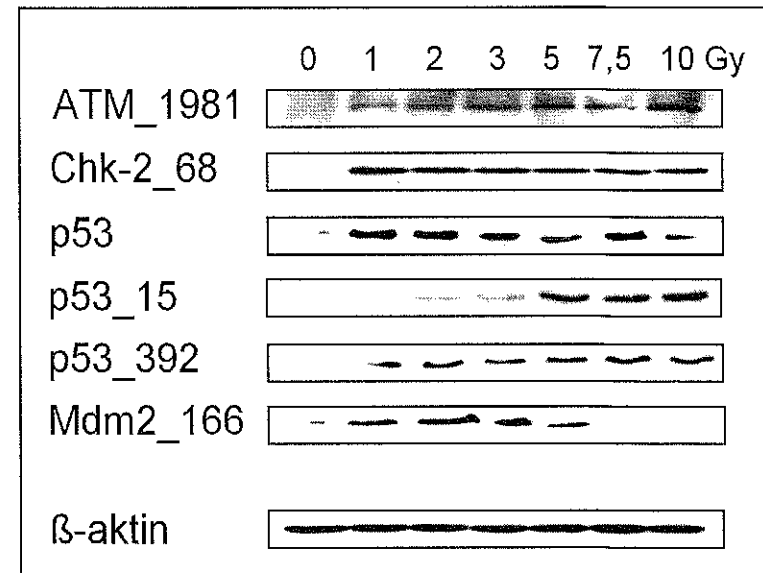
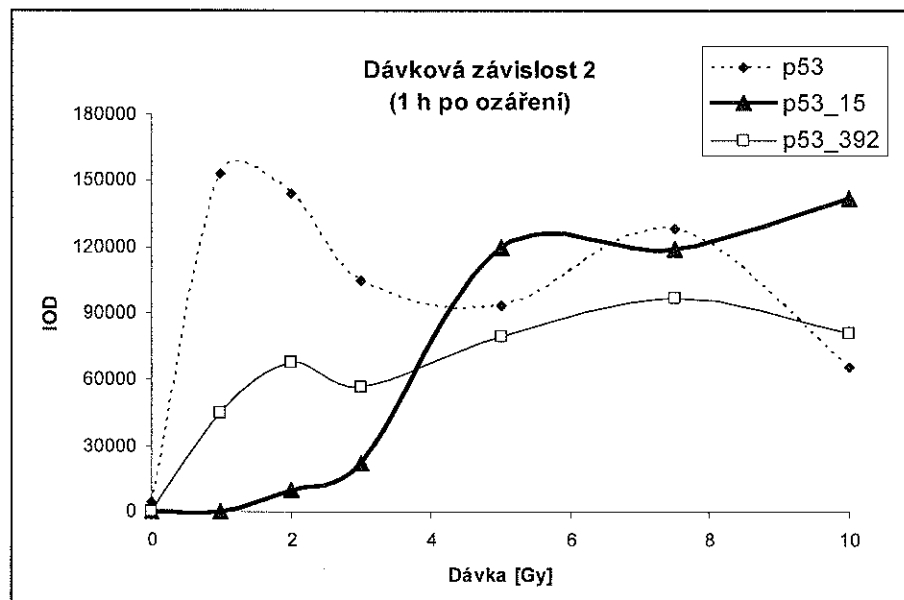
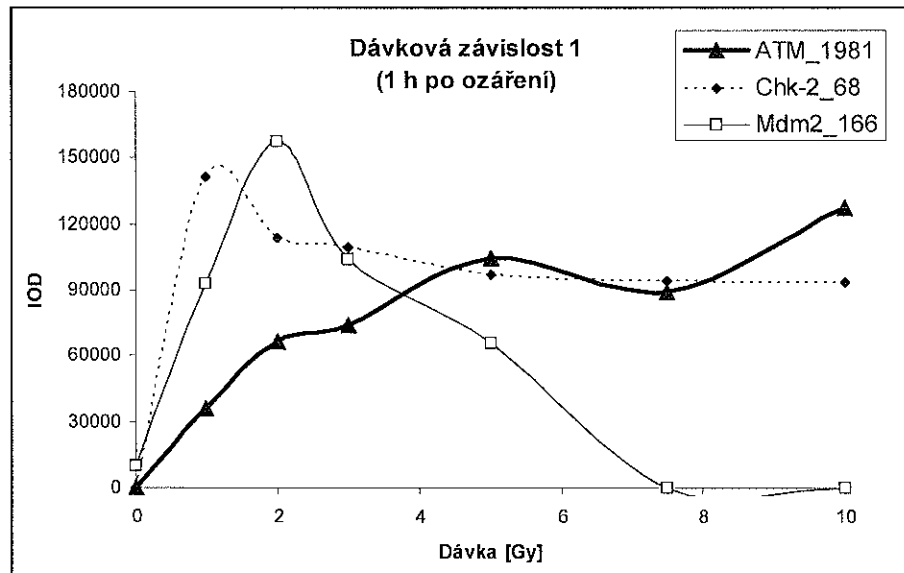
V čase maximální fosforylace p53 (okolo 4 h po ozáření) jsme pozorovali nárůst fosforylované formy onkoproteinu Mdm2 (Ser<sup>166</sup>), tj. od 4 do 6 h po dávce 1,5 a 3 Gy nebo od 2 do 4 h po 7,5 Gy (obr. 3 a 8).

Všechny analyzované proteiny byly upregulovány 1 h po ozáření, nicméně žádný z nich kromě Mdm2 nevykazoval dávkovou závislost. Množství tohoto proteinu se sice 1 h po ozáření dávkami do 3 Gy zvýšilo, ovšem po dávkách 5 Gy a větších jsme pozorovali pokles v fosforylovaného Mdm2, takže ani tento protein zřejmě nebude možné využít pro biodozimetrické účely. Podobně jako ATM a Chk-2 ani indukce p53 ani jeho fosforylace na Ser<sup>392</sup> nevykazovala 1 h po ozáření dávkovou závislost po expozici dávkám 1 až 10 Gy (obr. 9). Zjistili jsme však, že dávkově závislým způsobem se fosforyluje p53 na Ser<sup>15</sup>. Pro ověření této skutečnosti jsme zvolili kvantitativně citlivější metodu než Western blotting - ELISA test.

Buňky MOLT-4 byly ozářeny dávkami 0,5, 1, 1,5, 3 nebo 7,5 Gy a analýza byla provedena v čase nástupu fosforylace p53, tj. 2 h po ozáření. Množství nefosforylovaného p53 se zvýšilo. Množství fosforylované formy na Ser<sup>15</sup> se však zvýšilo dramaticky a ze získaných dat vyplývá, že 2 h po ozáření je fosforylace p53 na Ser<sup>15</sup> dávkově závislá, a to především v oblasti nízkých dávek do 3 Gy (obr. 10).

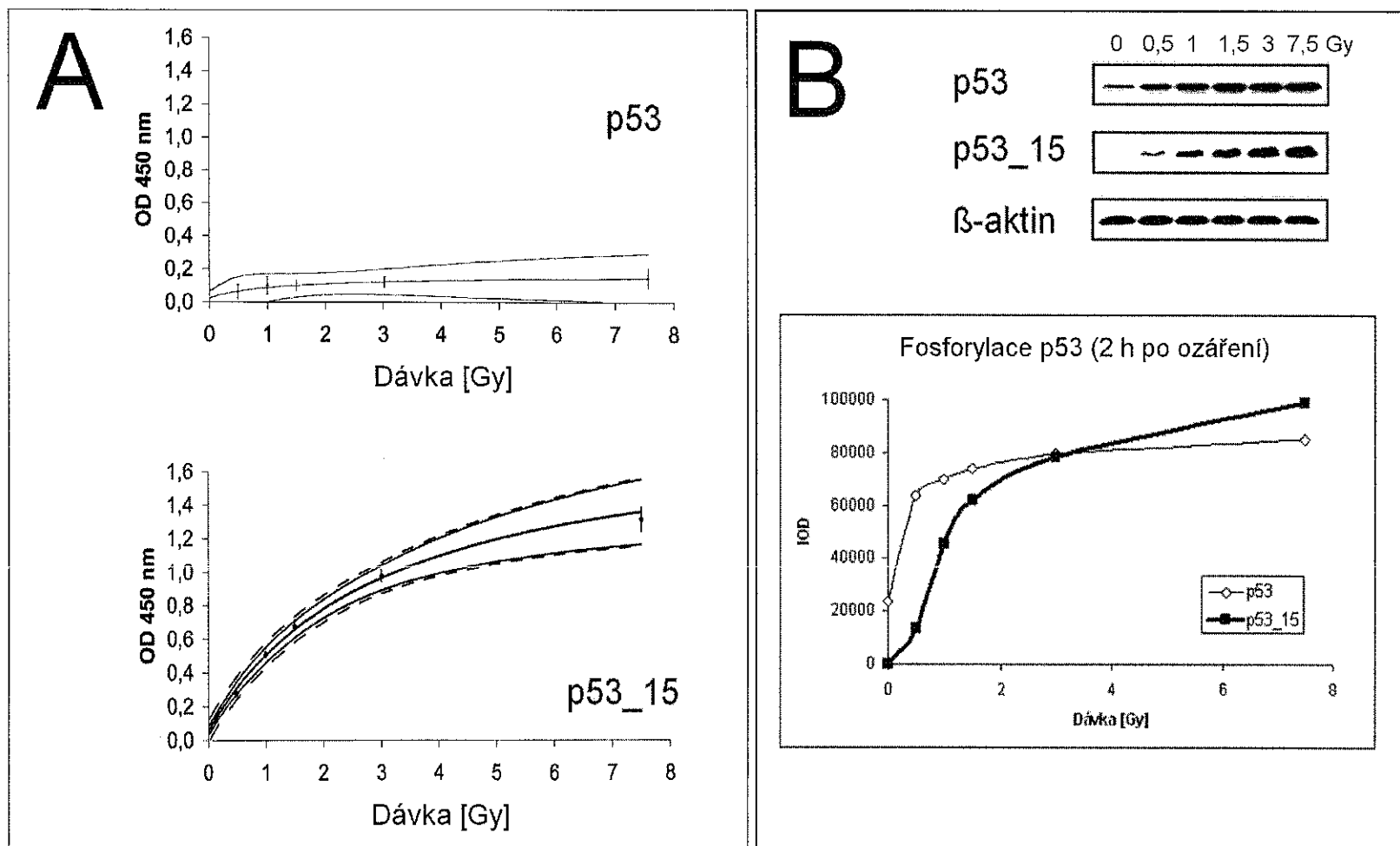


**Obr. 8. MOLT-4. Ionizující záření indukuje fosforylaci p53 a Mdm2.** Protein p53 je upregulován po dávkách 1,5 a 3 Gy s maximem za 4 h. Dávka 7,5 Gy působí jeho maximální upregulaci 1 - 2 h po ozáření. Následně je p53 fosforylován na Ser<sup>392</sup>. Po dávkách 1,5 a 3 Gy dosahuje fosforylace maxima za 6 h. Dávka 7,5 Gy působí rychlejší a intenzivnější fosforylaci s maximem za 4 h po ozáření. Negativní regulátor p53, onkoprotein Mdm2, je fosforylován na Ser<sup>166</sup>. Časový průběh a dosažená maxima této aktivace korelují s fosforylací p53. Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu uvedených na obr. 3 v závislosti na čase po ozáření. IOD, integrovaná optická denzita.



**Obr. 9. MOLT-4. Dávková závislost ATM a jejích substrátů po ozáření.** Buňky byly ozářeny dávkami 0 - 10 Gy, zlyzovány a analyzovány 1 h po ozáření. Množství aktivní ATM, p53 a jeho formy fosforylované na Ser<sup>392</sup> se zvyšuje, ovšem nenarůstá dávkově závislým způsobem. Množství aktivní Chk-2 a Mdm2 dosahuje maxima v oblasti cytostatické dávky, ovšem jejich fosforylace také není dávkově závislá. Biodozimetricky nejperspektivnější se jeví fosforylace p53 na Ser<sup>15</sup> (viz obr. 10). Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce IZ. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. *IOD*, integrovaná optická denzita.





**Obr. 10. MOLT-4. Fosforylace p53 na Ser<sup>15</sup> po ozáření je dávkově závislá.** Buňky byly ozářeny a zlyzovány, jak je indikováno. Experimenty byly provedeny 2 h po ozáření. **(A) ELISA.** Množství nefosforylovaného p53 se zvýšilo jen nepatrně. Množství fosforylované formy na Ser<sup>15</sup> se však zvýšilo dávkově závislým způsobem. **(B) Western blotting.** Data získaná Western blottingem korelují s výsledky předchozí analýzy. Graf vyjadřuje denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce IZ. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. *IOD*, integrovaná optická denzita.

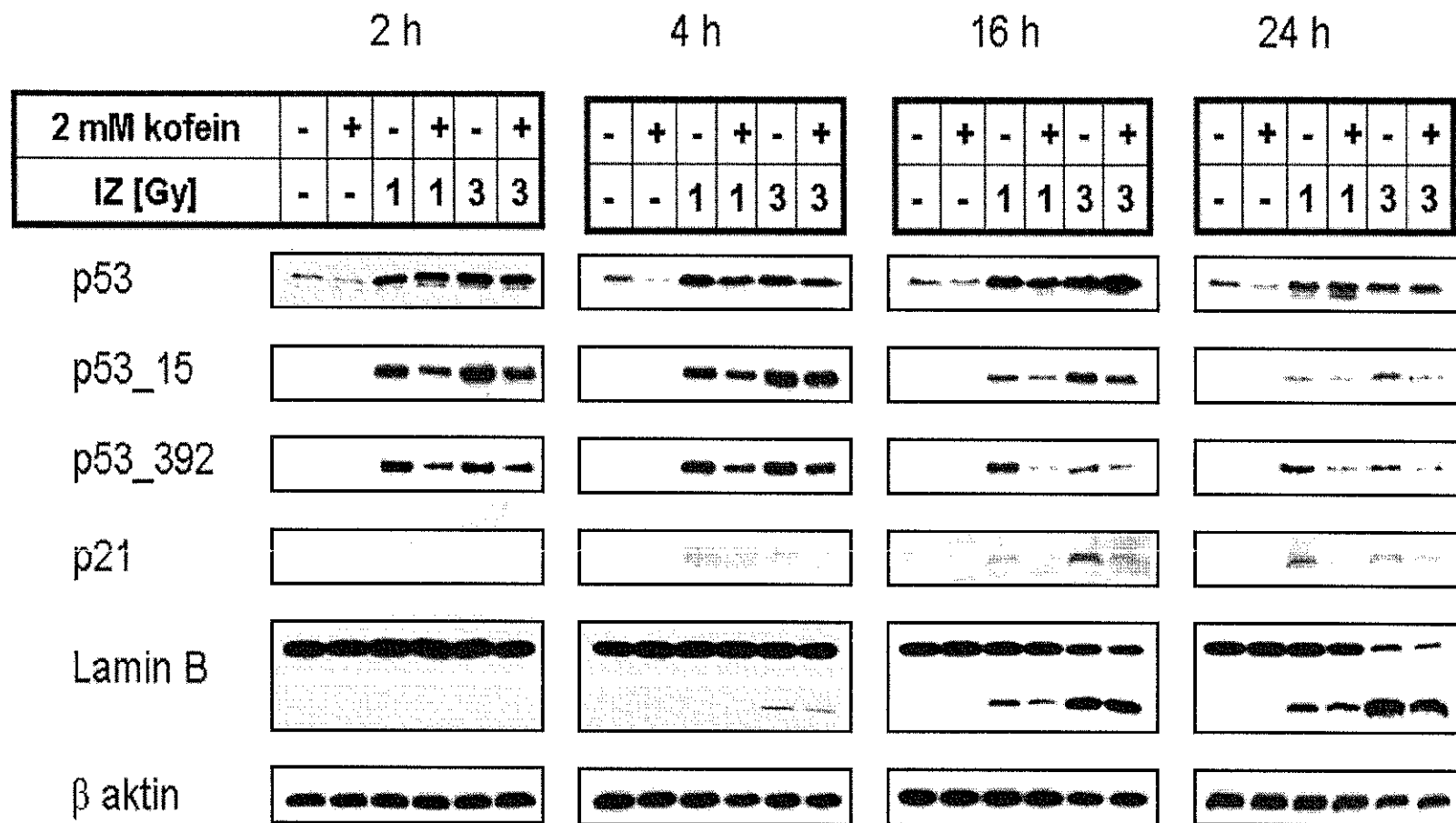
#### 5.1.4 Vliv kofeinu na fosforylaci proteinu p53

V dalších experimentech jsme studovali efekt kofeinu – nespecifického inhibitoru ATM, který byl k buňkám MOLT-4 přidán 30 min před ozářením. Studovali jsme především vliv kofeinu na expresi proteinu p53 a jeho fosforylace, která je po ozáření ATM-dependentní. Buňky byly vystaveny 2mmol/l kofeinu, IZ (dávce 1 nebo 3 Gy) či jejich kombinaci a zlyzovány za 2, 4, 16 nebo 24 h.

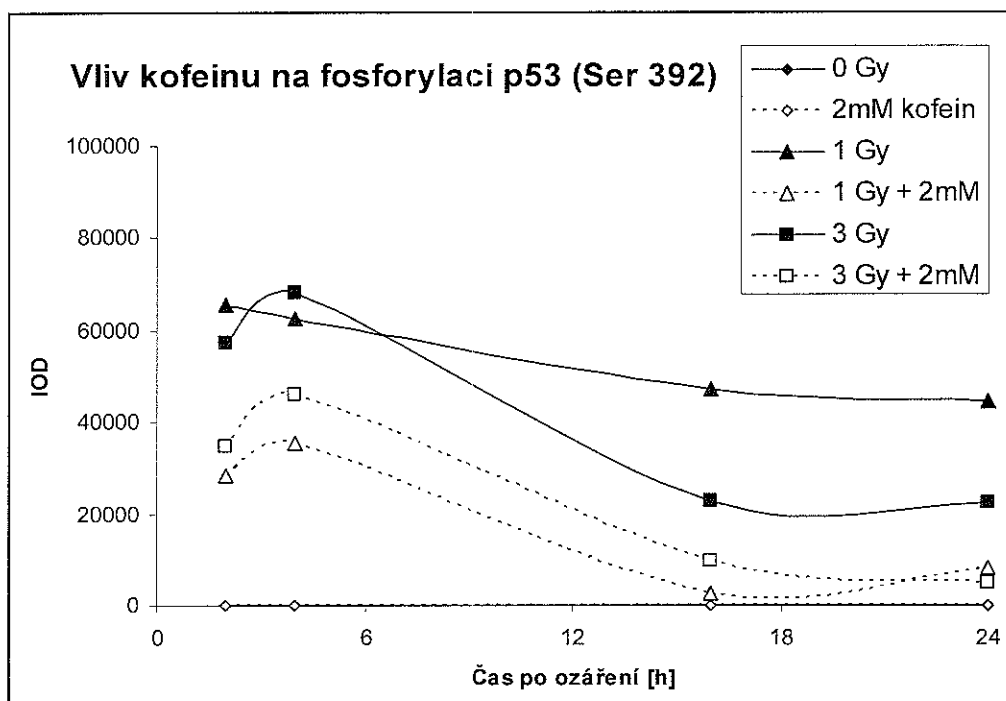
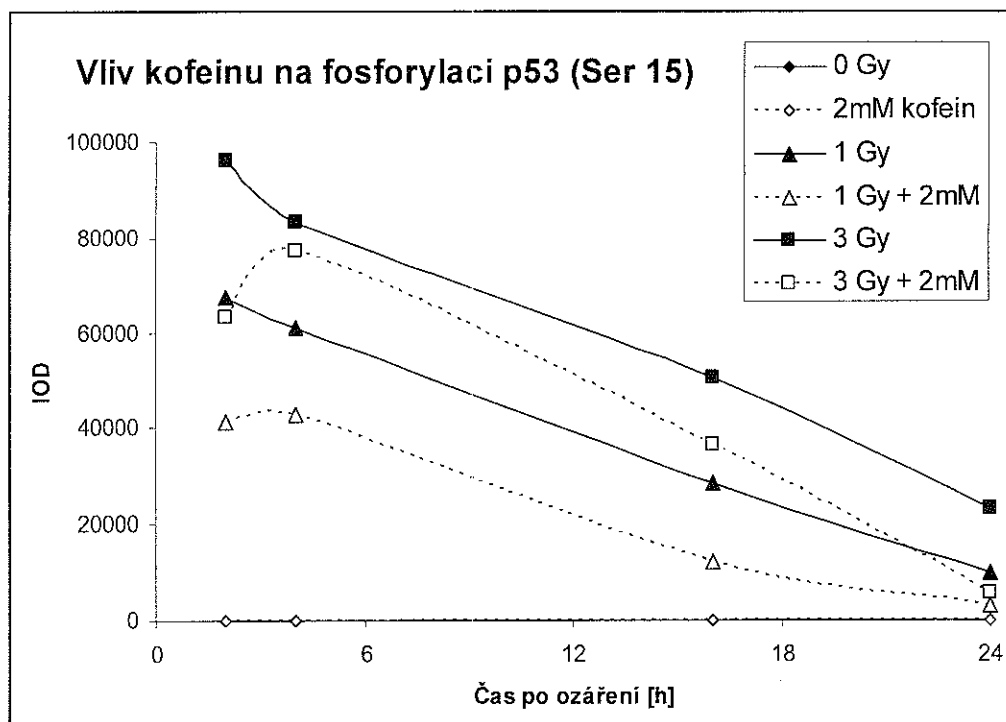
Protein p53 byl po obou studovaných dávkách upregulován již 2 h po ozáření. Maximální hladina p53 byla detekována za 16 h. Jeho množství se 24 h po ozáření snížilo. Kofein samotný i v kombinaci se zářením působil pokles množství p53 oproti ozářené skupině především 2 a 4 h po ozáření. IZ působilo ve všech sledovaných časových intervalech fosforylaci p53 jak na Ser<sup>15</sup>, tak na Ser<sup>392</sup>. Maximální hladina obou fosforylovaných forem p53 byla detekována za 4 h, později se jejich množství snížilo. Naše výsledky prokázaly, že inhibice ATM kofeinem významně tlumí fosforylaci vyvolanou oběma dávkami ve všech časových intervalech (obr. 11 a 12).

V návaznosti na ATM-p53 signální dráhu jsme též zkoumali inhibiční efekt kofeinu na protein p21. Po dávce 1 Gy byl protein p21 detekován velmi slabě za 16 h po ozáření. Nejvyšší množství bylo prokázáno za 24 h. Dávka 3 Gy způsobila upregulaci p21 také za 16 h ovšem intenzivnější než po dávce 1 Gy a za 24 h již byl patrný jeho pokles (obr. 11).

Kombinovaný efekt kofeinu a IZ se projevil také na úrovni indukce apoptózy. Fragment nukleárního laminu B byl nalezen 16 h po ozáření dávkou 1 Gy a po dávce 3 Gy dokonce velmi slabě i za 4 h. Preinkubace s kofeinem pak měla opět za následek částečnou inhibici tohoto štěpení, a to u obou použitých dávek, 16 a 24 h po ozáření (obr. 11).



**Obr. 11. MOLT-4. Kofein inhibuje fosforylaci p53.** Buňky byly ovlivněny kofeinem, ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Kofein tlumí expresi p53 a dále inhibuje ATM-dependentní fosforylaci na Ser<sup>15</sup> a na Ser<sup>392</sup>. Patrná je také inhibice upregulace proteinu p21 a kaspasového štěpení laminu B v kombinaci s oběma použitými dávkami. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 12. MOLT-4. Kofein inhibuje fosforylaci p53.** Patrný je pokles obou fosforylací jak Ser<sup>15</sup>, tak na Ser<sup>392</sup>. Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western-blottingu uvedených na obr. 11 v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická denzita.

## 5.2 Vliv záření na indukci apoptózy v buňkách HL-60 a MOLT-4

### 5.2.1 Vzestup Mcl-1 po nízkých dávkách záření

Mcl-1 je antiapoptotický protein a spolu s ostatními antiapoptotickými členy rodiny Bcl-2 zvyšuje pravděpodobnost přežití buňky vystavené apoptotickému stimulu tím, že udržuje integritu mitochondriální membrány.

Buňky HL-60 byly ozářeny dávkou 6 Gy. Nejprve jsme pozorovali vzestup množství Mcl-1 6 h po ozáření a poté následoval jeho pokles mezi 16 a 24 h po ozáření. V tomto čase je u buněk HL-60 indukován výrazný G2 blok (obr. 23). Apoptóza je maximální za 48 - 72 h po ozáření. Později (po 72 h) se množství Mcl-1 opět zvýšilo a za 144 h dosáhlo úrovně kontrolních buněk (obr. 13A a 14). Velká část buněk sice umírá apoptózou, ale malá část buněk poškození opraví a za 144 h jsou po dávce 6 Gy detekovány pouze buňky živé. Apoptotické buňky se rozpadají a apoptóza není indukována, což bylo potvrzeno detekcí štěpeného laminu B.

V neozářených buňkách je tento strukturální protein přítomen v jádře jako molekula o hmotnosti 68 kDa. IZ působí jeho kaspasové štěpení na 48 kDa fragment. Po dávce 6 Gy dojde za 72 h k obnovení buněčného cyklu, což se projeví nárůstem Mcl-1 a poklesem štěpeného laminu B a t-Bid (viz níže).

Po dávce 20 Gy (supraletální) pak dochází k rapidnímu poklesu Mcl-1 za 4 h po ozáření a následně je štěpen lamin B (6 h po ozáření).

### 5.2.2 Aktivace Bid na proapoptotický t-Bid

Protein Bid (22 kDa) je proapoptotický člen rodiny Bcl-2 rodiny a je štěpen aktivní kaspasou-8 na tzv. t-Bid (*truncated* Bid; 15 kDa), který přispívá k desintegraci mitochondriální membrány a vzniku transportního póru.

U buněk HL-60 jsme prokázali, že protein Bid je štěpen na aktivní fragment t-Bid a následně je indukována apoptóza. t-Bid byl detekován mezi 16 a 48 h po ozáření dávkou 6 Gy. Po 72 h se množství t-Bid snížilo a za 144 h již nebyl přítomen žádný t-Bid a detekovali jsme pouze 22 kDa formu, což korelovalo s úbytkem fragmentovaného laminu B a schopností buněk reparovat poškození vyvolané subletální dávkou (obr. 13A a 14).

Po letální dávce 20 Gy jsme pozorovali štěpený t-Bid již 1 h po ozáření a došlo také k nárůstu množství 22 kDa formy. Všechny testované letální dávky (10, 20 a 50 Gy) způsobily štěpení tohoto proteinu 4 h po ozáření a množství jak Bid, tak t-Bid se zvyšovalo s rostoucí dávkou (obr. 13A a 14).

U buněk MOLT-4 jsme nedetekovali t-Bid ale jen celou molekulu Bid. Pozorovali jsme pokles množství 22 kDa formy, pravděpodobně z důvodu štěpení vedoucím ke vzniku t-Bid, který ovšem v buňkách tohoto typu nebyl detekovatelný.

Dávka 1,5 Gy způsobila pokles množství Bid za 16 h po ozáření, avšak malá část byla detekovatelná i za 24 h. Dávka 3 Gy způsobila podobný pokles za 16 h, ale za 24 h již Bid nebyl prokázán. Letální dávka 7,5 Gy pak vyvolala rychlý pokles Bid a po 6 h již nebyl detekovatelný (obr. 13B a 15).

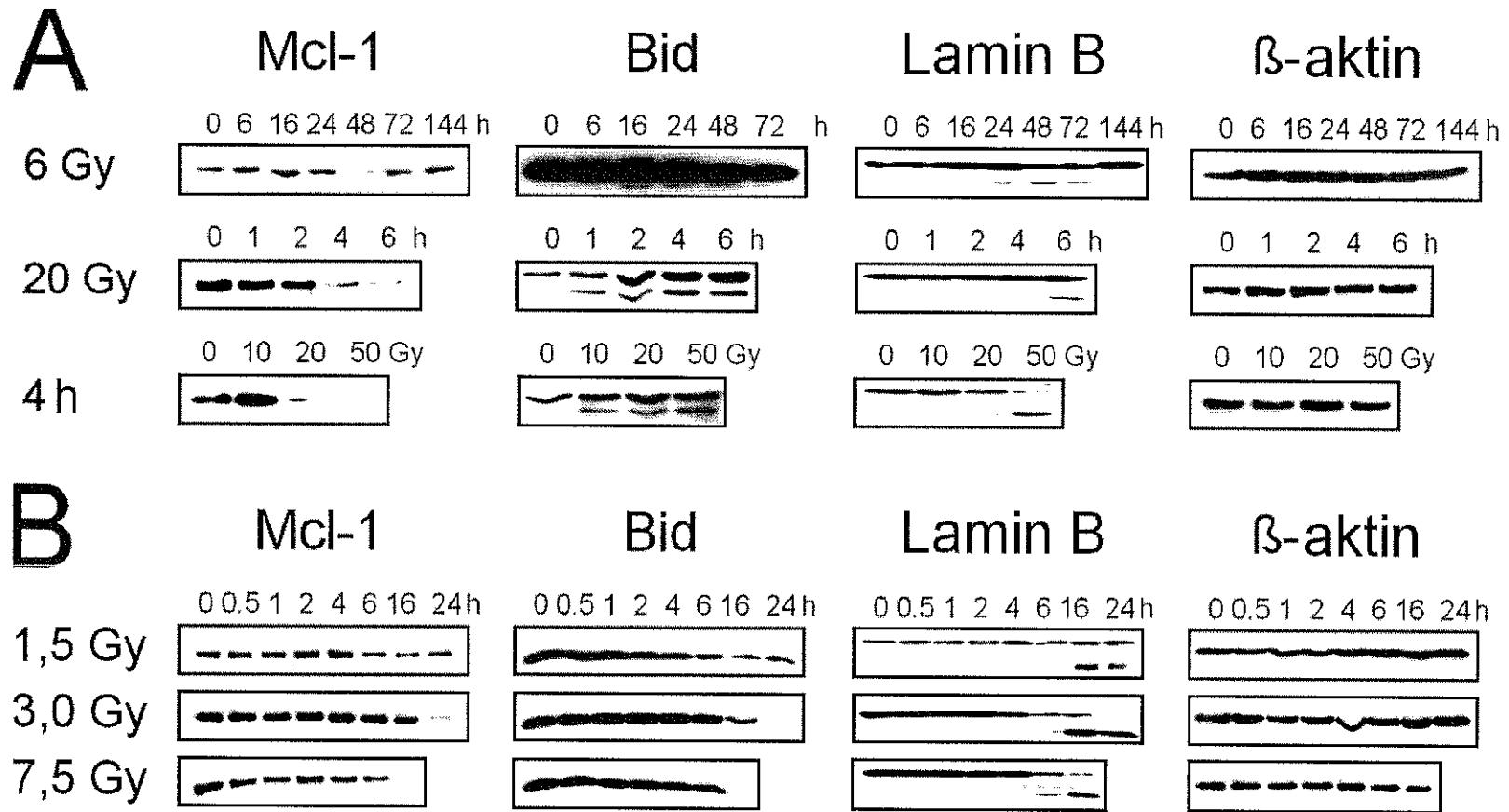
### **5.2.3 Uvolnění cytochromu c z mitochondriální matrix do cytoplazmy**

Z celobuněčného lyzátu jsme izolovali mitochondriální frakci a hodnotili jsme množství cyt-c přítomného v mitochondriích před a po ozáření.

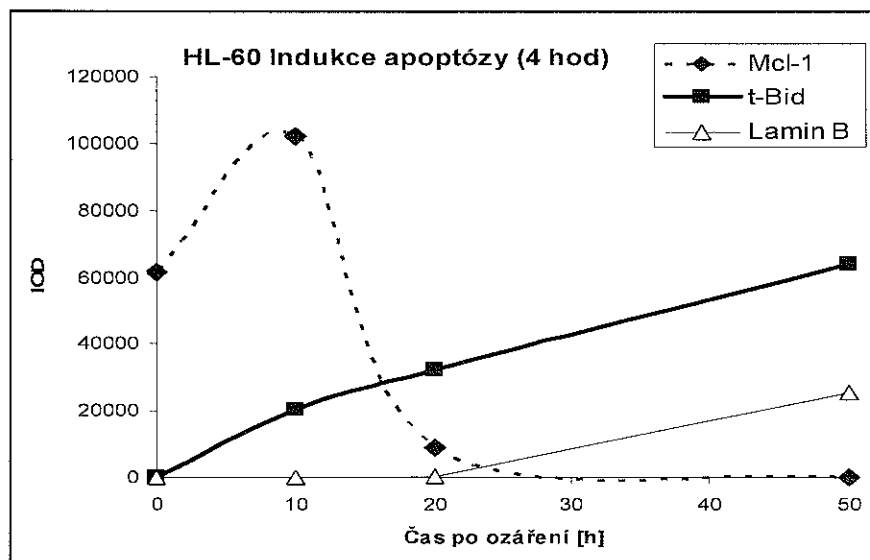
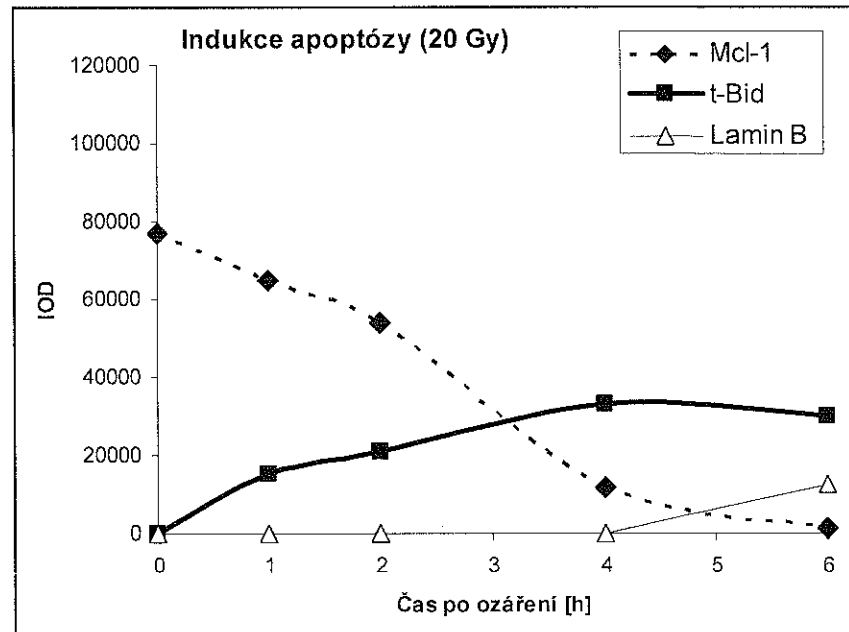
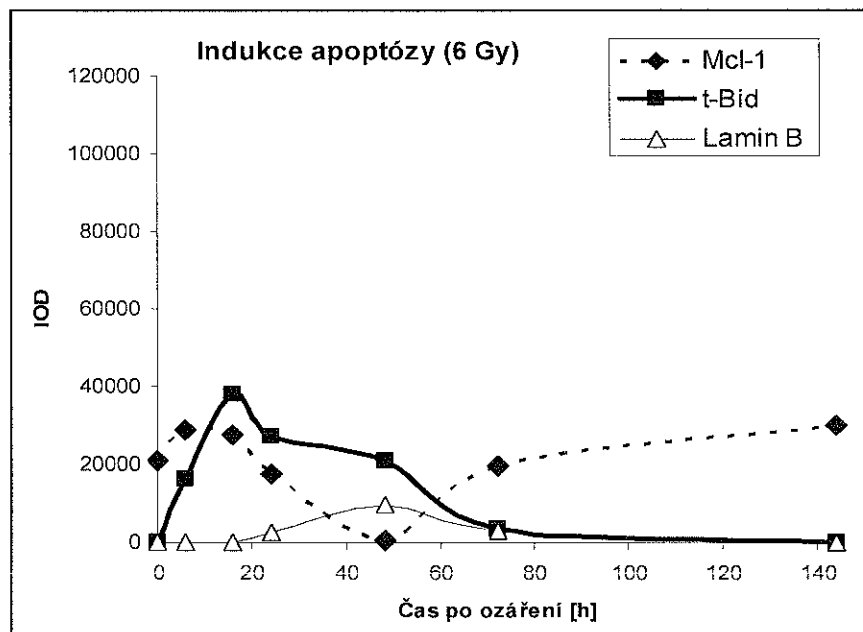
Mitochondrie buněk HL-60 byly izolovány 16 h po ozáření dávkami 2,5; 5; 7,5 a 10 Gy a lýza byla provedena v čase, kdy Bid byl subletální dávkou rozštěpen na aktivní t-Bid a mohl působit na integritu mitochondriální matrix. Zjistili jsme, že uvolnění cyt-c do cytoplazmy v tomto časovém období působí pouze dávka 10 Gy (obr. 11). Dávky do 7,5 Gy indukují jeho uvolnění později.

Na druhou stranu 16 h po ozáření letálními dávkami jsme pozorovali totální uvolnění cyt-c, a proto jsme provedli stejný experiment již 4 h po ozáření. I v tomto čase po ozáření 10, 20 a 50 Gy je již Bid štěpen na t-Bid, ale pouze dávky 20 a 50 Gy působily celkové uvolnění cyt-c z mitochondrie a dávka 10 Gy nezpůsobila téměř žádný pokles (obr. 16).

Buňky MOLT-4 jsme nejprve ozářili dávkou 7,5 Gy s cílem sledovat dynamiku uvolnění cyt-c. Pozorovali jsme úbytek cyt-c v mitochondriální frakci mezi 4 a 16 h po ozáření (obr. 17). Bid byl u těchto buněk štěpen na t-Bid mezi 6 a 16 h, a proto jsme izolovali mitochondriální frakci 12 h po ozáření. Po ozáření dávkami 1, 2, 3, 5 a 10 Gy jsme zjistili, že cyt-c je uvolňován do cytoplazmy s výraznou dávkovou závislostí (obr. 17), která naznačuje, že i tento protein by bylo možné využít pro biodozimetrické účely v oblasti vyšších dávek.

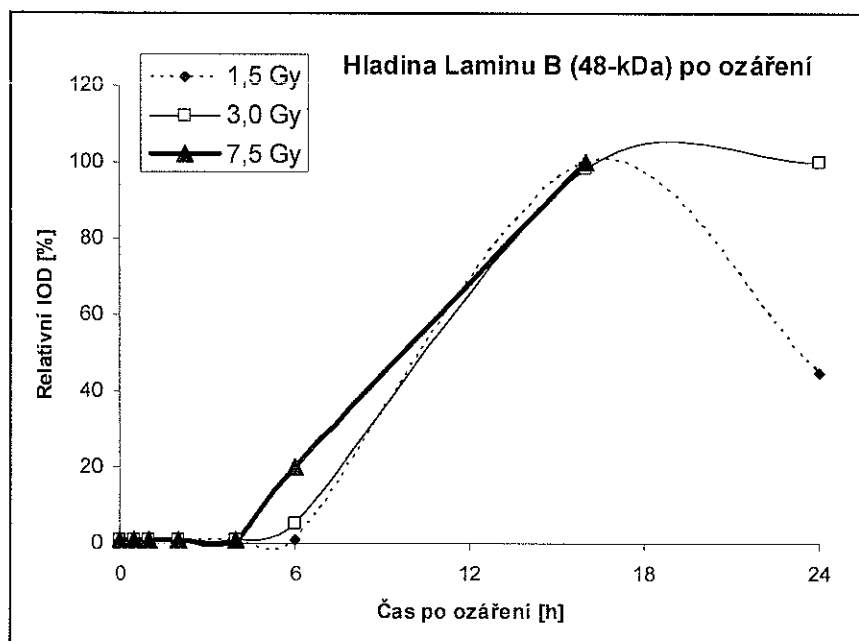
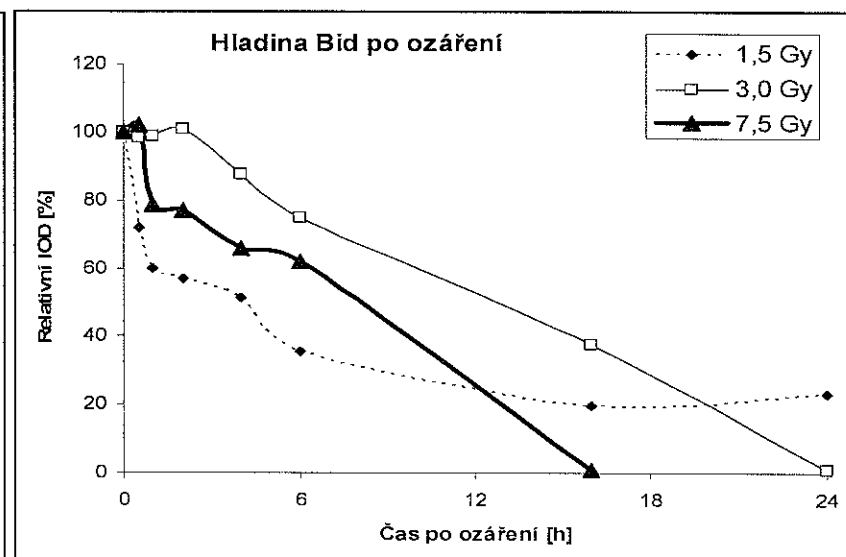
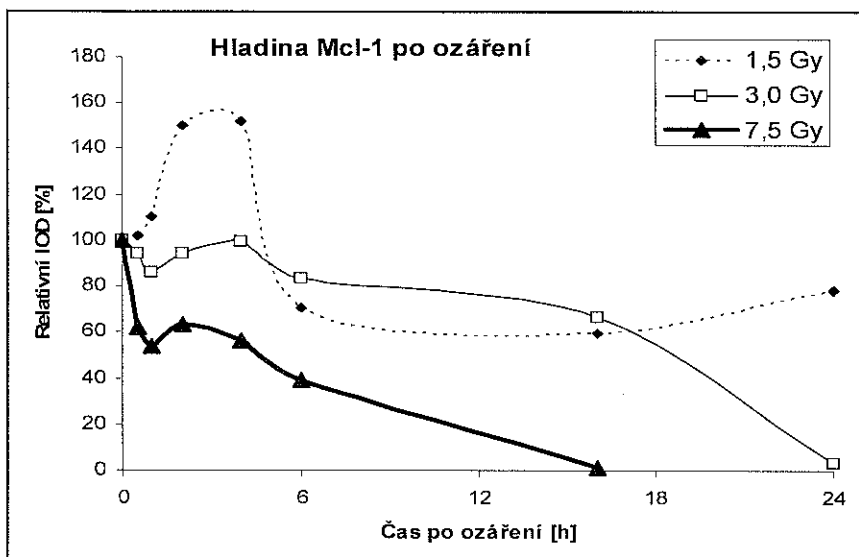


**Obr. 13. Ionizující záření působí pokles Mcl-1 a Bid.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. **(A) Buňky HL-60.** Po ozáření dávkou 6 Gy nikoliv po dávce 20 Gy množství Mcl-1 narůstá, později klesá s nástupem apoptózy (potvrzena detekcí štěpení nukleárního laminu B). Před indukcí apoptózy je Bid (22 kDa) štěpen na proapoptotický t-Bid (15 kDa). Po subletální dávce dojde za 72 h k obnově buněčného cyklu, což se projeví nárůstem Mcl-1 a poklesem t-Bid a štěpeného laminu B. **(B) Buňky MOLT-4.** Stejně jako u buněk HL-60 dochází po cytostatické a subletální (1,5 a 3 Gy) nikoliv po letální dávce (7,5 Gy) k iniciálnímu nárůstu množství Mcl-1 (viz obr. 15). S nástupem apoptózy jeho množství klesá. Pokles plné formy Bid (22 kDa) koreluje s nástupem apoptózy (potvrzena detekcí štěpení nukleárního laminu B).

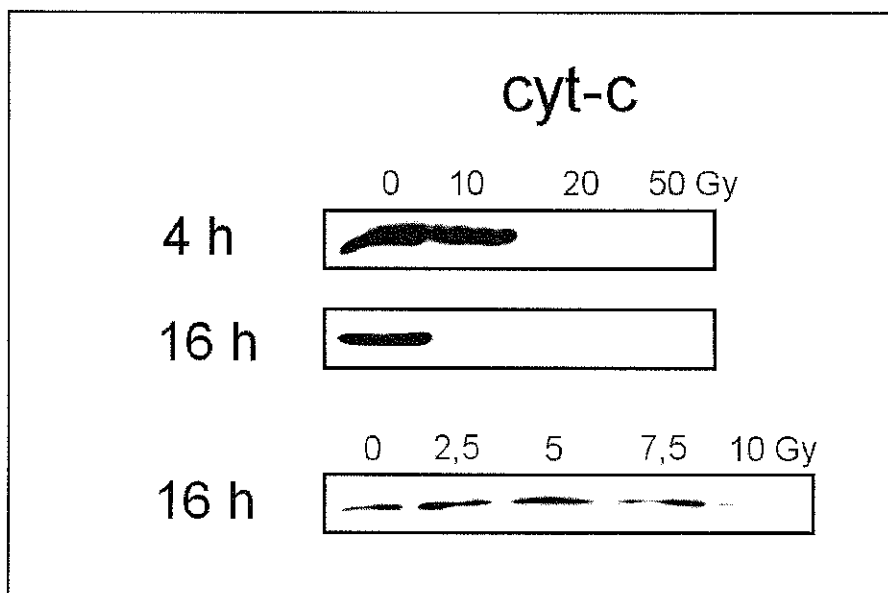
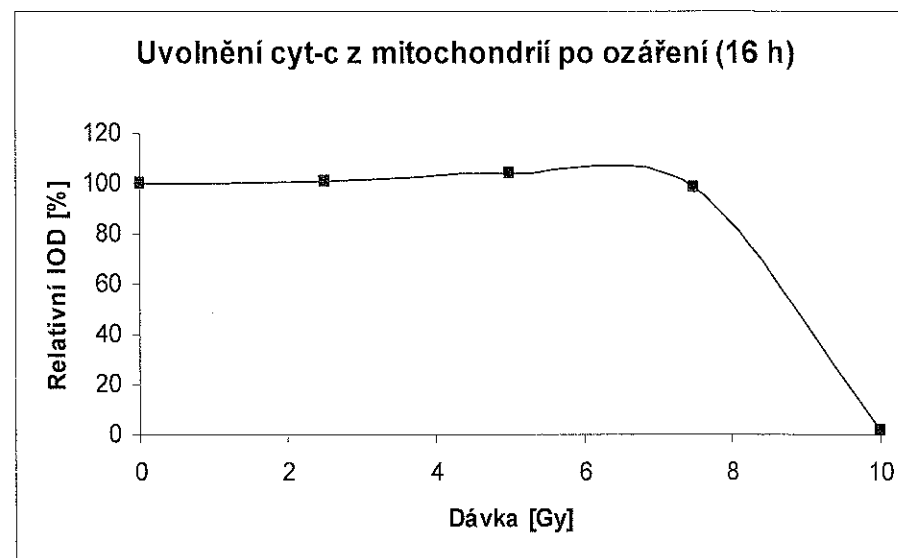
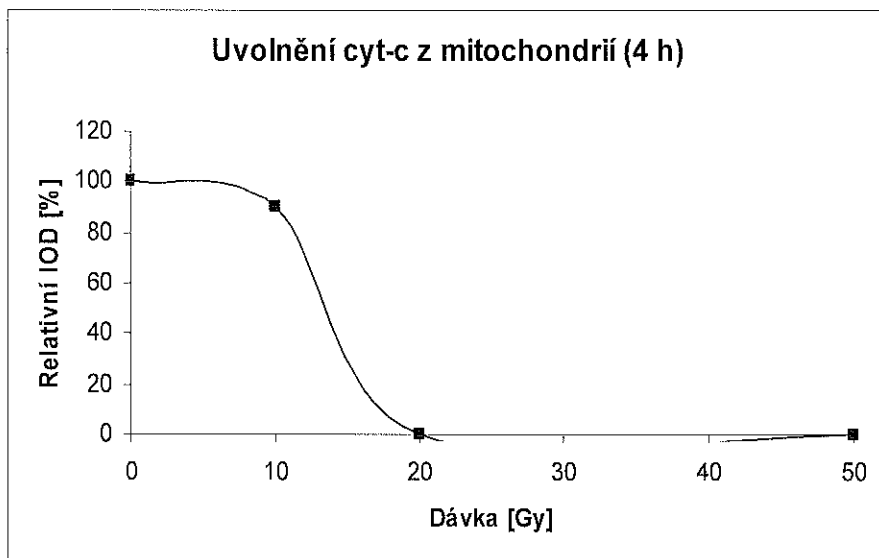


**Obr. 14. HL-60. Ionizující záření působí pokles Mcl-1 a Bid.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu uvedených na obr. 13 v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická denzita.

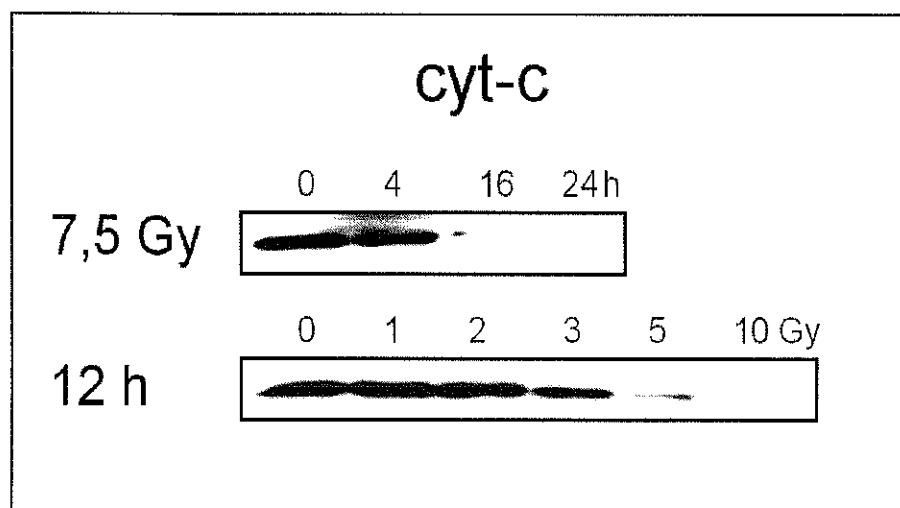
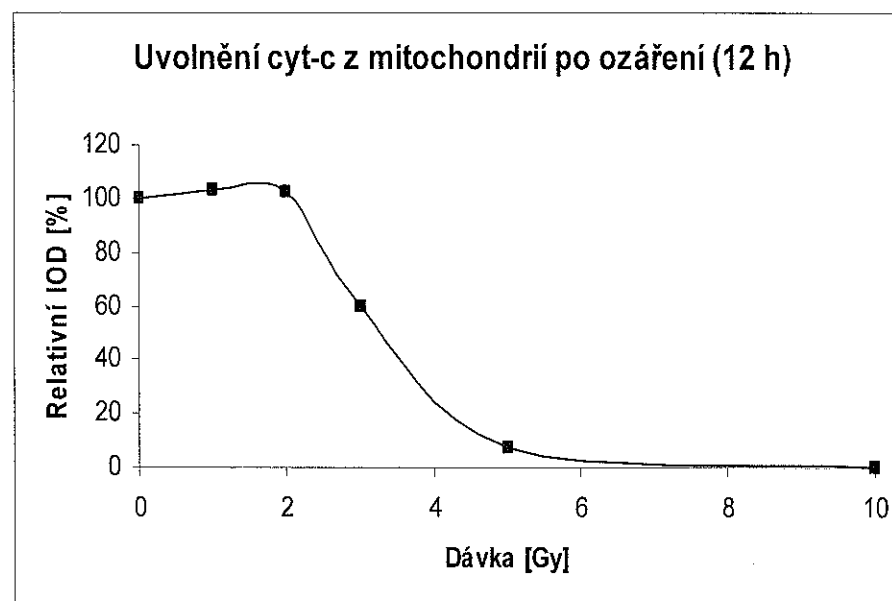
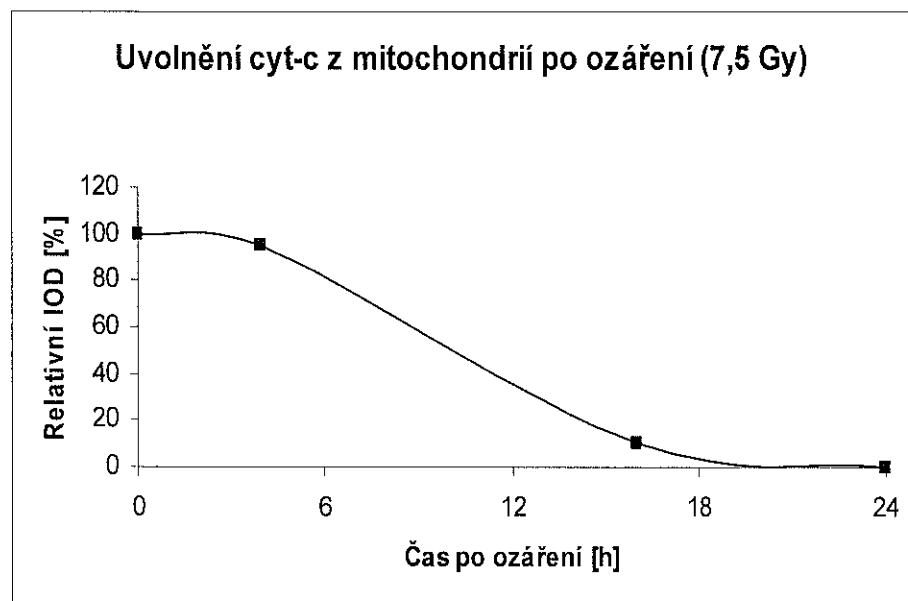




**Obr. 15. MOLT-4. Ionizující záření působí pokles Mcl-1 a Bid.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Grafy vyjadřují relativní densitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu uvedených na obr. 13 v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická densita.



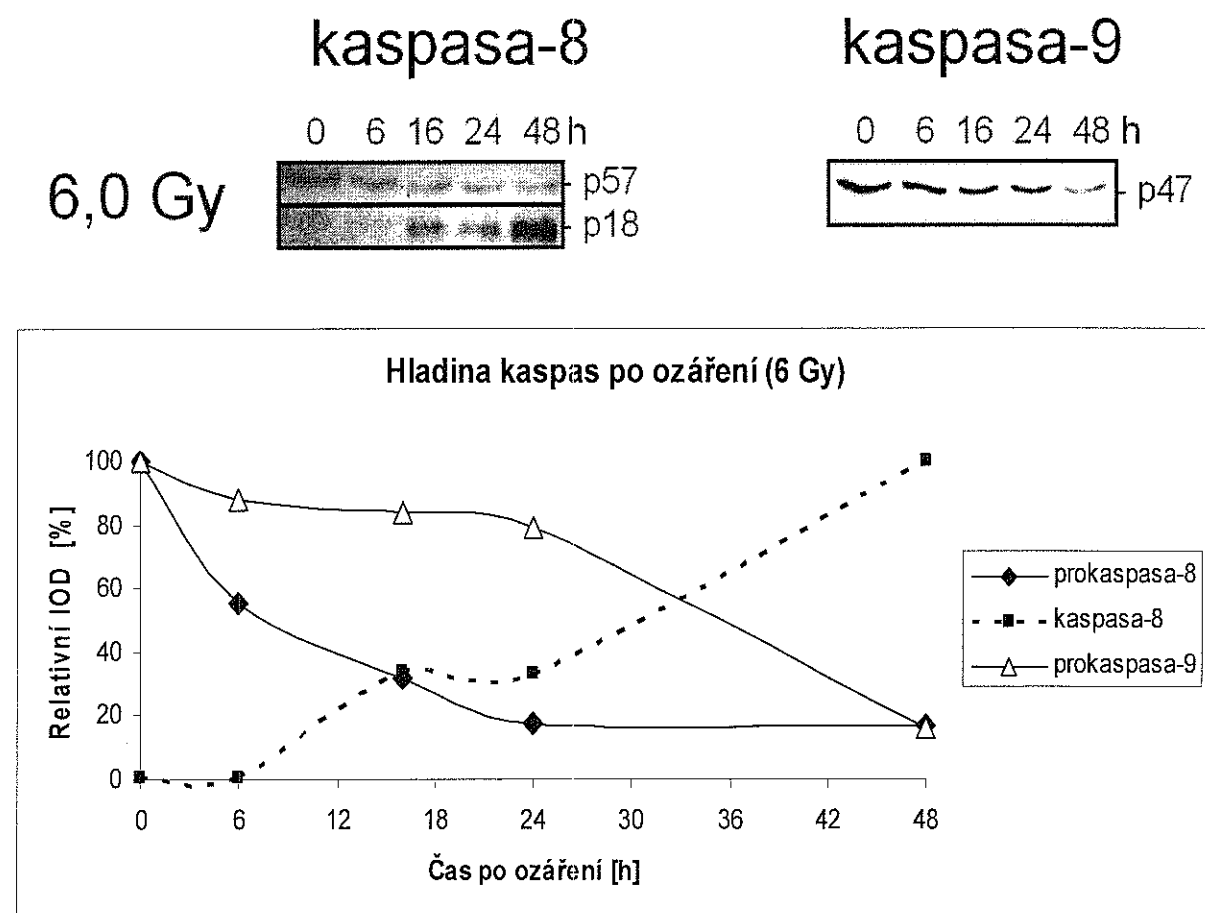
**Obr. 16. HL-60. Uvolnění cyt-c z mitochondriální matrix po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a mitochondriální frakce byly izolovány, jak je indikováno. Uvolnění cyt-c z mitochondrií je časově závislé na dávce. Po dávkách 20 a 50 Gy dochází k uvolnění velmi rychle (4 h po ozáření). Dávka 10 Gy indukuje jeho uvolnění za 16 h ovšem dávky menší než 10 Gy až později. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. Grafy vyjadřují denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce. *IOD*, integrovaná optická denzita.



**Obr. 17. MOLT-4. Uvolnění cyt-c z mitochondriální matrix po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a mitochondriální frakce byly izolovány, jak je indikováno. Po dávce 7,5 Gy dochází k uvolnění mezi 4 a 16 h po ozáření. Za 12 h po ozáření je dynamika uvolnění dávkově závislá. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů. Grafy vyjadřují densitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na dávce. *IOD*, integrovaná optická densita.

### 5.2.4 Aktivace iniciačních kaspas-8 a -9

Jednou z iniciačních kaspas podílejících se na apoptotické signalizaci je kaspasa-8, která je zodpovědná za štěpení a aktivaci molekuly Bid. Buňky HL-60 jsme ozářili dávkou 6 Gy a detekovali jsme aktivní kaspasu-8 (obr. 18). Inaktivní proforma (57 kDa) byla štěpena ve funkční kaspasovou podjednotku (18 kDa). Toto štěpení bylo prokázáno po 16 h, tedy v čase, kdy byl štěpen Bid (obr. 13A).



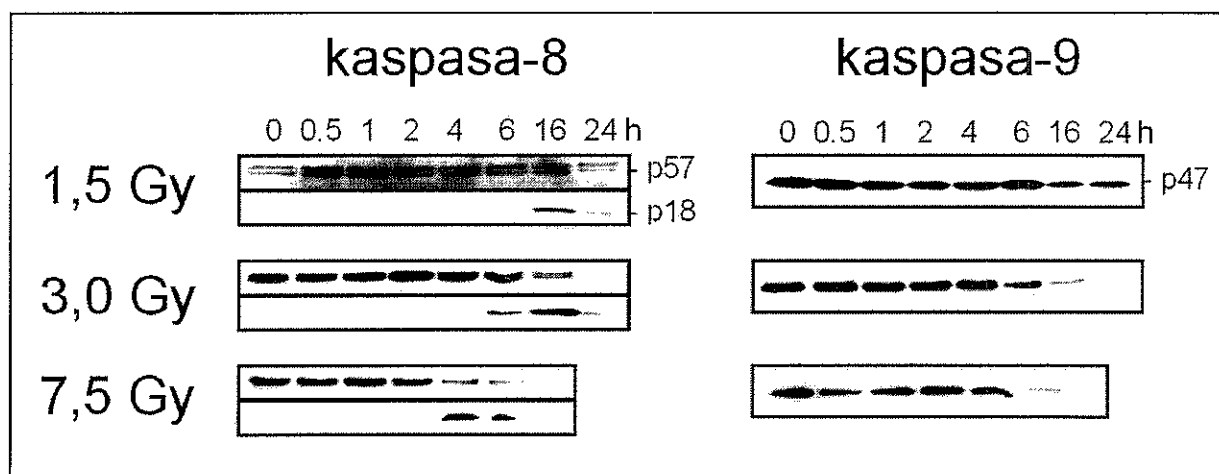
**Obr. 18. HL-60. Aktivace iniciačních kaspas po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Po ozáření dávkou 6 Gy jsme detekovali aktivní kaspasu-8. Inaktivní proforma (57 kDa) byla štěpena ve funkční kaspasovou podjednotku (18 kDa). Toto štěpení bylo detekováno po 16 h, tedy v čase, kdy byl štěpen Bid (obr. 13A). Pokles prokaspasy-9 byl zaznamenán s časovým zpožděním (24-48 h). Graf vyjadřuje denzitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická denzita.

Také u buněk MOLT-4 korelovalo štěpení kaspasy-8 se snížením množství Bid. Po dávce 1,5 Gy byla detekována aktivní podjednotka za 16 h po ozáření. Když jsme zvýšili dávku na 3 nebo 7,5 Gy byla tato detekována za 6 nebo 4 h (obr. 19 a 20).

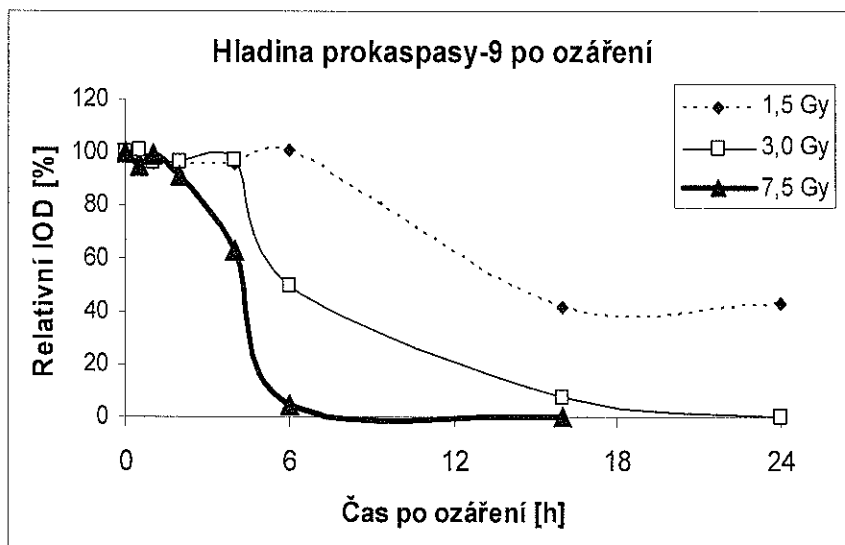
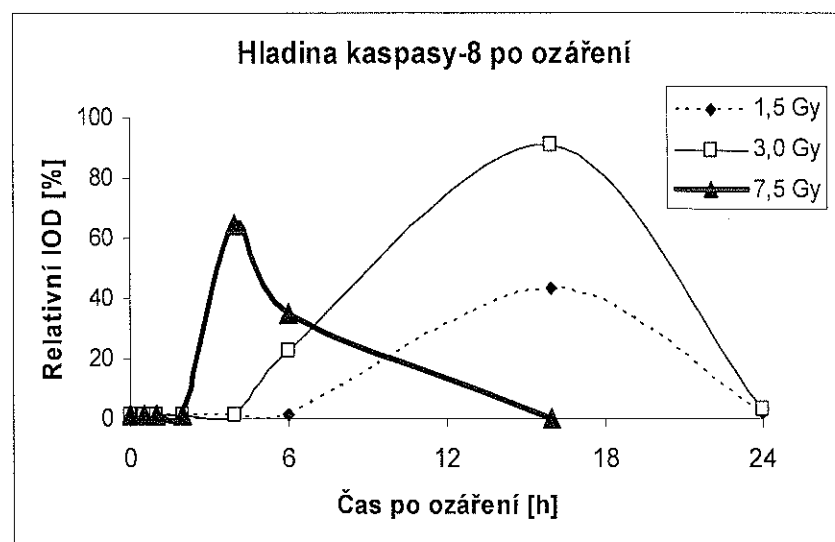
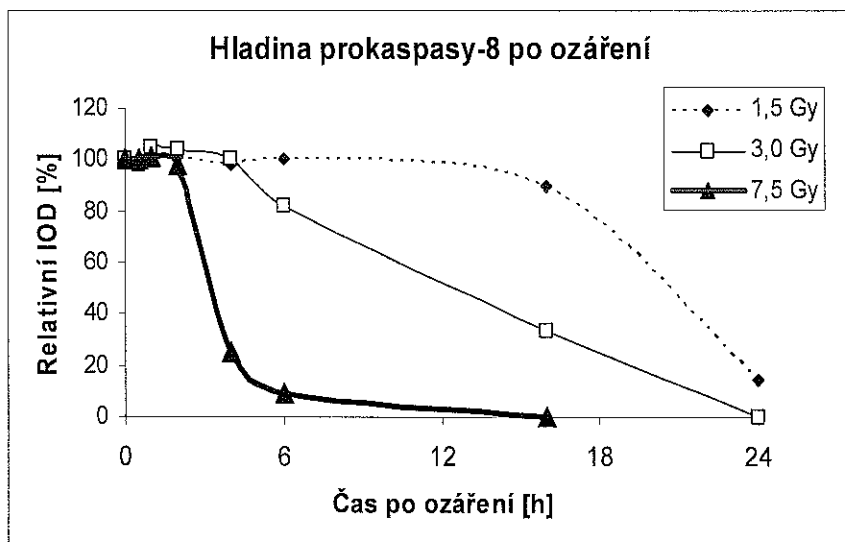
Další iniciační kaspasou podílející se na apoptotické signalizaci je kaspasa-9. Její aktivace je podmíněna přítomností uvolněného cyt-c v cytoplazmě, jelikož tento se účastní tvorby tzv. apoptosomu, ve kterém dochází k maturaci kaspasy-9. Prokaspasa-9 je molekula o velikosti 47 kDa a její aktivní podjednotka má 17 kDa. V našich experimentech jsme měli k dispozici protilátku, která detekovala epitop přítomný pouze na prokaspase-9 a kaspasu-9 jsme považovali za aktivní v momentě, kdy se množství její inaktivní (plné) formy snížilo.

K tomu došlo u buněk HL-60 po dávce 6 Gy za 24 až 48 h po ozáření (obr. 18). Mezi aktivací kaspasy-8 a kaspasy-9 byl interval minimálně 8 h.

Naproti tomu u buněk MOLT-4 jsme pozorovali simultánní štěpení kaspasy-9, které časově korelovalo s aktivací kaspasy-8. Po dávce 1,5 Gy se množství prokaspasy-9 mírně snížilo 16 h po ozáření a po dávce 3 Gy došlo k tomuto snížení za 6 h a po dávce 7,5 Gy za 4 h (obr. 19 a 20).



**Obr. 19. MOLT-4. Aktivace iniciačních kaspas po ozáření.** Buňky byly ozářeny, zlyzovány a analyzovány, jak je indikováno. Po ozáření všemi dávkami jsme detekovali simultánní aktivaci kaspasy-8 a pokles prokaspasy-9. Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.



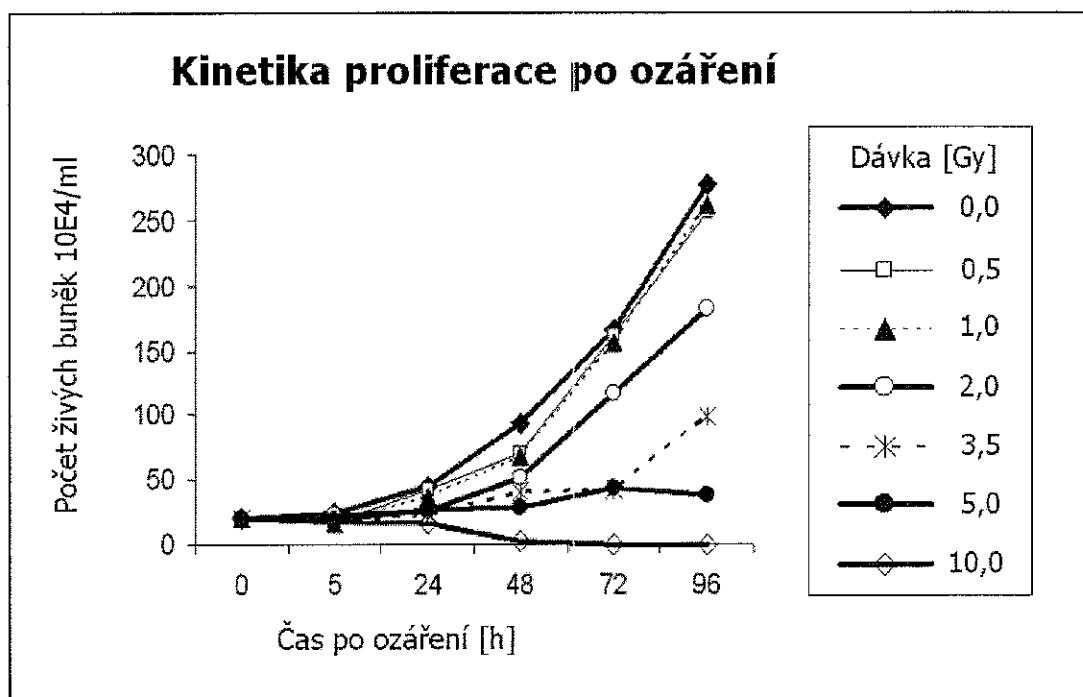
**Obr. 20. MOLT-4. Aktivace iniciačních kaspas po ozáření.** Grafy vyjadřují densitu jednotlivých proteinových skvrn Western blottingu uvedených na obr. 14 v závislosti na čase po ozáření. *IOD*, integrovaná optická densita.

### 5.2.5 Apoptóza v buňkách HL-60

Nejprve byla u obou linií provedena studie proliferační kinetiky po ozáření. Na obr. 21 je znázorněn efekt IZ v dávkách 0,5 - 10 Gy na schopnost proliferace buněk HL-60. Po ozáření dávkami 0,5 a 1 Gy dochází pouze k malému zpomalení růstu buněk vzhledem ke kontrolním (neozářeným) buňkám. Po dávce 2 Gy je pokles proliferační aktivity patrný (48 - 96 h). Buňky ozářené dávkami 3,5 a 5 Gy proliferovaly jen velmi málo. Dávka 10 Gy byla letální a vedla ke smrti všech buněk v průběhu 72 hodin po ozáření.

Pro detekci apoptózy u buněk HL-60 bylo použito čtyř různých metod: morfologická identifikace apoptotických buněk, měření obsahu DNA, detekce antigenu APO2.7 (7A6) a kaspasového štěpení laminu B. Obr. 22A porovnává množství apoptotických buněk v procentech získané morfologickou identifikací a detekcí APO2.7-pozitivních a sub-G1 buněk 6 h po ozáření.

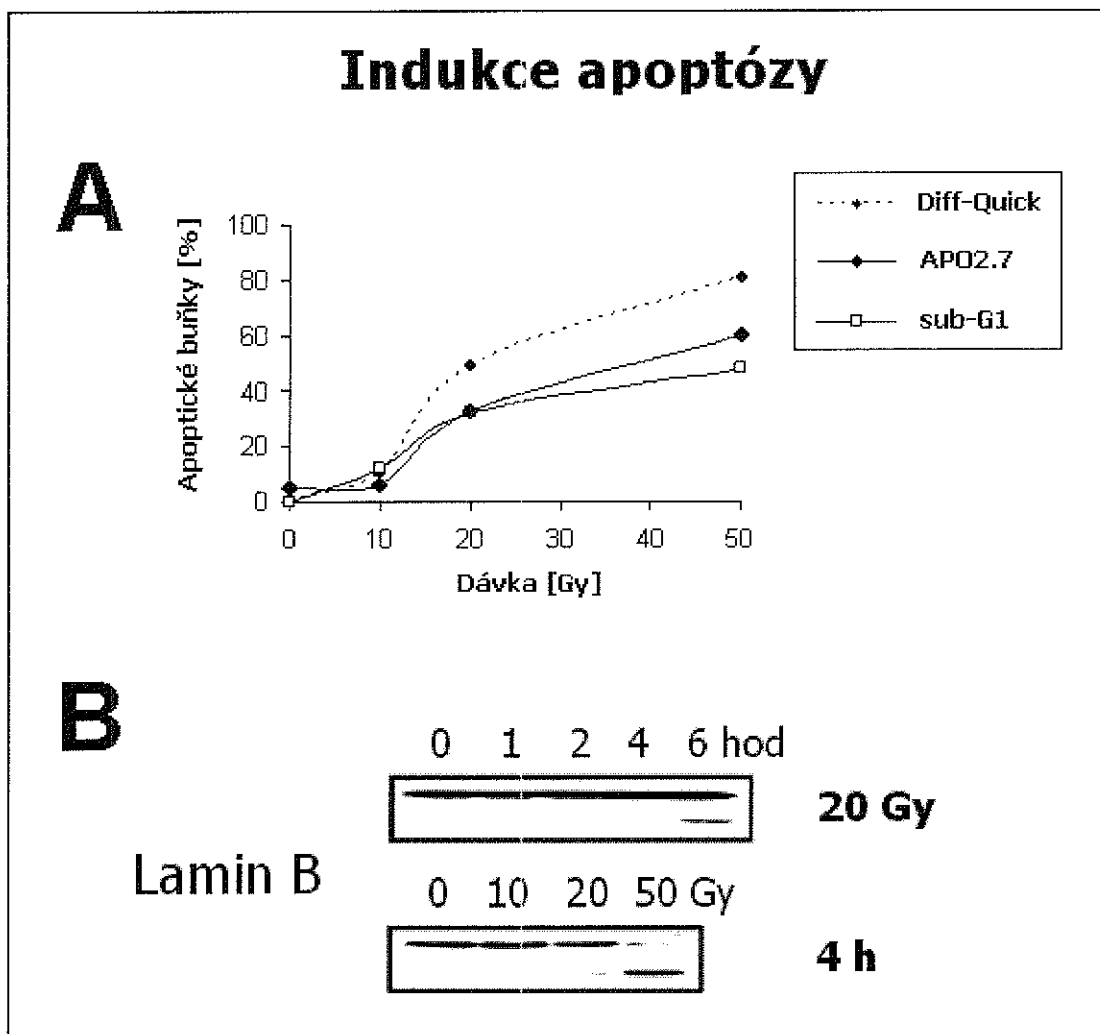
První metoda využívá hodnocení cytopspinových preparátů. Jako apoptotické jsou identifikovány buňky s kondenzovaným a fragmentovaným jádrem a výčnělky (blebbingem)



**Obr. 21. HL-60. Vliv ionizujícího záření na kinetiku proliferace.** Buňky byly ozářeny uvedenými dávkami a obarveny Trypanovou modří. Počítány byly živé (nebarvící se) buňky. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů.

na buněčné membráně. Za 6 h bylo po ozáření dávkou 10 Gy 11 %, po dávce 20 Gy 49 % a po dávce 50 Gy 81 % buněk apoptotických (1 % v kontrolní skupině).

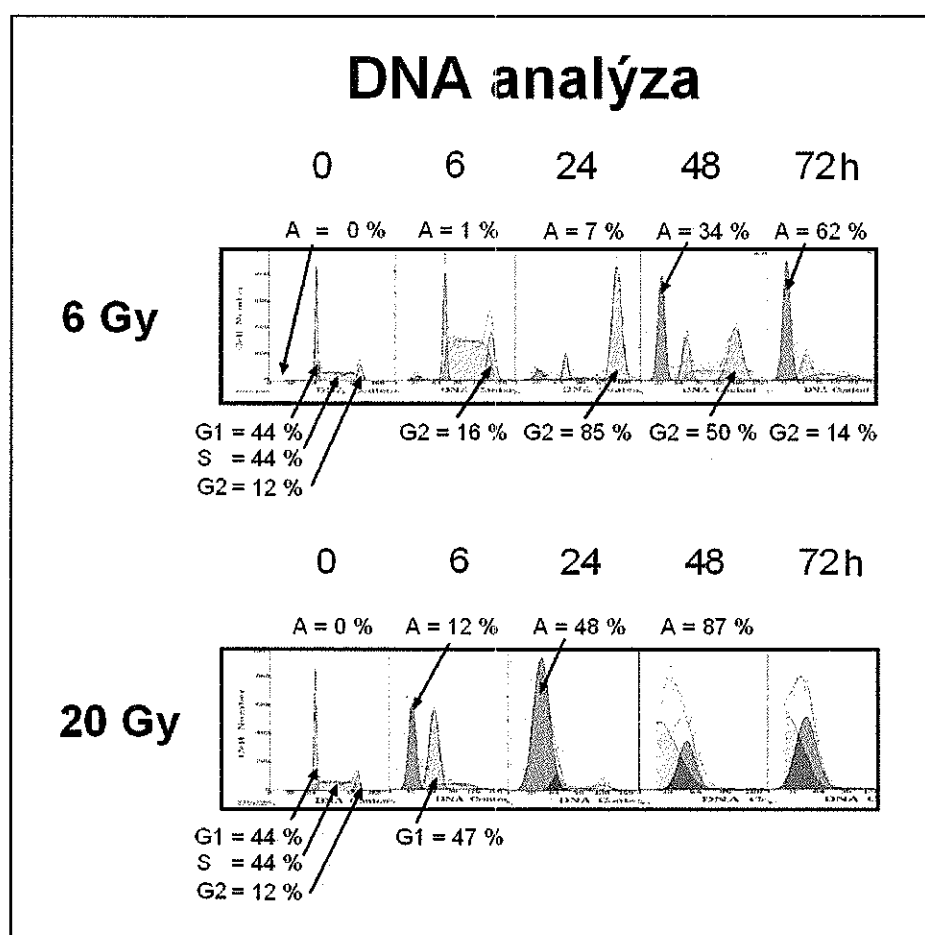
Pro detekci apoptotických buněk jsme použili průtokově-cytometrické měření obsahu DNA a hnocení podle tzv. sub-G1 píku, který odpovídá množství apoptotických buněk. Za 6 h bylo po ozáření dávkou 10 Gy 1 %, po dávce 20 Gy 32 % a po dávce 50 Gy 48 % buněk apoptotických (0 % v kontrolní skupině).



**Obr. 22. HL-60. Srovnání metod detekce apoptotických buněk 6 h po ozáření.** Buňky byly ozářeny dávkami 10, 20 nebo 50 Gy a počet apoptotických buněk byl stanoven v indikovaných časových intervalech. **(A) Kvantitativní detekce.** Apoptotické buňky byly stanoveny morfologicky barvením Diff-Quick, poté byly měřeny průtokovou cytometrií pomocí analýzy DNA obsahu (sub-G1 píku) a dále byly určeny jako APO2.7-pozitivní. Každý bod reprezentuje průměr z nejméně tří nezávislých experimentů. **(B) Western-blotová detekce.** Analýza štěpení jaderného laminu B. Tento protein (68 kDa) je po ozáření a následné indukci apoptózy kaspasově štěpen na příslušný fragment (48 kDa). Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.



Pro určení apoptotických buněk jsme dále použili detekci antigenu APO2.7 (opět pomocí průtokové cytometrie). Jelikož je tento antigen lokalizován na mitochondriální membráně apoptotických buněk, musí být cytoplasmatická membrána stanovených buněk permeabilní, aby mohlo dojít k reakci protilátky s antigenem. V pozdní fázi apoptózy mají buňky propustnou cytoplasmatickou membránu vlivem apoptotické degradace a jedná se o buňky tzv. pozdně apoptotické. Časně apoptotické buňky si ještě zachovávají integritu buněčné membrány a je nutné ji uměle permeabilizovat (např. digitoninem). Po vysokých dávkách dochází k indukci apoptózy s rychlým nástupem, a proto jsme použili metodu s permeabilizací. Za 6 h po ozáření bylo po ozáření dávkou 10 Gy 6 %, po dávce 20 Gy 33 % a po dávce 50 Gy 60 % buněk apoptotických (5 % v kontrolní skupině).



**Obr. 23. HL-60. Analýza buněčného cyklu po ozáření.** Buňky byly ozářeny a obsah DNA byl stanoven pomocí průtokové cytometrie v časových intervalech, jak je indikováno. Dávka 6 Gy působí oddálenou apoptózou. Za 24 h se buňky akumulují v G2-fázi a apoptóza je indukována za 48 - 72 h po ozáření. Dávka 20 Gy naproti tomu působí rychlou apoptózou, neindukuje G2 blok a většina buněk umírá do 24 h po ozáření. *A* - buňky apoptotické (tzv. sub-G1 buňky); *G1*, *S* a *G2* - buňky v G1-, S- a G2-fázi. Uveden je reprezentativní záznam analýzy obsahu DNA z  $10^5$  buněk.

Další metodou potvrzující indukci apoptózy buněk HL-60 byla detekce jaderného proteinu laminu B (obr. 22B). Fragmentovaný lamin B byl nalezen 4 h po dávce 50 Gy a malé množství bylo detekováno i po dávce 20 Gy. Tato dávka indukovala štěpení laminu B prokazatelně 6 h po ozáření. Dávka 10 Gy v tomto čase štěpení laminu B neindukovala. Po dávce 6 Gy byl nalezen štěp laminu B 24 h po ozáření. Maximální štěpení bylo pozorováno za 48 h, poté (72 h) došlo k poklesu a za 144 h po ozáření již fragmentovaný lamin B nebyl detekován, jelikož apoptotické buňky se rozpadají a detekovány jsou pouze živé buňky, které byly schopné opravit zářením indukované poškození. Na druhou stranu po dávce 20 Gy byla indukována rychlá apoptóza a tedy i rychlé štěpení tohoto proteinu za 6 h (obr. 13A).

Obr. 23 ukazuje rozdíl mezi indukcí apoptózy buněk HL-60 po ozáření nízkými (6 Gy) a vysokými dávkami (20 Gy). Jedná se o průtokově-cytometrické stanovení obsahu buněčné DNA. Po dávce 6 Gy je za 6 h pouze 1 % buněk apoptotických. Za 24 h je indukován výrazný G2 blok (85 % buněk) a apoptóza nastupuje až za 48 h po ozáření. Proto je tato buněčná smrt označována jako oddálená apoptóza. Naproti tomu po dávce 20 Gy je za 6 h apoptotických již 12 % buněk. Buňky se akumulují v G1-fázi (47 %), ke G2 bloku nedochází a za 24 h je u majoritní části buněk (87 %) indukována apoptóza.

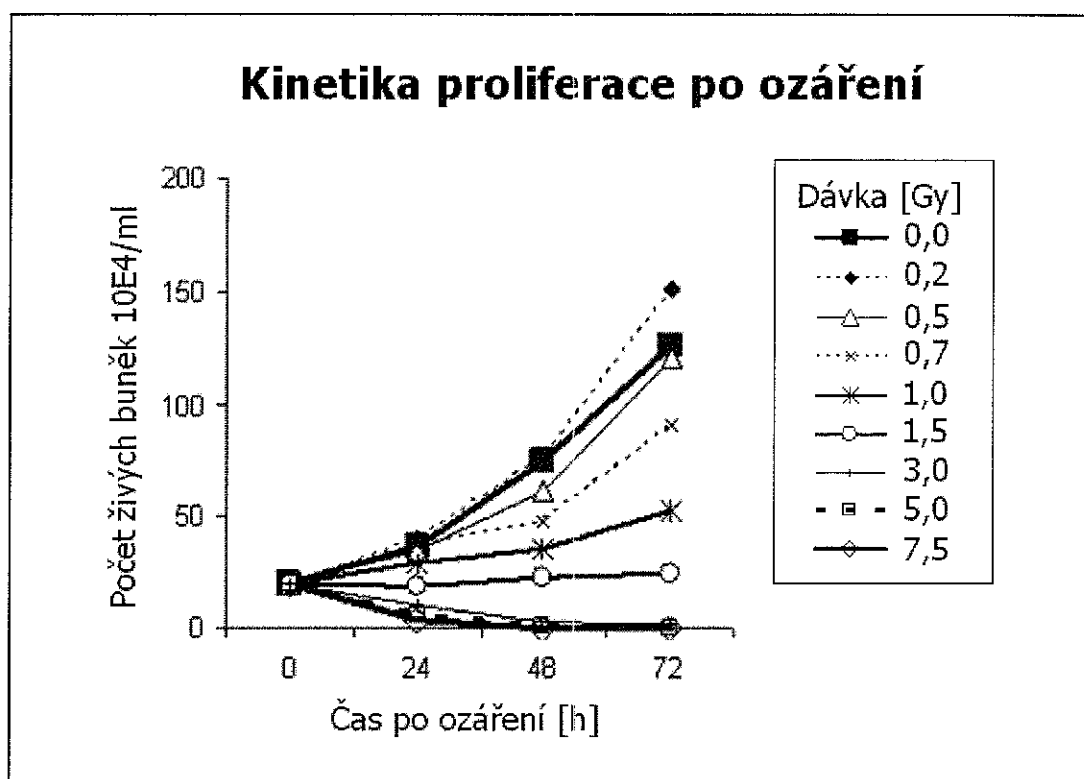
### 5.2.6 Apoptóza v buňkách MOLT-4

Obr. 24 znázorňuje vliv IZ v dávkách 0,2 - 7,5 Gy na schopnost proliferace buněk MOLT-4. Po ozáření dávkami do 0,5 Gy dochází pouze k nepatrnému zpomalení růstu buněk vzhledem ke kontrolním (neozářeným) buňkám. Dávka 0,2 Gy dokonce za 72 h proliferaci potencuje. Po dávkách 0,7 - 1 Gy je patrný pokles proliferací aktivity (48 - 72 h) a dávka 1,5 Gy působí na buňky cytostaticky. Dávky 3; 5 a 7,5 Gy byly supra/letální a vedly ke smrti všech buněk v průběhu 72 h po ozáření.

Pro detekci apoptózy u buněk MOLT-4 bylo použito čtyř různých metod: detekce vazby annexinu V, měření obsahu DNA, detekce antigenu APO2.7 a detekce kaspasového štěpení laminu B. Obrázek 25A porovnává množství apoptotických buněk v procentech získané průtokově-cytometrickou detekcí annexin-pozitivních, APO2.7-pozitivních a sub-G1 buněk 24 h po ozáření dávkami 10, 20 nebo 50 Gy.

První metoda využívá detekce vazby annexinu V na fosfatidylserin pomocí průtokové cytometrie. Expozice fosfatidylserinu na plazmatické membráně svědčí o její porušení a je známkou apoptotického procesu. Touto metodou jsou detekovány buňky časně i pozdně apoptotické. Za 24 h bylo po ozáření dávkou 1,5 Gy 31 %, po dávce 3 Gy 77 % a po dávce 7,5 Gy 94 % buněk apoptotických (0 % v kontrolní skupině).

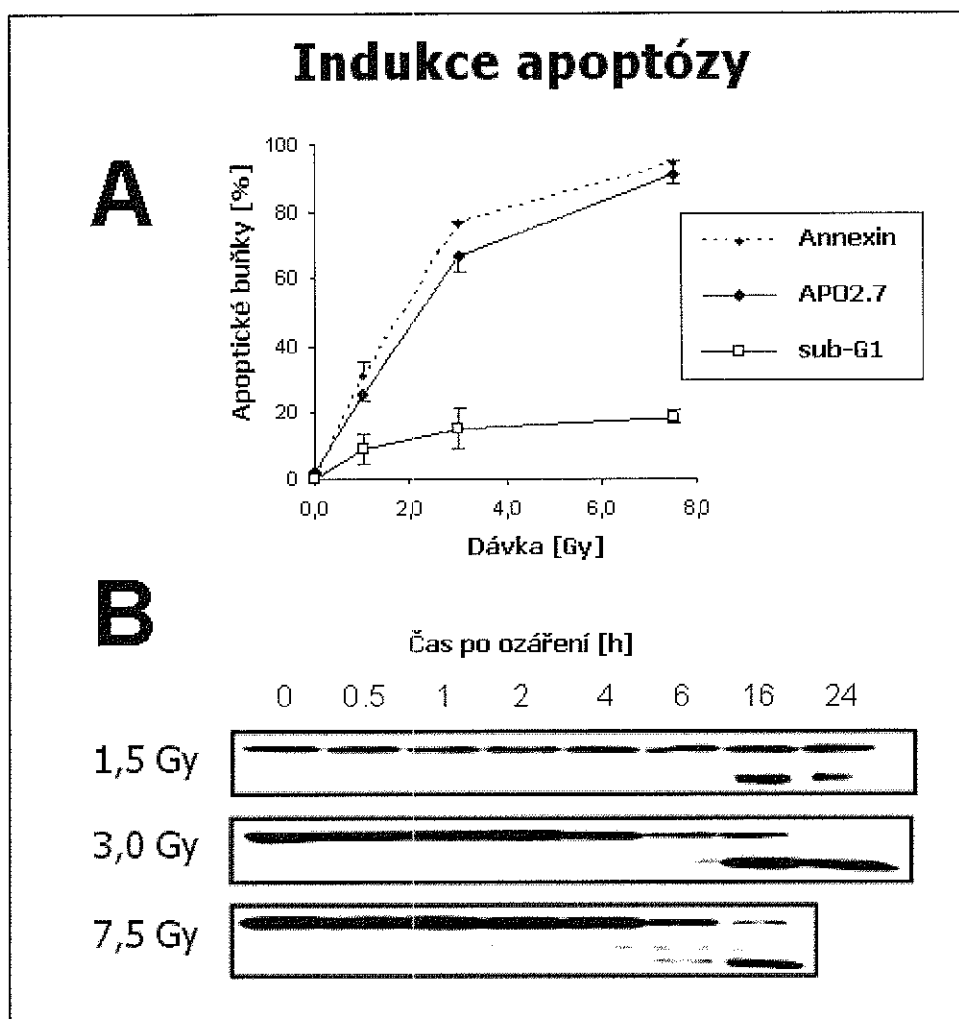
Pro detekci apoptotických buněk jsme použili průtokově-cytometrické měření obsahu DNA a hodnocení podle tzv. sub-G1 píku, který odpovídá množství apoptotických buněk. Za 24 h bylo po ozáření dávkou 1,5 Gy 9 %, po dávce 3 Gy 15 % a po dávce 7,5 Gy 18 % buněk apoptotických (2 % v kontrolní skupině). Pro určení apoptotických buněk jsme dále použili detekci antigenu APO2.7 (opět pomocí průtokové cytometrie). V těchto pokusech jsme použili metodu bez permeabilizace a za 24 h bylo po ozáření dávkou 1,5 Gy 26 %, po dávce 3 Gy 67 % a po dávce 7,5 Gy 91 % buněk apoptotických (0 % v kontrolní skupině). Protože je u buněk MOLT-4 (na rozdíl od buněk HL-60) během indukce apoptózy buněčná membrána rychle permeabilizována, poskytuje metoda detekce annexinu V i APO2.7 téměř shodné výsledky.



**Obr. 24. MOLT-4. Vliv ionizujícího záření na kinetiku proliferace.** Buňky byly ozářeny uvedenými dávkami a obarveny Trypanovou modří. Počítány byly živé (nebarvící se) buňky. Jednotlivé body představují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů.

Další metodou potvrzující indukci apoptózy buněk MOLT-4 byla detekce jaderného proteinu laminu B (obr. 25B). Data získaná pomocí Western blottingu potvrzují, že apoptóza byla indukována mezi 6 a 16 h v závislosti na dávce IZ, jelikož fragmentovaný lamin B byl nalezen 16 h po dávce 1,5 Gy a malé množství bylo detekováno 6 h po dávce 3 nebo 7,5 Gy.

Zajímavé je, že po ozáření letální dávkou 7,5 Gy nedošlo ke štěpení laminu B dříve než po ozáření subletální dávkou 3 Gy (tedy za 6 h), ačkoli na rozdíl od 7,5 Gy bylo toto štěpení méně intenzivnější (obr. 13B).



**Obr. 25. MOLT-4. Srovnání metod detekce apoptotických buněk 24 h po ozáření.** Buňky byly ozářeny dávkami 1,5; 3 nebo 7,5 Gy a počet apoptotických buněk byl stanoven v indikovaných časových intervalech. **(A) Průtokově-cytometrická detekce.** Apoptotické buňky byly stanoveny APOPTESem (DakoCytomation) jako annexin V-pozitivní, poté byly měřeny pomocí sub-G1 píku analýzy DNA obsahu a dále byly určeny jako APO2.7-pozitivní (bez permeabilizace). Každý bod reprezentuje průměr z nejméně tří nezávislých experimentů. **(B) Western-blotová detekce.** Analýza štěpení jaderného laminu B. Tento protein (68 kDa) je po ozáření a následné indukci apoptózy kaspasově štěpen na příslušný fragment (48 kDa). Uvedeny jsou reprezentativní Western bloty ze tří nezávislých experimentů.

## 6 DISKUSE

### 6.1 Zářením aktivovaná ATM-dependentní signalizace v buňkách MOLT-4

Dodnes jsou proteiny fungující jako senzory poškození DNA savčích buněk převážně neidentifikovány a mechanismy, kterými tyto molekuly převádějí signál poškození DNA na ATM, stále čekají na detailní objasnění. Bakkenist a Kastan (2003) v práci na fibroblastech předpokládají, že dvojitě zlomy DNA (DSB) způsobují lokální změnu struktury chromatinu, což má za následek aktivaci ATM. Ta je aktivována zejména v souvislosti se vznikem DSB, kdežto další formy poškození DNA jako jsou vznik UV-radiací indukovaných fotoproduktů či zastavení replikační vidličky aktivují ATR. Nedávné studie ukázaly, že ATM a ATR vykazují selektivní substrátovou specifitu při odpovědi na různé formy poškození DNA (Helt et al., 2005). ATM se váže na chromatin obklopující DSB, zatímco ATR se akumuluje v místě jednoduchých zlomů DNA (Bakkenist & Kastan, 2003).

Naše práce ukázala, že buňky MOLT-4 (p53-wt) vykazují stejnou odpověď po expozici IZ jako fibroblasty, tj. fosforylují ATM a Chk-2 velmi rychle po ozáření. Zjistili jsme, že ATM byla fosforylována časně po ozáření a množství této fosforylované formy se od 2 h postupně snižovalo (za 4 až 6 h došlo k výraznému poklesu). Později (po ozáření všemi testovanými dávkami) již nebyla fosforylovaná ATM detekována vůbec. Důvodem je fakt, že ATM je degradována ještě před fragmentací DNA během apoptózy a pak dochází k predominanci DNA-PK. To je v souladu s výsledky Mukherjee et al. (2006), kteří prokázali, že H2A.X (jeden z hlavních histonů fosforylovaný ATM během prvních minut po ozáření) je v pozdějších fázích apoptózy fosforylován výhradně prostřednictvím DNA-PK, zatímco ATM je pro tento proces postradatelná.

Dvě další kinasy, checkpoint kinasa-1 a -2 (Chk-1, Chk-2), se nekoncentrují okolo místa poškození DNA, ale přenáší signál dál tím, že se rychlou difúzí šíří po celém jádře. Chk-1 a Chk-2 jsou strukturálně nepříbuzné, ale přesto funkčně se překrývající serin/threoninové kinasy. Chk-1 je labilní protein, aktivní i při neporušeném buněčném cyklu, jelikož hraje důležitou roli v udržování Cdc25C fosfatasy v pohotovostním stavu pro odpověď na poškození DNA tím, že jí fosforyluje na Ser<sup>216</sup> během S- a M-fáze (Kaneko et al., 1999; Zhao et al., 2002). Naproti tomu Chk-2 je relativně stálý protein, který při odpovědi na radiační poškození DNA kontroluje buněčný cyklus a při absenci tohoto poškození je inaktivní (Lukáš et al., 2001). Nicméně nové poznatky ze specifických genetických studií naznačují, že Chk-1

a nikoliv Chk-2 je jedinou relevantní *checkpoint* kinasou pro tzv. cílenou protinádorovou léčbu (Xiao et al., 2006).

Matsuoka et al., (2000) demonstrovali na fibroblastech, že fosforylovaná ATM následně fosforyluje Chk-2 na Thr<sup>68</sup>. V práci Tichý et al. (2007) jsme ukázali, že za 0,5 h po ozáření dávkou 1,5 a 3 Gy se množství aktivní ATM zvyšuje, nicméně je signifikantně nižší než po dávce 7,5 Gy. Přesto je i toto malé množství dostačující k tomu, aby byla aktivována Chk-2, jejíž fosforylaci jsme prokázali také během 0,5 h po všech použitých dávkách.

K prvotním změnám probíhajícím v důsledku vzniku DSB dochází v chromatinu obklopujícím poškozené místo. V místě DSB je jeden z chromatinových proteinů, histon H2A.X, fosforylován ATM rychle (v minutách) po ozáření (Rogakou et al., 1998). Tato fosforylace se dále šíří po sousedícím chromatinu. Na modifikovaný chromatin se pak váží další proteiny, např. 53BP1, a vznikají ložiska, do kterých se translokuje celá řada proteinů souvisejících s reparačními a smrtícími pochody. Mezi proteiny, které kolokalizují s fosforylovaným H2A.X v tzv. ložiscích neboli focích (IRIF) patří zejména proteiny související s aktivačními a reparačními pochody - ATM, Mre11, Rad 50 a Nbs1 (proteiny reparačního komplexu MRN), Mdc1, 53BP1 a BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2006). Tyto proteiny jsou schopny obklopit DSB ve všech fázích buněčného cyklu. Interakce všech těchto proteinů jsou esenciální pro reparaci DSB. Proteiny důležité pro zástavu buněčného cyklu jako p53, Cdc25A fosfatasa, Chk-1 a -2 se v aktivované formě neakumulují v místě DSB, ale jsou aktivovány uvolněnou aktivní ATM. Například fosforylace p53 se objevuje také brzy po ozáření, avšak disperzně po celém jádře buňky (Bekker-Jensen et al., 2006).

Tvorbu IRIF jsme pozorovali v konfokálním mikroskopu již 2 minuty po ozáření dávkou 1,5 Gy, za 72 h byla již většina buněk bez IRIF, avšak v některých buňkách přetrvávala nereparovaná ložiska. Zde je nutno poznamenat, že apoptotické buňky při zpracování vzorků neadherují dobře na mikroskopické sklíčko, většina jich je během barvení ztracena a tato analýza je zachytí pouze sporadicky. Naproti tomu pomocí metody western blot, která zpracovává celobuněčné lyzáty z kompletní buněčné populace, jsme největší fosforylaci  $\gamma$ H2A.X pozorovali za 24 h, tedy v době indukce apoptózy.

ATM také kontroluje aktivaci dalších komponent reparačního aparátu buňky, komplexu Mre11/Rad50/Nbs1. Gatei et al. (2000) poukázali na to, že defekty ATM brání fosforylaci Nbs1 a že tato fosforylace je podmínkou normální radiosensitivít buněk. Je známo, že defekt v *Nbs1* genu (působící vyřazení funkce reparačního proteinu Nbs1) způsobuje podobné symptomy jako defekt ATM (Varon et al., 1998). Onemocnění je známo jako Nijmegen Breakage Syndrom. Prokázali jsme, že ATM i p53 jsou v buňkách MOLT-4 funkční (Tichý et

al., 2007). Následně jsme prokázali, že nemodifikovaný (nefosforylovaný) Nbs1 je ve zmíněných buňkách přítomen bez ohledu na to, zda jsou či nejsou ozářeny. Nedetkovali jsme však fosforylovanou formu Nbs1 na Ser<sup>343</sup>. Navíc se zdá, že množství nefosforylovaných MRN proteinů klesá s rostoucí dávkou a 1 h po ozáření supraletálními dávkami (5 – 10 Gy) nebyly tyto detekovány vůbec. Některé genetické studie (Resnick et al., 2003; Chryanowska et al., 2006) ukázaly, že mutace *Nbs1* genu jsou spojeny s vyšším rizikem výskytu malignit a že tyto mutace mohou hrát důležitou roli u relapsu akutní lymfatické leukemie. Uvedená data souhrnně podporují hypotézu, že navzdory funkční ATM není reparace zářením indukovaného poškození DNA u buněk MOLT-4 dostatečná. Jedním z důvodů může být špatná funkce Nbs1 a z toho vyplývající zvýšená radiosensitivita.

Po ozáření dávkami 1 - 10 Gy jsme zaznamenali pokles všech tří komponent MRN komplexu za 1 h. Na druhou stranu jsme za 1 h po ozáření stejnými dávkami detekovali nárůst fosforylované formy H2A.X na Ser<sup>139</sup>. Tato fosforylace je kritická, jelikož bez fosforylovaného H2A.X nedochází k efektivnímu rozpoznání a/nebo reparaci DSB (Pilch et al., 2003). Množství  $\gamma$ H2A.X je v neozářených buňkách minimální a po dávkách 1,5 a 3 Gy stoupá již v prvních hodinách po ozáření. Masivní fosforylace však byla detekována až v pozdějších časových intervalech, kdy byla indukována apoptóza a podle práce Mukherjee et al. (2006) je tato pozdní fosforylace závislá na DNA-PK a nikoliv na ATM. Tuto domněnku podporují i naše výsledky, jelikož aktivní ATM jsme pozorovali pouze do 6 h po ozáření; později aktivní ATM nebyla detekována.

Poškození DNA ve formě DSB indukované IZ vede k okamžité aktivaci ATM, která se podílí nejen na regulaci reparace DNA ale také na regulaci buněčného cyklu a převádí signál dál až na nádorový supresor, protein p53. Je dobře známo, že p53 disponuje ochrannými funkcemi jako je stimulace excize vadných nukleotidů či indukce zástavy buněčného cyklu v G1-fázi (přes další genové produkty), která poskytuje čas nutný pro opravu poškozené DNA.

V kontrastu k těmto protektivním funkcím stojí fakt, že p53 se též zapojuje do indukce apoptózy, i když pouze v určitém typu buněk (Ljungman, 2000). Práce Nakano et al. (2001) ukázala, že radiací indukovaná apoptóza v buňkách MOLT-4 je plně závislá na p53. Obě studované kinasy (ATM i Chk-2) společně přispívají k precizní kontrole důležitého článku záchranného týmu buňky - proteinu p53.

Jelikož p53 působí jako transkripční faktor pro řadu genů zprostředkovávajících buď zástavu buněčného cyklu, nebo indukci apoptózy, sehrává kritickou roli v udržování genomové integrity tím, že po vystavení buňky určitému stresu brání propagaci poškozené

DNA. Nakano et al. (1999) a Szkanderová et al. (2003) se domnívají, že množství p53 musí přesáhnout určitý práh, aby byla indukována apoptóza.

Exprese protein p53 byla stimulována 1 h po ozáření cytostatickou a subletální dávkou (1,5 a 3 Gy). Letální dávka indukovala p53 velmi rychle (během 0,5 h, což byl i čas aktivace ATM a Chk-2). Tato rychlost odráží naléhavost stavu v buňce po vzniku rozsáhlého poškození DNA. Je potřeba rychle indukovat dostatečně velké množství p53, aby bylo možno zastavit buněčný cyklus a pokusit se o reparaci poškození či spustit apoptózu. Po „splnění úkolu“ byl p53 degradován pomocí Mdm2, jehož maximální fosforylace byla pozorována podle dávky IZ kolem 4 h po ozáření.

Ovšem pouhá upregulace p53 nestačí. Aby správně fungoval, musí být tento protein posttranslačně modifikován. C-konec p53 slouží jako allosterický regulátor. Fosforylace na Ser<sup>392</sup> lokalizovaném v této doméně zvyšuje schopnost p53 vázat se na specifické sekvence DNA (Criswell et al., 2003). Kaseinkinasa 2 (CK2) fosforyluje p53 na Ser<sup>392</sup>, ale Claudio et al. (2006) ukázali, že Cdk9 je schopna takovéto fosforylace nezávisle na CK2. Sakaguchi et al. (1997) prokázali, že fosforylace na Ser<sup>392</sup> stabilizuje tetramerovou konformaci p53. Tetramerová konformace totiž usnadňuje další fosforylaci na tzv. transaktivací doméně, která je pak lépe přístupná a je kritická pro spuštění transkripční aktivity.

V této práci jsme prokázali, že p53 je fosforylován na Ser<sup>392</sup> a tato fosforylace přetrvává 16 h po cytostatické nebo po subletální dávce a 6 h po letální dávce. Szkanderová et al. (2003) ukázali, že dávka 7,5 Gy způsobuje v buňkách MOLT-4 fosforylaci na Ser<sup>15</sup> a obě tyto fosforylace (Ser<sup>15</sup> a Ser<sup>392</sup>) se chovají v čase podobně - obě klesají 6 h po ozáření.

Za fosforylaci na Ser<sup>15</sup> jsou zodpovědné ATM ale taky ATR a DNA-PK (Shieh et al., 1997; Tibbets et al., 1999; Helt et al., 2005). Tato fosforylace vede k prodloužení životnosti p53, jelikož oslabuje interakci s negativním regulátorem Mdm2, který inhibuje p53-dependentní transaktivaci tím, že přispívá k degradaci p53 (Shieh et al., 1997)

V dalších experimentech jsme fosforylaci p53 na Ser<sup>15</sup> hodnotili pomocí techniky ELISA. Prokázali jsme dávkovou závislost této fosforylace 2 h po ozáření, což dosud u buněk MOLT-4 nebylo pozorováno. Skupina Bekker-Jensena (2006) se zabývala podobnou problematikou na osteosarkomové linii U2OS a fibroblastech BJ a zjistili, že buňky vystavené DSB-generujícím zdroji (laser, IZ) odpovídají homogenním zvýšením fosforylované formy p53 na Ser<sup>15</sup>, který detekovali difúzně v celém jádře pomocí fluorescenční mikroskopie. Na základě našich výsledků můžeme doporučit detekci zmiňované formy p53 pro biodozimetrické účely. Jelikož signifikantní nárůst fosforylace na Ser<sup>15</sup> jsme zaznamenali i na fytohemaglutininem



stimulovaných lidských T-lymfocytech zdravých dárců ozářených *ex vivo* (Vilasová et al., 2008), jeví se tento potenciální marker obdržené dávky IZ jako velmi perspektivní.

## 6.2 *Inhibice ATM-dependentní dráhy kofeinem v buňkách MOLT-4*

V radioterapii se často využívá nejen efektu samotného záření, ale i kombinace s látkami, které dokáží potencovat cytotoxický efekt IZ. Jednou z cest jak toho dosáhnout, je zablokovat ATM a tím snížit schopnost reparace poškození DNA. Možným způsobem je chemická inhibice kofeinem, kterou jsme použili i v této práci. Pracovali jsme na lidské leukemické T-lymfocytární buněčné linii MOLT-4 mající funkční protein p53 .

Chemickou inhibicí ATM byla potlačena reparace DSB. Kofein je nespecifickým inhibitorem ATM a ovlivňuje ATM-dependentní signalizaci. Po přidání kofeinu a následném ozáření jsme se zabývali změnami proteinu p53. Sledování fosforylace tohoto proteinu po zablokování ATM je vhodné pro určení funkčnosti signální dráhy spouštěné vznikem dvojitých zlomů DNA (DSB), jelikož p53 se vyskytuje na konci této dráhy.

Fosforylace p53 na Ser<sup>15</sup> je považována za hlavní místo posttranslační modifikace spojené s odpovědí na ozáření, která vede k zástavě buněčného cyklu. Proto také po dávce 3 Gy vzniká větší množství p53 fosforylovaného na Ser<sup>15</sup> než po dávce 1 Gy. Kofein tuto fosforylaci po obou dávkách inhiboval. Fosforylace na Ser<sup>392</sup> je významná pro usnadnění funkce p53 jako transkripčního faktoru a množství této formy bylo po ozáření 3 Gy nižší než po ozáření dávkou 1 Gy. Navzdory tomu, že tato fosforylace je řízena kaseinkinasou 2 (CK2), přidání kofeinu tuto fosforylaci opět tlumilo, což naznačuje, že ač tato fosforylace podléhá CK2, není zcela ATM nezávislá.

Po působení kofeinu a následném ozáření jsme též zaznamenali inhibici exprese proteinu p21/WAF1/Cip1, který funguje jako inhibitor cyklin-dependentních kinas a je považován za výkonný článek ATM-p53 signální dráhy. Na druhou stranu, v podobné studii (30 min před ozářením 1,5 Gy byl podán 2 mmol/l kofein) provedené na lidských fibroblastech (Kaufmann et al., 2003) bylo publikováno, že ATM-dependentní fosforylace p53 a transaktivace p21 je po ozáření k efektu kofeinu rezistentní. To podporuje hypotézu, že působení kofeinu je výrazně závislé na typu ovlivňovaných buněk.

Naše výsledky dále prokázaly, že kofein také tlumí štěpení laminu B v prvních 24 h po ozáření. Neznamená to ale, že by byla apoptóza vlivem kofeinu méně indukována. Jak naznačila práce Vávrové et al. (2003), šlo by o zkreslenou interpretaci dat, protože k apoptóze po působení kofeinu nedochází v nižší míře, nýbrž je indukována až ve velmi pozdních

intervalech (3 - 6 dní po ozáření), které nejsou ve většině studií sledovány, a jde o tzv. druhou vlnu apoptózy.

Souhrnně se dá říci, že kofein prokazatelně inhibuje ATM-p53 signální dráhu buněk MOLT-4, což u nich vede ke snížené inhibici cyklin-dependentních kinas a následnému zkrácení G2 bloku, který je potřebný pro efektivní reparaci poškození DNA.

### **6.3 Význam proteinů rodiny Bcl-2 v kontrole apoptózy leukemických buněk**

Mcl-1 je protein rodiny Bcl-2 a působí jako jedna z nejvýše postavených molekul v kontrole apoptózy a podpory buněčného přežití tím, že v časných stádiích indukce apoptózy brání uvolnění cyt-c z mitochondrií (Borner et al., 2003). Mcl-1 je sice funkčně blízkým příbuzným proteinu Bcl-2, ale strukturálně je značně odlišný. Poprvé byl izolován z diferencujících se myeloidních buněk (*myeloid cell line-1*), kde mu byla přisouzena role proteinu napomáhajícího buněčnému přežití. Od té doby se ukázalo, že se vyskytuje v celé řadě tkání a maligních buněk (včetně CLL), kde je jeho exprese signifikantně zvýšena a je spojena s neschopností dosáhnout kompletní remise po cytotoxické terapii, jelikož není indukována apoptóza (Kitada et al., 1998; Saxena et al., 2004). Zajímavé také je, že incidence tumorů je vyšší u transgenních myších nesoucích Mcl-1 v porovnání s těmi, které nesou Bcl-2 a exprese Mcl-1 je obecně zvýšena i u těch tumorů, které se podobají lymfomům (Kitada et al., 1998; Saxena et al., 2004).

Princip antiapoptotické aktivity spočívá ve skutečnosti, že Mcl-1 vytváří heterodimer s proapoptotickým proteinem Bak a udržuje jej tak v inaktivním stavu. Jak prokázal Willis et al. (2005), Bak je aktivován poté, co další BH3-příbuzný proapoptotický protein Noxa indukuje disociaci zmíněného heterodimeru a umožní mu tak působit na integritu mitochondriální membrány. Noxa, kromě toho že uvolňuje Bak, podněcuje také degradaci Mcl-1 v proteasomu (Gélinas & White, 2007). Je nutno dodat, že Noxa ještě spolu s proteinem Puma (ten působí přes protein Bax) spadají do skupiny genů indukovaných proteinem p53; p53 je využívá jako jednu z mnoha cest, kterými reguluje osud buňky (Nakajima & Tanaka, 2007).

Jedním z pozoruhodných rysů Mcl-1 je rychlá regulace jeho hladiny, a proto je také spojován s regulací apoptózy vyvolané rychle se měnícími či náhlými podněty (Craig et al., 2002). Výsledky této práce ukázaly, že Mcl-1 je v leukemických liniích rychle upregulován několik hodin po ozáření nízkými dávkami, a to i u buněk HL-60 - tedy nezávisle na p53. Počáteční nárůst množství Mcl-1 je odpovědí na zářením indukovaný apoptotický stimul a buňky se tím brání spuštění apoptotického programu. Zvýšení Mcl-1 však bylo dočasné

s ohledem na to, že i nižší dávky indukovaly v určité části buněk apoptózu, a proto došlo k jeho přechodnému poklesu. Když se ale buňkám podařilo poškození DNA reparovat, hladina Mcl-1 se opět zvýšila. Je to proto, že Mcl-1 má velice rychlý obrat, v průměru je to méně než 3 h (Yang et al., 1995; Schubert & Duronio, 2001; Balakrishnan et al., 2005). Svou roli zde sehrávají i proteiny transkripční kontroly a proteinová stabilita ovlivňovaná růstovými faktory a tzv. signály přežití (Packham & Stevenson, 2005).

Ačkoliv je rychlý obrat Mcl-1 ve zdravých buňkách typicky zajišťován z valné části degradací v proteasomu, je degradován i jinak. S nástupem apoptózy je Mcl-1 velmi účinně štěpen kaspasami (Clohessy et al., 2004). Kaspasové štěpení inaktivuje jeho antiapoptotickou funkci a zároveň přeměňuje 40 kDa Mcl-1 v 35 kDa proapoptotickou molekulu (!), čímž je aktivována pozitivní zpětná vazba vedoucí ke zvýšené kaspasové aktivaci (Jamil et al., 2005). Proto Mcl-1 funguje jako molekulární výhybka, která je schopná změnit se z „bodyguarda“ na „atentátníka“ pouhým proteolytickým štěpením.

Jeho význam však sahá daleko do funkce imunitního systému a je také důležitý pro správný embryonální vývoj (Michels et al., 2005). Exprese Mcl-1 by mohla být použita jako informativní nástroj při rozhodování o léčbě nejrůznějších forem rakoviny a potlačení funkce Mcl-1 je atraktivní terapeutickou strategií u maligních, zánětlivých i infekčních onemocněních, kde tento protein zastává klíčovou úlohu jako apoptotický supresor. Vzhledem k tomu, že jeho pokles u studovaných leukemických linií byl dávkově závislý, bylo by možné uvažovat i o jeho využití v biodozimetrii.

Druhým ze skupiny proteinů rodiny Bcl-2, kterým jsme se zabývali je proapoptotický protein Bid. Jeho štěpení u buněk HL-60 po dávce 20 Gy jsme zaznamenali již v prvních hodinách po ozáření. Naproti tomu Hosokawa et al. (2005) informovali, že ve stejné buněčné linii byl Bid aktivován pouze při apoptóze indukované  $H_2O_2$ , ale při apoptóze indukované IZ ke štěpení Bid nedochází. Studovali však pouze časové intervaly do 6 h po ozáření. Hosokawův tým používal dávku 4 Gy; v naší práci jsme kromě letální dávky ozařovali také nižší dávkou 6 Gy, a i po této dávce byl Bid štěpen 16 h po ozáření. Je tedy zřejmé, že při oddálené apoptóze, která nastává u buněk HL-60 po ozáření nižšími dávkami, je Bid štěpen ikdyž až v pozdějších časových intervalech. Hosokawa vysvětluje, že radiací indukovaná signalizace je nezávislá na kaspase-8, protože její aktivita (na rozdíl od kaspasy-3 a -9) 6 h po ozáření nebyla zvýšena. Podle nás by toto vysvětlení bylo opodstatněné pouze pokud by byla zkoumána aktivita kaspasy-8 i v dalších časových intervalech, protože podle našich výsledků byla aktivita kaspasy-8 6 h po ozáření sice také nulová, ale prokaspasa-8 byla po dávce 6 Gy štěpena až za 16 h s maximem za 48 h po ozáření.

Také práce Kasahary et al. (2002) ukázala, že v buňkách HL-60 je během apoptózy indukované IZ Bid štěpen na t-Bid. Na druhou stranu Garnett et al. (2007) informovali, že aktivace Bid může časově přecházet aktivaci kaspasy-8 a být tak na ní značně nezávislá, ovšem tyto výsledky byly získány při experimentech na osteosarkomové linii a navíc po indukci apoptózy ligandou TRAIL (vnější cesta indukce) a nikoliv po gama-ozáření.

Výsledky týkající se aktivace Bid, které jsme získali na buněčné linii MOLT-4, také potvrzují, že Bid je po expozici IZ štěpen a 24 h po ozáření dokonce dávkově závislým způsobem. Aktivace Bid je však zřejmě závislá i na typu buněk.

S určitostí víme, že proapoptotické proteiny jsou zapojené do regulace integrity mitochondriální membrány (Borner, 2003). Pravdou je, že zůstává otázka, jakým mechanismem dochází k uvolnění mitochondriálních proteinů. Kim et al. (2000) ukázali *in vitro*, že t-Bid funguje nezávisle na proteinu Bax, i když oba mohou působit synergicky. Navíc se jim podařilo prokázat, že t-Bid disponuje schopností indukovat uvolnění cyt-c, ovšem děje se tak způsobem nezávislým na mitochondriální transmembráně, jelikož t-Bid (přestože byl použit ve vysokých koncentracích) neindukoval bobtnání mitochondrií (*swelling*) ani zvýšení permeability jejich membrány. Přesný mechanismus není dodnes znám, ale je pravděpodobné, že další mitochondriální faktory či další proapoptotické proteiny se podílejí na vzniku transportního póru, který však není specifický jen pro cyt-c, protože i mnohem větší molekuly mohou být uvolněny (Kim et al., 2000).

V naší práci jsme izolovali mitochondriální frakci ozářených buněk a zkoumali jsme, zda a kdy je cyt-c uvolněn z mitochondrií do cytoplazmy. Čas izolace jsme zvolili podle štěpení Bid a pozorovali jsme pokles cyt-c v mitochondriích. Zajímavé bylo, že 4 h po ozáření buněk HL-60 dávkou 10 Gy (t-Bid byl přítomen již od 1 h po ozáření dávkou 20 Gy) nedošlo k uvolnění cyt-c. To jsme pozorovali v daném časovém intervalu až po dávce 20 nebo 50 Gy. Uvedené výsledky naznačují, že k uvolnění cyt-c z mitochondrií pouhá přítomnost aktivního proapoptotického t-Bid nestačí. Musí být buď překročeno určité prahové množství (které může vzniknout po ozáření vyšší dávkou), nebo se zapojují ještě další molekuly, jak navrhuje Kim et al. (2000).

Nebylo překvapením, že i u buněk MOLT-4 dochází k uvolnění cyt-c do cytoplazmy, ale jeho pokles v mitochondriích koreloval s dávkou. Proto může být tento protein doporučen jako potenciální biologický indikátor obdržené dávky IZ pro biodozimetrické účely.

Po expozici apoptotickému stimulu je cyt-c uvolněn z mitochondrie a může se spojit s prokaspasou-9 (47 kDa) pouze pokud jsou přítomny další faktory (Apaf-1, ATP aj.). Prokaspasa-9 je pak štěpena na velkou (35 nebo 17 kDa) a malou (10 kDa) aktivní

podjednotku na principu autoproteolýzy na Asp<sup>315</sup> (Liu et al., 1996; Li et al., 1997; Zou et al., 1999).

Ještě před několika lety nebylo jasné, jakým mechanismem dochází k aktivaci iniciačních kaspas. Proti sobě stály dvě hypotézy. Jedna byla založena na principu allosterické modulace a druhá využívala teorii dimeru a tzv. indukované proximity na povrchu komplexu zvaného apoptosom. Muzio et al. (1998) navrhli model indukované proximity pro kaspasu-8 a dnes již řada studií (Chao et al., 2005; Pop et al., 2006) přinesla důkazy podporující tuto dimerovou hypotézu. Aktivní kaspasa-9 pak štěpí další cystein-aspartátové proteasy jako jsou kaspasa-3 a kaspasa-7, čímž je spuštěna kaspasová kaskáda vedoucí k řízenému kolapsu buňky. Kromě autoproteolytického štěpení může být v rámci zpětné vazby prokaspasa-9 štěpena *in vivo* kaspasou-3 na Asp<sup>330</sup> (Slee et al., 1999).

My jsme pozorovali u buněk HL-60 pokles prokaspasy-9 48 h po ozáření dávkou 6 Gy, tedy se zpožděním 24 h vůči kaspase-8. To je opět v rozporu s výsledky Hosokawa et al. (2005), kteří stanovili u buněk HL-60 kaspasu-9 aktivní již 4 h po dávce 4 Gy. Zdá se však, že kaspasa-9 nebude pro indukci apoptotické kaskády tak významná, protože Marsden et al. (2004) ve své práci na myších hematopoetických buňkách (kaspasa-2 a -9 negativních) prokázali, že cyt-c může být uvolněn do cytoplazmy nezávisle na kaspase-2 a -9. Navíc Ho et al. (2004) přinesli důkaz, že určité dosud nespecifikované apoptotické kaskády mohou obejít apoptosom a aktivovat kaspasu-9 nezávisle na mitochondriích a Apaf-1. Apoptosomová cesta je tudíž jen jednou z několika možností její aktivace.

U buněk HL-60 předcházela aktivace kaspasy-8 poklesu množství prokaspasy-9. Naproti tomu u buněk MOLT-4 proběhla konverze obou prokaspas-8 a -9 na aktivní podjednotky po všech testovaných dávkách simultánně. V obou liniích dochází zřejmě k aktivaci kaspasy-9 za odlišných podmínek, které jsou dány ne/přítomností p53. Pokud se v buňce protein p53 nenachází, neznamená to, že by cyt-c nebyl uvolněn do cytoplazmy, ale aktivita p53 (a přítomnost dalších proteinů například z rodiny Bcl-2, které transkripčně reguluje) toto uvolnění pravděpodobně podněcuje a napomáhá časnější aktivaci kaspasy-9, což je také zřejmě jeden z několika faktorů přispívajících ke snížené radiorezistenci buněk MOLT-4.

Nakano et al. (2001) označili apoptózu v ozářených buňkách MOLT-4 za zcela závislou na p53. Kuwabara et al. (2003) však žádný důkaz o nepostradatelnosti p53 v apoptóze ozářených buněk MOLT-4 nenašli. Naopak poukázali na význam aktivace SAPK/JNK cesty, která indukuje expresi receptoru smrti Fas. Hara et al. (2004) pak v práci provedené na lidských gliomových buňkách přinesli důkaz o tom, že při ztrátě p53 může apoptózu

indukovat ceramid vzniklý stěpením kyselou sfingomyelinasou. Navíc p53 je pak eliminován ceramidovou signalizací (upregulace ceramidasy a inhibice kyselé sfingomyelinasy).

Je víc než pravděpodobné, že existuje několik cest, které jsou schopné nezávisle regulovat apoptózu a některé fungují jaké záložní mechanismy. V případě, že hlavní cesta nemůže být spuštěna, aktivují se další mechanismy, které jsou jinak v klidovém stavu.

#### **6.4 Indukce apoptózy v leukemických buňkách**

Smyslem našich experimentů na linii HL-60 bylo poukázat na dva odlišné způsoby indukce buněčné smrti. Jedná se o tzv. premitotickou a postmitotickou apoptózu. Vzájemně se liší časem, ve kterém se tato forma buněčné smrti objevuje a dále specifickým průběhem buněčného cyklu. Dávky 20 Gy a vyšší vedly k rychlé fragmentaci DNA, která se objevovala již 6 h po ozáření. Co se týče buněčného cyklu, ukázalo se, že buňky byly asynchronní a vstupují do apoptózy z té fáze cyklu, v níž byly ozářeny, před první mitózou (Vávrová et al., 2001). Tento typ smrti je klasifikován jako interfázová neboli premitotická apoptóza.

V kontrastu se zmíněným typem apoptózy je smrt buněk navozená po ozáření dávkami do 10 Gy. Ta byla spojená s fragmentací DNA, která byla patrná až po vstupu buněk do buněčného cyklu. Za 16 - 24 h po ozáření se buňky synchronizovaly v G2-fázi. Maximální indukce apoptózy byla pozorována až za 48 h po ozáření a následovala po bloku v G2-fázi. Tento fenomén bývá klasifikován jako reprodukční smrt či postmitotická apoptóza, neboť nové buňky hynou paralelně s buněčným růstem. Podobné chování popsali Shinomiya et al. (2000) na linii lidských monoblastických buněk U937.

Pro detekci apoptózy buněk HL-60 byly využity tyto metody: morfologické stanovení barvených preparátů (Diff-Quick), průtokově-cytometrické stanovení obsahu sub-G1 frakce DNA a mitochondriálního membránového proteinu protilátkou APO2.7, a Western-blotová detekce laminu B. Srovnáním uvedených metod 6 h po ozáření vysokými dávkami docházíme k poměrně dobré shodě. Po dávce 10 Gy jsme pozorovali jen malé procento apoptózy (morfologicky 11 %, sub-G1-buňky 12 % a APO2.7-pozitivita 6 %). Dávka 20 Gy indukovala apoptózu výrazně (morfologicky 49 %, sub-G1- buňky 32 % a APO2.7-pozitivita 33 %). Doplňkovou metodou byla Western-blotová detekce laminu B, při níž byl detekován 48 kDa fragment za 6 a 4 h po ozáření dávkou 20 a 50 Gy. Po dávce 6 Gy byl fragmentovaný lamin B detekován 24 h po ozáření. Jeho množství pak dosáhlo maxima za 48 h a následně (72 h) pokleslo tak, že za 144 h od ozáření již apoptóza touto metodou nebyla prokázána.

Výsledky této analýzy potvrzují, že k indukci apoptózy dochází u buněk HL-60 po dávkách do 10 Gy až poté, co se buňky synchronizují v G2-fázi, kde reparují vzniklé

poškození. Na druhou stranu dávky vyšší než 10 Gy indukují rychlý nástup apoptózy bez vstupu do G2-bloku. Navíc štěpení laminu B časově dobře koreluje s poklesem a následným nárůstem hladiny antiapoptotického proteinu Mcl-1, což odráží fakt, že dávka 6 Gy sice působí apoptózu ve značném množství buněk, ale za 144 h v kultuře přežívají pouze živé neapoptotické buňky.

Zatímco buňky HL-60 jsou poměrně nediferencované, buňky MOLT-4 jsou odvozeny od lidské T-buněčné leukémie a jsou vhodným modelem pro studium molekulárních mechanismů zářením indukované apoptózy u T-lymfocytů. Práce na p53<sup>-/-</sup> myších (Clarke et al., 1993) ukázala, že protein p53 je důležitý pro indukci apoptózy jakožto odpovědi na poškození DNA. Naše výsledky spolu s publikacemi dalších autorů (Nakano & Shinokara, 1999; Nakano et al., 2001) dokazují, že akumulace p53 u buněk MOLT-4 předchází typickým apoptotickým změnám jako jsou fragmentace DNA (sub-G1 pík), změny mitochondriální membrány (APO2.7) a fosfolipidů plazmatické membrány (annexin V) a štěpení jaderných strukturálních proteinů (lamin B).

Srovnáme-li množství apoptotických buněk MOLT-4 v procentech stanovená třemi průtokově-cytometrickými metodami 24 h po ozáření dávkami 1,5; 3 a 7,5 Gy, zjistíme, že určení množství annexin V-pozitivních a APO2.7-pozitivních buněk poskytuje přibližně stejné výsledky (24 h po ozáření byla plazmatická membrána většiny buněk permeabilní). Třetí metoda (hodnocení sub-G1 buněk) poskytuje mnohem rozdílnější data. Po dávkách 3 a 7,5 Gy jsme stanovili přibližně stejnou frakci časně apoptotických buněk (15 % a 18 %). Zdá se, že buňky MOLT-4 rychle tvoří apoptotická tělíska, rozpadají se a průtokový cytometer pak hodnotí výsledné fragmenty jako tzv. *debris* neboli odpad.

Za 24 h byly skoro všechny buňky ozářené dávkou 7,5 Gy APO2.7-pozitivní (bez permeabilizace), jejich plazmatická membrána byla permeabilní a byly apoptotické. Endlich et al. (2000) informoval ve své práci na buňkách MOLT-4, že pouze 24 % přešlo do apoptózy bez pokusu o buněčné dělení po dávce 4 Gy. Většina buněk umírá až po aberantním dělení 18 až 30 h po ozáření. Proces končí vznikem apoptotických tělísek a ke kolapsu buněk dochází za 36 až 60 h po ozáření (Endlich et al., 2000).

Doplňkovou metodou byla Western-blotová detekce laminu B, při níž byl detekován 48 kDa fragment za 16 h po ozáření cytostatickou dávkou 1,5 Gy. Letální a supraletální ozáření indukovalo štěpení laminu B dokonce již za 6 h po ozáření a můžeme říci, že množství vznikajícího fragmentu je závislé na použité dávce. Výsledky této časové analýzy dobře korelují s poklesem hladiny antiapoptotického proteinu Mcl-1.

ObyčnĚ lze říci, že indukce apoptózy u bunĚk MOLT-4 (p53-wt) po expozici dávkám do 10 Gy je rychlejší než u bunĚk HL-60 (p53-negativní). Buňky MOLT-4 vykazují znaĤnou nesourodost v Ĥase indukce apoptózy po expozici IZ a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Výsledky práce Vávrové et al. (2004) ukázaly, že u buňky HL-60 se po dávce 5 Gy akumulují zejména v G2-fázi. Na rozdíl od bunĚk MOLT-4, přítomnost v G2-bloku má výrazný vliv na jejich radiorezistenci a do apoptózy vstupují s maximem za 48 až 72 h po ozáření.



## 7 SOUHRN HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ

- U buněk MOLT-4 jsme prokázali indukci ATM/Chk-2/p53 signální dráhy, která je aktivována časně po ozáření. Navzdory funkční ATM jsme však u těchto buněk prokázali, že zde nedochází k fosforylaci Nbs1, důležitého komponentu reparačního komplexu MRN. V důsledku snížené aktivace proteinů MRN nedochází k dostatečné reparaci zářením indukovaného poškození DNA, což pokládáme za jeden z důvodů zvýšené radiosenzitivity těchto buněk.
- U této linie se nám podařilo prokázat dávkově závislý vzestup fosforylace histonu H2A.X na Ser<sup>139</sup>. Dále jsme prokázali fosforylaci proteinu p53 na Ser<sup>15</sup>, což dosud u buněk MOLT-4 nebylo pozorováno. Tento protein (resp. danou formu) jsme proto navrhli jako potenciální marker využitelný v biodozimetrii pro zpětný odečet obdržené dávky IZ.
- Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po ozáření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Prokázali jsme aktivaci obou iniciačních kaspas-8 a -9 po působení IZ, která probíhá simultánně.
- Naproti tomu buňky HL-60 podléhají po nízkých dávkách tzv. oddálené apoptóze, které předchází akumulace buněk v G2 bloku nutná pro opravu poškozené DNA. Druhou možností je rychlá apoptóza, která je navozena supra/letálními dávkami několik hodin po ozáření. V p53-negativních buňkách HL-60 dochází nejprve k aktivaci kaspasy-8 a později k aktivaci kaspasy-9. To naznačuje, že při radiací indukované apoptóze zastává důležitější roli kaspasa-8, která pomáhá zprostředkovat přenos apoptotického signálu v p53-negativních podmínkách.
- V obou liniích po subletální nikoli letální dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 narůstá a s nástupem apoptózy klesá. IZ také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid a uvolnění cyt-c.
- Prokázali jsme radiosenzibilizující efekt kofeinu na buňky MOLT-4. Inhibice ATM/Chk-2/p53 signální dráhy vede přes sníženou aktivaci proteinu p21 ke zrušení G2 bloku a zářením indukované poškození DNA pak nemůže být efektivně opraveno. Látky snižující schopnost nádorových buněk reparovat radiační poškození jsou potenciálně významné v kombinované terapii nádorových onemocnění.

## 8 ZÁVĚR

V této práci jsme se věnovali studiu molekulárních mechanismů aktivovaných ionizujícím zářením (IZ) v lidských nádorových buňkách. Hlavními metodickými přístupy byla SDS-elektroforéza s imunodetekcí a průtoková cytometrie. Experimenty byly provedeny na T-lymfocytární leukemické linii MOLT-4, která exprimuje protein p53 (p53-wt) a na promyelocytární leukemické linii HL-60, která je p53-negativní. Při testování klonogenity MOLT-4 byla určena hodnota  $D_0$  jako 0,87 Gy (dávka snižující počet přežívajících buněk na 37 %) a tyto buňky jsou relativně radiosenzitivní ve srovnání s buňkami HL-60, jejichž  $D_0$  je 2,2 Gy (Vávrová et al., 2004).

IZ způsobuje dvojitě zlomy DNA (DSB) a primární molekulou odpovídající na vznik DSB a regulující reparaci poškozené DNA je ATM-kinasa (ATM). Zabývali jsme se mechanismy spojenými s aktivací (fosforylací) ATM a jejich substrátů checkpoint kinasy-2 (Chk-2), histonu H2A.X, proteinu p53 a jeho negativního regulátoru Mdm2 a dále proteiny DNA reparačního komplexu Mre11/Rad50/Nbs1.

Naše práce ukázala, že v buňkách MOLT-4 byla velmi časně po ozáření aktivována ATM na Ser<sup>1981</sup> a také Chk-2 na Thr<sup>68</sup>. Krátce po jejich aktivaci byl indukován p53, který byl fosforylován na Ser<sup>392</sup>, což usnadňuje jeho vazbu na DNA a podporuje transkripční aktivitu, a dále na Ser<sup>15</sup>, což tlumí interakci s Mdm2. IZ také indukovalo autoregulatorní zpětnou vazbu v podobě aktivace onkoproteinu Mdm2 (Ser<sup>166</sup>), který byl fosforylován v době maximální fosforylace p53.

Velmi časný krok v odpovědi na poškození DNA je fosforylace H2A.X, který byl 1 h po ozáření detekován především imunocytochemicky pomocí konfokální mikroskopie v místě DSB, kde byl kolokalizován s proteinem 53BP1. V ozářených buňkách však nebyla 1 h po expozici detekována fosforylovaná forma Nbs1 a množství nefosforylovaných reparačních proteinů Nbs1, Mre11 i Rad50 se po letálních dávkách snížilo. Navzdory funkční ATM není tedy reparace radiačního poškození DNA u buněk MOLT-4 dostatečná, což může být jeden z důvodů zvýšené radiosenzitivity těchto buněk.

Pokud poškození DNA dosáhne takové míry, že je nereparovatelné, je spuštěna programovaná buněčná smrt. U studovaných linií je patrný odlišný způsob indukce apoptózy. Apoptóza má u buněk HL-60 po ozáření dávkami nad 10 Gy rychlý nástup a je prokazatelná za 6 h. Po nižších dávkách (do 10 Gy) přechází buňky do G2 bloku a pokouší se reparovat vzniklé poškození. Apoptóza je pak navozena s maximem za 48 až 72 h po ozáření. Buňky

MOLT-4 se akumulují v S- a částečně v G2-fázi a hynou převážně mitotickou apoptózou v rozmezí 12 až 24 h po ozáření.

Apoptotický proces je kontrolován zejména proteiny rodiny Bcl-2. Naše výsledky ukázaly, že v obou liniích po subletální nikoli letální dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 narůstá a s nástupem apoptózy klesá. IZ také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid. Následně byly aktivovány obě iniciační kaspasy-8 a -9 a tedy i obě cesty indukce apoptózy (receptorová a mitochondriální). Tuto aktivaci jsme pozorovali v obou liniích a můžeme tedy říci, že byla nezávislá na přítomnosti p53 v buňkách. Zajímavým zjištěním však bylo, že v p53-negativních buňkách dochází k nejprve k aktivaci kaspasy-8 a později k aktivaci kaspasy-9, kdežto v p53-pozitivních buňkách jsou obě kaspasy aktivovány simultánně. To naznačuje, že při radiaci indukované apoptóze zastává důležitější roli kaspasa-8, která pomáhá zprostředkovat přenos apoptotického signálu v p53-negativních podmínkách.

Kromě objasnění některých molekulárních mechanismů aktivovaných po ozáření bylo důležitým výstupem naší práce zhodnocení chování proteinů účastnících se této signalizace v kontextu obdržené dávky. Množství fosforylované ATM se po ozáření ve srovnání s neozářenými buňkami zvyšuje, ale stejně jako fosforylace Chk-2 nejeví žádnou dávkově závislou odpověď. Fosforylace H2A.X a kolokalizace s 53BP1 vykazuje dávkovou závislost především do 3 Gy. Fosforylace Mdm2 se sice po nižších dávkách (do 2 Gy) zvyšuje, ale vyšší dávky pak působí úbytek fosforylované formy. Podařilo se nám ovšem prokázat, že protein p53 (forma fosforylovaná na Ser<sup>15</sup>) reaguje na ozáření dávkově závislým vzestupem (v čase 2 h) a proteiny Mcl-1 a cyt-c reagují na ozáření dávkově závislým poklesem (za 16 a 12 h). Zejména protein p53, u kterého byla ověřena dávkově závislá odpověď též metodou ELISA, je tedy možné doporučit jako potenciální molekulární indikátor využitelný v biologické dozimetrii pro zpětné určení obdržené dávky IZ.

Dále byl na ozařovaných buňkách MOLT-4 studován vliv preinkubace s kofeinem (2 mmol/l). Prokázali jsme inhibiční efekt kofeinu na ATM-p53 signální dráhu. Obě fosforylace jak na Ser<sup>15</sup>, tak na Ser<sup>392</sup> byly výrazně inhibovány. Díky tomu nedošlo prostřednictvím p53 k aktivaci proteinu p21. Ten funguje jako inhibitor cyklin-dependentních kinas a při jeho snížené expresi dochází ke zrušení G2 bloku, který je nutný pro efektivní reparaci radiačního poškození DNA. Kofein použitý v koncentraci, při které není pro buňky toxický, zvyšuje cytotoxické účinky IZ a je potenciální látkou využitelnou při kombinované léčbě nádorových onemocnění.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams JA, Corry S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322–6.
- Amstad PA, Liu H, Ichimiya M, Berezsky IK, Trump BF, Buhimschi IA, Gutierrez PL. BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep.* 2001;6:351-62.
- Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishbashi Y, Ohta S and Morikawa K. Crystal structure of rat Bcl-xL: implications for the functions of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem* 1997;272:27886–92.
- Bakkenist C, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499–506.
- Balakrishnan K, Stellrecht CM, Genini D, Ayres M, Wierda WG, Keating MJ, Leoni LM, Gandhi V. Cell death of bioenergetically compromised and transcriptionally challenged CLL lymphocytes by chlorinated ATP. *Blood.* 2005;105:4455-62.
- Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekeley L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* 1995;23:362-9.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998;281:1674-7.
- Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 2001;411:969-74.
- Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:8173-8.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 2006;173:195-206.
- Belka C, Budach W. Antiapoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 2002;78:643-58.
- Blakely, W.F. Nucleic acid molecular biomarkers for diagnostic biodosimetry applications: Use of the fluorogenic 5-nuclease polymerase chain reaction assay. *Military medicine* 2002;167 (Suppl 1):16-18.
- Boise LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. Bcl-x, Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
- Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immun* 2003;39:615-47.
- Boyd SD, Tsai KY, Jacks T. An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* 2000;2:563-8.
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 2003;160:1115-27.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7:249-57. Review.

- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998;281:1677–9.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002;296:922-7.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849–52.
- Claudio PP, Cui J, Ghafouri M, Mariano C, White MK, Safak M, Sheffield JB, Giordano A, Khalili K, Amini S, Sawaya BE. Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII. *J Cell Physiol* 2006;208:602–12.
- Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002;16:444-54. Review.
- Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2003;22:5813-27.
- Clohessy JG, Zhuang J, Brady HJ. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol.* 2004;125:655-65.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Monestessuit S, Lauper S. Phosphorylation of Bid by casein kinase I and II regulates its cleavage by caspase-8. *Mol Cell* 1999;8:601–11.
- Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1207-17.
- Dostál, M. Vojenská radiobiologie. Učební texty VLA JEP Hradec Králové. 1. vyd. Hradec Králové 1975;562 s.
- Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC. Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat Res* 2000;113:36–48.
- Esposti MD. Sequence and functional similarities between proapoptotic Bid and plant lipid transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:331–40.
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001;410:842-7.
- Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 2002;30:290-4.
- Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 2005;434:605-11.
- Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:45–9.
- Fridman JS, Parsels J, Rehemtulla A, Maybaum J. Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-XS. *J Biol Chem* 2001;276:4205–10.
- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3319-23.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* 2007;12:1299-315.

- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 2000;25:115-9.
- Gélinas C and White E. BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev* 2007;19:1263-8.
- Ghosal G, Muniyappa K. The Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 Complex Reveals that Rad50 Negatively Regulates Mre11 Endonucleolytic but not the Exonucleolytic Activity. *J Mol Biol* 2007;372:864-82.
- Greenberg JM, Gonzalez-Sarmiento R, Artur DC. Immunophenotypic and cytogenetic analysis of MOLT-3 and MOLT-4: human cell lines with rearrangement of chromosome 7. *Blood* 1988;72:1755-60.
- Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 2000;16:259-64.
- Hara S, Nakashima S, Kiyono T, Sawada M, Yoshimura S, Iwama T, Banno Y, Shinoda J, Sakai N. p53-Independent ceramide formation in human glioma cells during gamma-radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;11:853-61.
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* 2005;280:1186-92.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*. 2000;287:1824-7.
- Ho AT, Zacksenhaus E. Splitting the apoptosome. *Cell Cycle* 2004;3: 446-8.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997;420:25-7.
- Hosokawa Y, Sakakura Y, Tanaka L, Okumura K, Yajima T, Kaneko M. Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukemia HL60 cells. *J Radiat Res* 2005;46:293-303.
- Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 1997;272:13829-34.
- Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998;273:10777-83.
- Chao Y, Shiozaki EN, Srinivasula SM, Rigotti DJ, Fairman R, Shi Y. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol* 2005;3:e183.
- 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 USA* 1999;96:13777-82.
- Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006;5:1313-9.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265:346-55.
- Chryanowska KH, Piekutowska-Abramcyuk D, Popowska E, Gladkowska-Dura M, Maldyk J., Szczyewska M, Krajewska-Walasek M, Gorzłuk-Koyakiewicz B, Bubata H. Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. *Int.J.Cancer* 2006; 118: 1269-74.

- Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merry A, Chen S. Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-xL. *J Biol Chem* 1998;273:8705–10.
- Jacquet P, de Saint-Georges L, Barrio S, Baugnet-Mahieu L. Morphological effects of caffeine, okadaic acid and genistein in one-cell mouse embryos blocked in G2 by X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1995;67:347-58.
- Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V. A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 2005;387:659-67.
- Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res.* 1998;150:80-91. Review.
- Kaneko YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M. Cell-cycle-dependent and ATM-in dependent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* 1999;18:3673–81.
- Kasahara T, Koguchi E, Funakoshi M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y. Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:491-9.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-11.
- Kaufmann WK, Heffernan TP, Beaulieu LM, Doherty S, Frank AR, Zhou Y, Bryant MF, Zhou T, Luche DD, Nikolaishvili-Feinberg N, Simpson DA, Cordeiro-Stone M. Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat Res* 2003;532:85-102.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. Related Articles, Links ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 2001;8:1052-65. Review.
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14973-7.
- Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 2000;275:39474-81.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998;91:3379-89.
- Knížek J, Österreicher J, Macela A. Pravděpodobnost v t-testu. *Voj zdrav listy* 2000;69:306-12.
- Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054-72.
- Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879–86.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993;6:327-32.
- Kutuk O, Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 2006;11:1661-75.
- Kuwabara M, Takahashi K, Inanami O. Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells. *J Radiat Res (Tokyo)* 2003;44:203-9.
- Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999;18:7644–55. Review.

- Lavin MF, Khanna KK, Beamish H, Spring K, Watters D, Shiloh Y. Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 1995;20:382-3.
- Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 1997;15:177-202.
- Lavin MF. The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1515-20.
- Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 2005;308:551-4.
- Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 2000;404:201-4.
- Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995;81:1013-20.
- Lettaï A, Bassik M, Walensky L, Sorcinelli M, Weiler S, Korsmeyer S. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183-92.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
- Liang H, Fesik SW. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J Mol Biol* 1997;274:291-302. Review.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
- Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2000;2:208-25.
- Löbrich M, Jeggo PA. The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* 2005;76:112-8. Review.
- Locksley RM, Killeen M, Lenardo MJ. The TNF and TNF superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, Sehested M, Lukas J, Bartek J. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 2001;61:4990-3.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:997-1007. Review.
- Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2000;2:754-61.
- Ma Y, Lu H, Schwarz K, Lieber MR. Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle* 2005;4:1193-200.
- Marsden VS, Ekert PG, Van Delft M, Vaux DL, Adams JM, Strasser A. Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* 2004;165:775-80.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10389-94.



- Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: Role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 2001;15:1067-77.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signalling complex (DISC). *EMBO J* 1997;16:2794-804.
- Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 2003;13:49-58. Review.
- Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:267-71.
- Miller DK, Myerson J, Becker JW. The interleukin-1 beta converting enzyme family of cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997;64:2-10. Review.
- Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:945-52.
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:575-90.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*. 1998;273:2926-30.
- Nakajima W, Tanaka N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch* 2007;74:148-57.
- Nakano H, Shinohara K. Correlation between unirradiated cell TP53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 cells. *Radiat Res* 1999;151:686-93.
- Nakano H, Kohara M, Shinohara K. Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 2001;306:101-6.
- Nechushtan A, Smith CL, Hsu Y-T, Youle RJ. Confirmation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999;18:2330-41.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74: 609-19.
- Österreicher J, Vávrová J. *Přednášky z radiobiologie*. 1. vyd. Praha: Manus, 2003:6,29-30.
- Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2005;114:441-9. Review.
- Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou T, Koehler C, Kroemer G. Mass spectrophotometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* 2000;7:137-44.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, Fesik SW. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3012-7.
- Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004;8:432-44.
- Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 2003;81:123-9.
- Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell biology*. 1. vyd. Philadelphia: Sander, Elsevier Science, 2002:688-9.
- Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 2006;22:269-75.

- Prasanna PG, Hamel CJ, Escalada ND, Duffy KL, Blakely WF. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Mil Med* 2002;167(2 Suppl):10-2.
- Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with dynein motor complex. *Mol Cell* 1999;3:287-96.
- Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol.* 1998a;25:11-8. Review.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998b;17:3225-36.
- Reliene R, Bishop AJ, Schiestl RH. Involvement of homologous recombination in carcinogenesis. *Adv Genet* 2007;58:67-87.
- Resnick IB, Kondratenko I, Pashanov E, Maschan AA, Karachunsky A, Togoiev O, Timakov A, Polyakov A, Tverskaya S, Evgrafov O, Roumiantsev AG. 657del5 mutation in gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls. *Am J Medical Gen* 2003; 120A: 174-9.
- Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 1999;9:699-702.
- Robertson JD, Enoksson M, Suomella M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:29803-9.
- Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-84.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., Bonner, W. M.: DNA double-stranded breaks induce histone H2A.X phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-69.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905-16.
- Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 1998;17:554-64.
- Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, Galloway DA, Plon SE, Groudine M. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res* 1995;55:1639-42.
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 1997;36:10117-24.
- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 1999;59:4375-82.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-x1-Bak peptide complex: recognition between regulators and apoptosis. *Science* 1997;275:983-6.
- Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2004;75:22-33.

- Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:44-55.
- Shi Z. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-70.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997;91:325-34.
- Shinomiya N, Kuno Y, Yamamoto F, Fukasawa M, Okumura A, Uefuji M, Rokutanda M. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:767-77.
- Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC. Ion channel activity of the BH3-only Bcl-2 family member, Bid. *J Biol Chem* 1999;274:21932-6.
- Schubert KM, Duronio V. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem J* 2001;356:473-80.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000;151:1381-90.
- Schwartz GK. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle* 2002;1:122-3. Review.
- Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 1998;423:275-80.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-92.
- Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 1995;13:916-34. Review.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 2004;64:2390-6.
- Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not procaspases is the most likely route. *J Biol Chem* 2001;276:3149-57.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998;17:931-9.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K. Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* 1999;18:1239-44.
- Szkanderova S, Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Pavlova S, Smardova J, Stulik J. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol* 2003;49:191-6.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D'Andrea AD. Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002;109:459-72.
- Taylor AM. Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat Res* 1978;50:407-18.

- Tempel K, von Zallinger C. Caffeine-DNA interactions: biochemical investigations comprising DNA-repair enzymes and nucleic acid synthesis. *Z Naturforsch.* 1997;52:466-74.
- Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. *DNA Repair* 2003;2:655-72.
- Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17907-11.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6. Review.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 1999;13:152-7.
- Tichý A, Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Pejchal J, Vilasová Z, Cerman J, Österreicher J. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochim Pol* 2007;54:281-7.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 2003;22:5612-21.
- Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002;9:20-6.
- Vannier JB, Depeiges A, White C, Gallego ME. Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *EMBO J* 2006;25:4577-85.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cersaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93:467-76.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.
- Vávrová J, Mareková M, Vokurková D. Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplazma* 2001;48:26-33.
- Vávrová J, Mareková-Rezáčová 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;42:193-9.
- Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Psutka J. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res* 2004;53:335-42.
- Vilasová Z, Řezáčová M, Vávrová J, Tichý A, Vokurková D, Zoelzer F, Řeháková Z, Österreicher J, Lukášová E. Molecular mechanisms of response of human peripheral blood mononuclear cells to ionizing radiation. *Acta Biochim Pol* 2008 (zasláno k tisku).
- Vindel L. Low microfluorometric analysis of DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977;24:227-42.

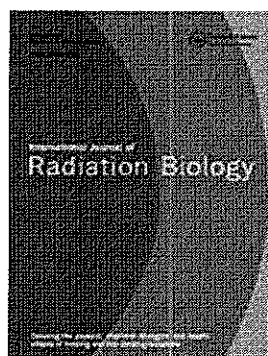
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science* 1999;284:339-43.
- Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeyer P. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* 1994;14:5182-91.
- Wang Q, Fan S, Eastman A, Worland PJ, Sausville EA, O'Connor PM. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:956-65.
- Wang XQ, Stanbridge EJ, Lao X, Cai Q, Fan ST, Redpath JL. p53-dependent Chk1 phosphorylation is required for maintenance of prolonged G2 Arrest. *Radiat Res* 2007;168:706-15.
- Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J. p53 Binding protein 53BP1 required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 2003 ;23:2556-63.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. T-Bid, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes Bak to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000;14:2060-71.
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005;19:1294-305.
- Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Zhang H. Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006;8:1935-43.
- Xu B, Kim ST and Kastan MB. Involvement of Brcal in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001;21:3445-50.
- Xu B, O'Donnell AM, Kim ST and Kastan MB. Phosphorylation of serine 1387 in Brcal is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 2002;62:4588-91.
- Yang T, Kozopas KM, Craig RW. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 1995;128: 1173-84.
- Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 2002;16:571-82.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999;400:886-91.
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* 1998;273:3799-802.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67-71.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-xL. *Cell* 1996;87:619-28.
- Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. Posttranslational N-myristoylation of Bid as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 2000;290:1761-5.

- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14795-800.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999;274:11549-56.

## 10 PŘÍLOHY

### *10.1 Příloha 1 (Tichý et al., 2008)*

Tichý A, Zášková D, Pejchal J, Řezáčová M, Österreicher J, Vávrová J, Cerman J. Gamma irradiation of human leukaemic cells HL-60 and MOLT-4 induces decrease in Mcl-1 and Bid, release of cytochrome c, and activation of caspase-8 and caspase-9. *International Journal of Radiation Biology* 2008; přijato k tisku.



**Gamma irradiation of human leukaemic cells HL-60 and MOLT-4 induces decrease in Mcl-1 and Bid, release of cytochrome c, and activation of caspase-8 and caspase-9.**

Journal:	<i>International Journal of Radiation Biology</i>
Manuscript ID:	TRAB-2007-IJRB-0185.R2
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	25-Feb-2008
Complete List of Authors:	Tichy, Ales; University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Radiobiology; Charles University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Zaskodova, Darina; Charles University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Pejchal, Jaroslav; University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Centrum of Advanced Studies Rezacova, Martina; Charles University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry Osterreicher, J.; University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Radiobiology Vavrova, J; University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Radiobiology Cerman, Jaroslav; Charles University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry
Keywords:	Mcl-1, Ionising radiation, Leukaemias, Bid, Caspases, Cytochrome c





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **Gamma irradiation of human leukaemic cells HL-60 and MOLT-4 induces decrease in Mcl-1 and Bid, release of cytochrome c, and activation of caspase-8 and caspase-9.**

**Authors:** Aleš Tichý<sup>1,2</sup>, Darina Zášková<sup>2</sup>, Jaroslav Pejchal<sup>1</sup>, Martina Řezáčová<sup>2</sup>, Jan Österreicher<sup>1</sup>, Jiřina Vávrová<sup>1</sup> & Jaroslav Cerman<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>*Department of Radiobiology, Faculty of Health Sciences in Hradec Králové, University of Defence Brno, Czech Republic.*

<sup>2</sup>*Institute of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University Prague, Czech Republic.*

**Correspondence:** Aleš Tichý (Address: Faculty of Health Sciences, University of Defence,

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic)

Phone: +420 973 253 216

Fax : +420 973 253 000

e-mail: [tichy@pmfhk.cz](mailto:tichy@pmfhk.cz)

**Key words:** Mcl-1, Bid, cytochrome c, caspases, ionising radiation, leukaemias.

**Running title:** IR-induced changes of Bcl-2 proteins, cyt-c and caspases

**Abbreviations:** IR, ionising radiation; cyt-c, cytochrome c; Mcl-1, Myeloid cell line-1; t-Bid, truncated Bid; wt, wild type.

**Acknowledgement:** This work was supported by Ministry of Education, Czech Republic (project MSM 0021620820) and by Ministry of Defence, Czech Republic (projects OBUKHK2005001).

**ABSTRACT**

**Purpose:** Apoptosis is significantly controlled by proteins of Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) family promoting cell death or maintaining cell survival. We selected two representatives of Bcl-2 family (anti-apoptotic Mcl-1 - myeloid cell line-1 and pro-apoptotic Bid - Bcl-2 homology domain 3 interacting death agonist), cytochrome c (cyt-c), and two initial caspases (-8 and -9) to evaluate their function in ionising radiation (IR)-induced apoptosis in human leukaemic cell lines diverging in p53 (TP53 tumor suppressor gene) status.

Deleted: H

Deleted: domain

**Materials and methods:** 30µg of proteins of whole-cell lysates or 10 µg of mitochondrial protein fractions were electrophoretically separated and analyzed by Western-blotting.

**Results:** Here we show that in both HL-60 (p53 null) and MOLT-4 (p53 wild type) leukaemic cells the amount of Mcl-1 initially increased after irradiation by sublethal but not by lethal dose and later (when apoptosis occurred) it decreased in a dose-dependent manner. Caspase-8 was cleaved and afterwards the amount of Bid decreased as it was truncated. We also found cyt-c release from the inner mitochondrial membrane space into cytoplasm to be dose-dependent and it was followed by induction of apoptosis. In the p53-null cells caspase-8 was activated prior caspase-9, whereas the cells harboring p53 exhibited a simultaneous activation of both initial caspases.

**Conclusion:** IR induced a decrease in Mcl-1, activation of Bid, caspase-8, and -9, and release of cyt-c. Presented data indicate that both extrinsic and intrinsic apoptosis signalling pathways were activated in HL-60 and MOLT-4 cells upon exposure to IR regardless to the p53 status.

## INTRODUCTION

Apoptosis is the key biological process for physiological death of eukaryotic cells. It is conserved through evolution and programmed at the genetic level and is necessary for cell recycling, normal tissue homeostasis and regulation of immune system (Vaux & Korsmeyer, 1999). Apoptosis is characterized by typical morphological changes and malfunctions in apoptosis have been implicated in human diseases including cancer, neurodegenerative disorders and others (Jacobson et al., 1997; Price et al., 1998). In spite of the fact that we do not fully understand the mechanisms involved in apoptosis, a key component is activation of caspases. This family of cystein-aspartate proteases participates in a cascade of events that result in cleavage of structural, nuclear and other proteins and causes ultimate disassembly of a cell (reviewed in Thornberry & Lazebnik, 1998). Caspases are the central element of executive stage of apoptosis; nevertheless, regulation of apoptosis is executed by different factors. The proteins of Bcl-2 family play the principal role and act as the major regulators of apoptosis signalling (reviewed in Kutuk & Basaga, 2006). The apoptotic pathways leading to caspase activation might be triggered by two diverse but partially overlapping mechanisms; either mediated by cell surface receptors or by mitochondrial factors (reviewed in Adams, 2003). Under each scenario an initiation caspase is activated, such as caspase-8 in the case of receptor-mediated pathway or caspase-9 in the case of mitochondria-mediated pathway and they both contribute to the cleavage of executive caspase-3.

In our previous studies we described IR-induced apoptosis in HL-60 cells. Briefly, HL-60 cells (p53 null) are quite radio-resistant (Vávrová et al., 2004) and using flow-cytometry we detected rapid onset of apoptosis. There were 49 or 81 % of the cells apoptotic 6 hours after irradiation by 20 or 50 Gy, resp. The dose of 10 Gy induced rapid apoptosis only in 11 % of the cells at this time (2 % in control). The doses up to 10 Gy caused after 6 hours cell cycle arrest in

S-phase, followed by cell cycle arrest in G2-phase with maximum from 16 to 24 hours after irradiation. When exposed to the dose range of 3.5 - 10 Gy, the onset of apoptosis was delayed and maximum of apoptotic HL-60 cells was detected 48 hours after irradiation (Vávrová et al., 2001). Therefore we used here low and high doses of IR to study expression of selected Bcl-2 proteins during both rapid and delayed cell death. We also described apoptosis in MOLT-4 cells previously. In contrast to HL-60, these cells undergo only so-called post-mitotic apoptosis. Therefore we used only low doses based on a proliferation rate test in our previous work (Tichý et al., 2007) and we exposed MOLT-4 cells to cytostatic, sublethal, or lethal dose (1.5, 3.0, or 7.5 Gy, resp.), which are relevant in radiotherapy.

In this paper we focused on some members of Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) family. They might be classified according to their structure and function: (i) Bcl-2-like survival factors such as Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (Bcl-2-like protein 1), Bcl-w (Bcl-2-like protein 2), Mcl-1 (myeloid cell line-1); (ii) pro-apoptotic BH3-only (death factors containing only Bcl-2 homology domain 3) such as Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bid (Bcl-2 homology domain 3 interacting death agonist), Bmf (Bcl-2-modifying factor), Noxa (derived from Latin word for "damage"), and PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis); and (iii) pro-apoptotic Bax-like factors such as Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer), Bcl-x<sub>S</sub> (Bcl-x<sub>L</sub> pro-apoptotic splice variant) (reviewed in Borner, 2003). We evaluated the changes of the anti-apoptotic Mcl-1, the pro-apoptotic Bid, and release of cytochrome c (cyt-c) from mitochondria. We also examined the role of caspase-8 and caspase-9 in the apoptotic signalling after the exposure to ionising radiation (IR). Here we show that IR induced a decrease in Mcl-1 and Bid, release of cyt-c, and activation of caspase-8, and -9. Both extrinsic and intrinsic apoptosis signalling pathways were activated under different p53 (TP53 tumor suppressor gene) conditions, i.e. in both HL-60 (p53 null) and MOLT-4 (p53 wild type: wt) cells upon irradiation.

Deleted: BH3

Deleted: domain

Deleted: conditions

**METHODS**

**Cell cultures and culture conditions.** The human promyelocyte leukaemia HL-60 cells and human T-lymphocyte leukaemia MOLT-4 cells were obtained from the American Type Culture Collections (Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma, St. Louis, MS, USA) supplemented with 20% fetal calf serum, 0.05% L-glutamine, 150 UI/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin in a humidified incubator at 37 °C and controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cultures were divided every second day by dilution to a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml. The cell counts were performed with a hemocytometer; the cell membrane integrity was determined by using the Trypan blue exclusion technique. Cell lines in the maximal range of up to 20 passages were used for this study.

**Gamma irradiation.** Exponentially growing cells were suspended at a concentration of  $2 \times 10^5$ /ml. Aliquots of 10 ml of cell suspension were plated into 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc, Wiesbaden, GER) and irradiated at room temperature using <sup>60</sup>Co γ-ray source with a dose-rate of 0.4 Gy/min, at a distance of 1 m from the source. After the irradiation the flasks were placed in a 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub> and aliquots of the cells were removed at various times after irradiation for analysis. The cells were counted and cell viability was determined with the Trypan blue exclusion assay.

**Electrophoresis and Western blotting.** At various times after irradiation, the cells were washed with PBS and lysed. Whole cell extracts were prepared by lysis in 500 µl of lysis buffer (137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% n-octyl-β-glucopyranoside, 50 mM NaF, 20 mM Tris, pH=8, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> - all from Sigma, St. Louis, MS, USA - and 1 tablet of Complete™ Mini, Roche, Manheim, GER). Mitochondrial fractions were obtained using Mitochondria Isolation Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's guide. The lysates containing equal amount of protein (30 µg of whole cell lysates and 10 µg of mitochondrial protein fractions) were

Deleted: ¶

Deleted: D

Deleted: D

loaded onto a 12% SDS (sodium dodecyl sulphate) polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BioRad, Hercules, CA, USA), and hybridized with an appropriate antibody (anti-Bid - 1:1.000 from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; anti-caspase-8 - 1:500 (detecting both full-length and active), anti-caspase-9 - 1:250 (detecting only full-length) and anti-cytochrome c oxidase IV (COX IV) 1: 2.000 from Upstate, Chicago, IL, USA; anti-lamin B - 1:750 (Oncogene, Cambridge, MA, USA); anti-Mcl-1 - 1:1.000 and anti- $\beta$ -actin - 1:10.000 from Sigma, St. Luis, MS, USA; anti-cytochrome c - 1:1.000 from NeoMarkers, Westinghouse, CA, USA). After washing, the blots were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibody (1:1.000 - 1:10.000 from Dako, High Wycombe, UK) and the signal was developed with ECL detection kit (BM Chemiluminiscence -POD, Roche, Mannheim, GER) by exposure to a film.

Deleted: D

## RESULTS

*After sublethal but not after lethal dose Mcl-1 expression initially increased, with onset of apoptosis it declined.*

Mcl-1 is an anti-apoptotic protein and together with other anti-apoptotic members of Bcl-2 family increases probability of cell survival by maintaining the mitochondrial membrane integrity. We irradiated HL-60 cells by the sublethal dose of 6 Gy and at first we observed an increase in anti-apoptotic Mcl-1 (40 kDa) after 6 hours post-irradiation. This was followed by a decrease at the time of induction of apoptosis between 16 and 24 hours post-irradiation. Later (after 72 hours) the amount of Mcl-1 increased again and after 144 hours reached the level of non-irradiated cells (Figure 1A). Apoptosis was attenuated, which was confirmed by detection of fragmented nuclear protein lamin B. When HL-60 cells received the dose of 20 Gy (lethal dose)

1  
2 there was no increase but a straight decrease in Mcl-1 from 4 to 6 hours post-irradiation, which  
3  
4 was followed by cleavage of lamin B after 6 hours (Figure 1A, C).  
5

6 We tested expression of Mcl-1 in this cell line after irradiation by higher doses of IR (10,  
7  
8 20, and 50 Gy). Four hours after irradiation by the dose of 10 Gy we observed an increase in  
9  
10 Mcl-1, while the dose of 20 Gy caused a substantial decrease in Mcl-1 and after the dose of 50  
11  
12 Gy we did not detect Mcl-1 at all (Figure 1A).  
13

14 We exposed MOLT-4 cells to cytostatic, sublethal, or lethal dose (1.5, 3.0, or 7.5 Gy,  
15  
16 resp.). The dose of 1.5 Gy caused an increase in Mcl-1. Its maximal expression was found after 4  
17  
18 hours after irradiation, then it declined and after 24 hours it was comparable to non-irradiated  
19  
20 cells. After the dose of 3.0 Gy we did not observe any increase but after 16 hours (when lamin B  
21  
22 was found to be cleaved) the amount of Mcl-1 decreased and after 24 hours we detected only a  
23  
24 small amount of Mcl-1. The lethal dose of 7.5 Gy induced straight decrease in Mcl-1 within 16  
25  
26 hours after irradiation (Figure 1B, D). Taken together 24 hours after irradiation the amount of  
27  
28 Mcl-1 decreased in a dose-dependent manner.  
29

### 30 31 *Ionising radiation induced cleavage of Bid*

32  
33 Protein Bid (22-kDa) is a pro-apoptotic member of Bcl-2 family and it is cleaved by  
34  
35 capsase-8 into t-Bid (truncated Bid; a 15-kDa fragment). In HL-60 cells we found Bid to be  
36  
37 cleaved before induction of apoptosis. t-Bid was detected from 16 to 48 hours after the dose of 6  
38  
39 Gy. After 72 hours (when the cells had recovered from the sublethal dose-induced damage) the  
40  
41 amount of t-Bid decreased and after 144 hours there was no cleaved Bid, which correlated with a  
42  
43 decrease in fragmented lamin B. After the dose of 20 Gy (lethal) Bid was cleaved after 1 hour  
44  
45 and we also observed an increase in the amount of the full molecule of Bid. All the lethal doses  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(10, 20, and 50 Gy) caused cleavage of Bid 4 hours post-irradiation and the amount of both Bid and t-Bid increased with the dose (Figure 1A).

In MOLT-4 cells we did not detect t-Bid but just the whole molecule of Bid. We observed a decrease in a 22-kDa form presumably due to its cleavage producing t-Bid, which was not detectable in this type of cells.

The dose of 1.5 Gy caused a decrease in Bid after 16 hours post-irradiation but small amount was detectable even after 24 hours. The dose of 3.0 Gy caused a similar decrease after 16 hours post-irradiation but after 24 hours no Bid was detected. The dose of 7.5 Gy caused a rapid decrease and 16 hours after irradiation there was no Bid detected (Figure 1B).

Deleted: ¶  
<< FIGURE 1 >>¶

*Cytochrome c was released from mitochondrial matrix into cytoplasm*

To prove whether IR caused a release of cyt-c from the mitochondrial matrix we isolated a mitochondrial fraction of cells lysates and examined presence of cyt-c after irradiation.

At HL-60 the mitochondria were isolated 16 hours after irradiation by the doses of 2.5, 5, 7.5, or 10 Gy, in the time when t-Bid was observed after a sublethal dose. We found out that cyt-c is released into cytoplasm only after the dose of 10 Gy (Figure 2A). The doses up to 7.5 Gy induced its release later (data not shown).

On the other hand, 16 hours after irradiation by the lethal doses (10, 20, and 50 Gy) we observed a total release of cyt-c (Figure 2A) and therefore we conducted the same experiment already 4 hours after irradiation. Even in this early time Bid was cleaved into t-Bid but only the doses of 20 and 50 Gy caused a total release of cyt-c from mitochondria and the dose of 10 Gy caused just a slight decrease in cyt-c (Figure 2A).

MOLT-4 cells were initially irradiated by the dose of 7.5 Gy and we observed a decrease in cyt-c in the mitochondrial fraction from 4 to 16 hours after irradiation (Figure 2B). As Bid was



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

cleaved in these cells between 6 and 16 hours we chose the interval 12 hours after irradiation. The cells received the doses of 1, 2, 3, 5, or 10 Gy resp. We found out that cyt-c was released into cytoplasm in a dose-dependent manner (Figure 2B).

Deleted: ¶  
<< FIGURE 2 >>¶

*Both initial caspases -8 and -9 were activated*

One of the initiation caspases involved in apoptotic signalling is caspase-8. It is responsible for cleavage and activation of pro-apoptotic Bid. We irradiated HL-60 cells by the dose of 6 Gy and we found caspase-8 to be activated; i.e. a full-length molecule (57-kDa) was cleaved into an active subunit (18-kDa). This cleavage was observed 16 hours post-irradiation, which was the time when we detected t-Bid (Figure 3A).

In MOLT-4 cells cleavage of caspase-8 correlated with cleavage of Bid, too. After the dose of 1.5 Gy we detected an active subunit of caspase-8 16 hours post-irradiation. When we increased the dose to 3.0 or 7.5 Gy the cleavage of caspase-8 occurred more rapidly, after 6 or 4 hours, resp. (Figure 3B).

Another initiation caspase involved in apoptotic signalling is caspase-9. Its activation is conditioned by a release of cyt-c into cytoplasm because it participates in formation of so-called apoptosome, in which procaspase-9 is matured. Procaspase-9 (47-kDa) is cleaved in apoptosome producing an active subunit (17-kDa).

A decrease in procaspase-9 was observed in HL-60 cells irradiated by the dose of 6 Gy between 24 and 48 hours post-irradiation. Therefore caspase-9 activation occurred at least 8 hours after activation of caspase-8, which was detected 16 hours post-irradiation (Figure 3A).

On the other hand, in MOLT-4 cells we observed a simultaneous cleavage of both caspase-8 and -9. The amount of procaspase-9 slightly decreased 16 hours post-irradiation by the

dose of 1.5 Gy and a substantial decrease in procaspase-9 after the doses of 3.0 or 7.5 Gy was observed after 6 or 4 hours, resp. (Figure 3B).

Deleted: ¶  
<< FIGURE 3 >>¶

## DISCUSSION

Various physical and chemical agents can induce cell death offering some promising strategies for the treatment of cancer. One of the physical agents is gamma-radiation. It is known to induce apoptosis, which is regulated mostly by Bcl-2 protein family (reviewed in Borner, 2003). One of its members, Mcl-1, acts as an apical molecule in control of apoptosis and propagation of cell survival by maintaining mitochondrial integrity via interaction with pro-apoptotic partners. Mcl-1 is a close functional relative of Bcl-2 but structurally different. It was first isolated in a myeloid cell line, where it was thought to play a transient role in promoting cell survival, but has since been shown to be expressed in various tissues and malignant cells, where its expression is significantly associated with a failure to achieve complete remission after cytotoxic therapy (Saxena et al., 2004). Moreover, Mcl-1 blocks IR-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death (Skvara et al., 2005). Interestingly, the incidence of tumours is higher in mice expressing Mcl-1 transgene than in those expressing Bcl-2, and also generally in tumours such as lymphomas. Its anti-apoptotic activity is based on the fact that it can create a heterodimer with pro-apoptotic Bak, keeping it in an inactive state. Willis et al. (2005) provided an insight into this specific interaction, when reported that Bak is activated through its Noxa-dependent displacement from Mcl-1 (Noxa is another p53-inducible pro-apoptotic member of Bcl-2 protein family). Dissociated Bak undergoes a conformational change and translocates to mitochondrion and oligomerize with Bax to propagate apoptotic signal. Noxa also induces (besides unleashing from Bak) degradation of Mcl-1 in proteasome (Gélinas & White, 2007).

1  
2 One of the remarkable features of Mcl-1 is its rapid regulation. Our results have shown  
3 that Mcl-1 was rapidly up-regulated several hours post-irradiation by a sublethal dose in both  
4 MOLT-4 and HL-60 cells, thus independently on p53 status. An initial increase in Mcl-1 was a  
5 response to IR-induced apoptotic stimulus and the cells tried to avoid triggering the programmed  
6 cell death. An increase in Mcl-1 was transient, because even a sublethal dose induced apoptosis  
7 in a part of the cells and therefore we later observed a temporary decrease in Mcl-1. On the other  
8 hand, when the cells managed to repair DNA damage, the level of Mcl-1 increased again. It is  
9 due to a very rapid turnover of this anti-apoptotic molecule. Typically, it is shorter than 3 hours  
10 (Yang et al., 1995; Schubert & Duronio, 2001; Balakrishnan et al., 2005). Although the rapid  
11 turnover in healthy cells is largely caused by proteasome-mediated degradation, during apoptosis,  
12 Mcl-1 is a very efficient substrate for caspases (Clohessy et al., 2004). Remarkably, caspase-  
13 catalyzed cleavage of Mcl-1 simultaneously inactivates the survival function of this protein and  
14 converts 40 kDa Mcl-1 into 35/36 kDa cell death-promoting molecule (Jamil et al., 2005),  
15 activating a positive feedback loop that results in an increased caspase-activation (Michels et al.,  
16 2005). On the other hand, Kubota et al. (2006) showed on mice macrophages that Mcl-1  
17 depletion in IR-induced apoptosis was suppressed by a proteasome inhibitor but not by caspase  
18 inhibitor and they concluded that Mcl-1 depletion was attributable to arrest of global protein  
19 synthesis.

20  
21 Another member of Bcl-2 protein family is Bid. We observed its cleavage early after  
22 irradiation by the dose of 20 Gy. By contrast, Hosokawa et al. (2005) reported that in HL-60 cells  
23 Bid was activated only in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells and in irradiated cells no Bid activation occurred.  
24 Hosokawa's team was using a sublethal dose of 4 Gy; in our experiments we used also a  
25 sublethal dose of 6 Gy and after this dose we found Bid to be cleaved 16 hours post-irradiation. A  
26 point of controversy arises, since both studies were performed on the same cell line. Hosokawa  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

explains that Bid is not activated because IR-induced signalling is caspase-8-independent and in irradiated cells caspase-8 (unlike caspase-3 and -9) activity was not observed. We argue that this explanation would be well-founded only if caspase-8 activity would have been tested for a longer time. We agree that there is no caspase-8 activity 6 hours after irradiation, but we detected active caspase-8 subunit 16 hours after irradiation with maximum at 48 hours post-irradiation. Also a work of Kasahara et al. (2002) has shown Bid to be cleaved during IR-induced apoptotic signalling in HL-60 cells. On the other hand Barry et al. (2000) showed that granzyme B can short-circuit the need for caspase-8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. Moreover, Garnett et al. (2007) published that Bid activation may temporally precede caspase-8 activation and hence may be caspase-8-independent, but these data were obtained during a study on human osteosarcoma cells and apoptosis was induced by TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) and not by IR. In our previous work (Rezáčová et al., 2005) we studied the effect of TRAIL but not IR on Mcl-1 and Bid. Both of these were cleaved and their amount significantly decreased in HL-60 cells after exposure to TRAIL. The current work shows the importance of Mcl-1 and Bid decrease in IR-induced apoptosis, which might contribute to a stronger effect of combined therapy.

Deleted: e

Despite some controversy about Bid, it is quite sure that pro-apoptotic proteins are involved in regulation of mitochondrial membrane integrity (reviewed in Borner, 2003). Nevertheless, we still debate about release of intra-mitochondrial proteins. Kim et al. (2000) have shown *in vitro* that t-Bid functions Bax-independently, although the two proteins could act synergistically. Moreover, they found that induction of cyt-c release by t-Bid was not accompanied by permeability transition even at high doses of t-Bid. The exact mechanism is not known, but probably other mitochondrial components or other pro-apoptotic members of Bcl-2 protein family may be involved to form a unique type of pore. Notably, this type of pore is not

1  
2 likely specific to cyt-c, since other inter-membrane proteins with larger molecular mass, such as  
3  
4 sulfite oxidase, can also be released by t-Bid (Kim et al., 2000).  
5

6 In this work, we isolated mitochondrial fraction of irradiated cells and examined whether  
7  
8 and when is cyt-c released from mitochondria to cytoplasm. The time of isolation was chosen  
9  
10 according to the cleavage of Bid and we observed a decrease in cyt-c in mitochondria.  
11  
12 Interestingly, 4 hours post-irradiation of HL-60 cells by the dose of 10 Gy we did not observe  
13  
14 cyt-c release, despite of the fact that t-Bid was already detected (after the dose of 20 Gy even  
15  
16 from 1 hour). Cyt-c release could be seen at the given time only after the dose of 20 or 50 Gy,  
17  
18 suggesting that just the mere presence of active t-Bid is not enough to induce opening of the  
19  
20 permeability transition pore in the mitochondria but the amount of t-Bid must reach a certain  
21  
22 threshold to induce a release of cyt-c into cytoplasm or other molecules must be involved as Kim  
23  
24 et al. (2000) proposed. Not surprisingly, irradiation induced cyt-c release also in MOLT-4 cells,  
25  
26 but its decrease in mitochondria was dose-dependent.  
27

28 Upon apoptotic stimulation, cyt-c released from mitochondria associates with procaspase-  
29  
30 9 and other factors such as Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) and ATP.  
31  
32 Subsequently, an apical protease of the human intrinsic apoptotic pathway, caspase-9, is activated  
33  
34 in a platform known as the apoptosome (reviewed in Borner, 2003). This complex processes  
35  
36 procaspase-9 into a large active fragment (35- or 17-kDa) and a small fragment (10-kDa) by self-  
37  
38 cleavage at Asp<sup>315</sup> (Liu et al., 1996; Li et al., 1997; Zou et al., 1999).  
39

40 The mechanism of caspase-9 activation has been debated and two contrasting hypotheses  
41  
42 have been suggested. One of these postulates an allosteric activation of monomeric caspase-9; the  
43  
44 other postulates a dimer-driven assembly at the surface of the apoptosome. Muzio et al. (1998)  
45  
46 proposed a model of "induced proximity" for caspase-8 and nowadays many studies (Chao et al.,  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2005; Pop et al., 2006) proved that also caspase-9 is processed as a dimer via “induced proximity” mechanism.

Cleaved caspase-9 further processes other caspase members, including caspase-3 and caspase-7, to initiate a caspase cascade, which leads to cellular break-down. In addition to self-cleavage, procaspase-9 also can be cleaved *in vivo* by caspase-3 at Asp<sup>330</sup>. This process serves as a positive feedback loop to amplify the apoptotic signal in the caspase activation pathway (Slee et al., 1999). In our experiments we worked with an antibody recognizing specifically the full-length molecule of procaspase-9, therefore caspase-9 activation was considered as a decrease in procaspase-9. We observed a decrease in procaspase-9 48 hours post-irradiation of HL-60 cells by the dose of 6 Gy (24 hours after activation of caspase-8). This was again in contrast to the results of Hosokawa et al. (2005) who reported activation of caspase-9 already 4 hours after irradiation by the dose of 4 Gy. However, it seems that caspase-9 is not of a crucial importance for induction of apoptotic cascade, since Marsden et al. (2004) generated caspase-2<sup>-/-</sup>9<sup>-/-</sup> mice and suggested that cyt-c release can occur independently of both caspase-2 and -9. Moreover, Ho et al. (2004) brought evidence that certain apoptotic cascades can bypass the apoptosome and activate caspase-9 independently of the mitochondria. Thus, apoptosomal activation of caspase-9 seems to represent only one of the routes for its activation; other pathways, some of which are yet to be discovered, can bypass the requirement for Apaf-1 and activate caspase-9 in a tissue and context specific manner.

## CONCLUSION

Here we show that in both HL-60 (p53 null) and MOLT-4 (p53 wt) cells the amount of Mcl-1 initially increased after irradiation by sublethal but not by lethal dose and in the later stages (when apoptosis occurred) it decreased. We also show that IR induced cleavage of Bid and

1  
2 subsequent release of cyt-c from mitochondria, which preceded induction of apoptosis. Cyt-c was  
3 released in p53 null cells, but the cells harboring p53 likely use other proteins (transcriptionally  
4 regulated by p53) contributing to earlier caspase-9 activation, which might be also one of the  
5 reasons of MOLT-4 radio-sensitivity. Activation of caspase-8 and caspase-9 was involved in both  
6 of the cell lines but in HL-60 activation of caspase-8 occurred prior to activation of caspase-9  
7 while in MOLT-4 cells we observed a simultaneous activation of these two caspases. Caspase-9  
8 was activated but at the distinct time and under distinct conditions, which are given by different  
9 p53 status. This suggests that under the p53-null conditions caspase-8 is of a greater importance  
10 in radiation-induced apoptosis than caspase-9. This idea is supported also by the work of Afshar  
11 et al. (2006) who reported that in glioma cells IR relies on caspase-8 activity to help mediate p53-  
12 independent cell death.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23  
24 Presented data indicate that both extrinsic and intrinsic apoptosis signalling pathways  
25 were activated in HL-60 and MOLT-4 cells upon exposure to IR and that activation of these  
26 pathways occurred regardless of p53 status.  
27  
28  
29  
30

### 31 REFERENCES

- 32  
33  
34 Adams JM. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Development* 17: 2481-  
35 2495.  
36  
37 Afshar G, Jelluma N, Yang X, Basila D, Arvold ND, Karlsson A, Yount GL, Dansen TB, Koller  
38 E, Haas-Kogan DA. 2006. Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent  
39 apoptosis in glioma cells. *Cancer Research* 66: 4223-4232.  
40  
41  
42  
43 Balakrishnan K, Stellrecht CM, Genini D, Ayres M, Wierda WG, Keating MJ, Leoni LM,  
44 Gandhi V. 2005. Cell death of bioenergetically compromised and transcriptionally  
45 challenged CLL lymphocytes by chlorinated ATP. *Blood* 105: 4455-4462.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Barry M., Heibein J.A., Pinkoski M.J., Lee S.-F., Moyer R.W., Green D.R., Bleackley R.C. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology* 20: 3781-3794.
- Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology* 39: 615-647.
- Chao Y, Shiozaki EN, Srinivasula SM, Rigotti DJ, Fairman R, Shi Y. 2005. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *Public Library of Science - Biology* 3: e183.
- Clohessy JG, Zhuang J, Brady HJ. 2004. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *British Journal of Haematology* 125: 655-665.
- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. 2007. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* 12: 1299-1315.
- Gélinas C and White E. 2007. BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes and Development* 19: 1263-1268.
- Ho AT, Zacksenhaus E. 2004. Splitting the apoptosome. *Cell Cycle* 3: 446-448.
- Hosokawa Y, Sakakura Y, Tanaka L, Okumura K, Yajima T, Kaneko M. 2005. Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukaemia HL60 cells. *Journal of Radiation Research* 46: 293-303.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.



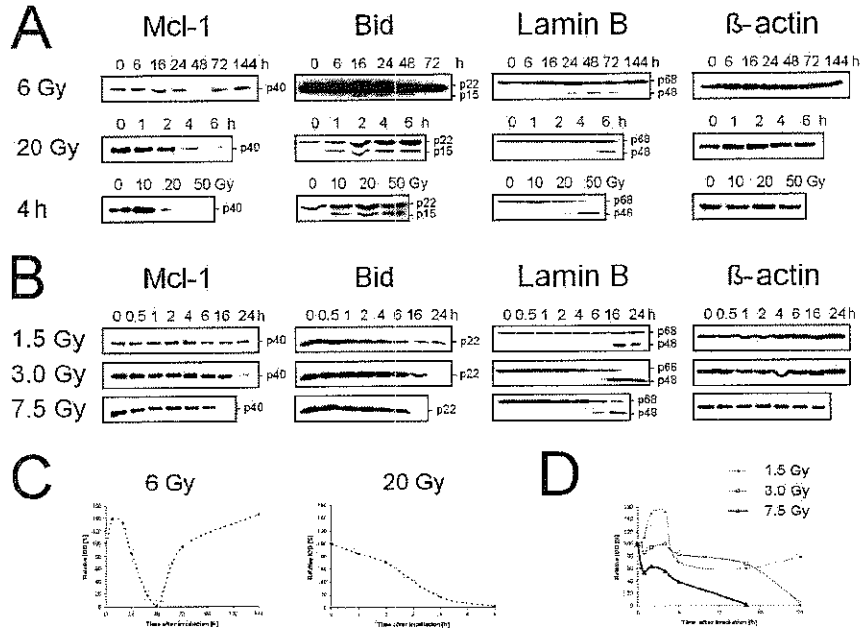
- 1  
2 Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V. 2005. A proteolytic fragment of  
3 Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1.  
4 Biochemical Journal 387: 659-667.  
5  
6  
7  
8 Kasahara T, Koguchi E, Funakoshi M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y. 2002. Antiapoptotic action of  
9 focal adhesion kinase (FAK) against ionising radiation. Antioxidants & Redox Signaling  
10 4: 491-499.  
11  
12  
13 Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. 2000. Bid-induced cytochrome c release is  
14 mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and  
15 Bax. Journal of Biological Chemistry 275: 39474-39481.  
16  
17  
18 Kubota Y, Kinoshita K, Suetomi K, Fujimori A, Takahashi S. 2007. Mcl-1 depletion in apoptosis  
19 elicited by ionizing radiation in peritoneal resident macrophages of C3H mice. Journal of  
20 Immunology 178: 2923-2931.  
21  
22  
23 Kutuk O, Basaga H. 2006. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and  
24 atherosclerosis. Apoptosis 11: 1661-1675.  
25  
26  
27 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997.  
28 Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an  
29 apoptotic protease cascade. Cell 91: 479-489.  
30  
31  
32 Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-  
33 free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147-157.  
34  
35  
36 Marsden VS, Ekert PG, Van Delft M, Vaux DL, Adams JM, Strasser A. 2004. Bcl-2-regulated  
37 apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and  
38 caspase-9. Journal of Cell Biology 165: 775-780.  
39  
40  
41 Michels J, Johnson PW, Packham G. 2005. Mcl-1. International Journal of Biochemistry & Cell  
42 Biology 37: 267-271.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2926-2930.
- Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. 2006. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular Cell* 22: 269-275.
- Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. 1998. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic model. *Science* 282: 1079-1083.
- Rezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Tichý A, Knízek J, Psutka J. 2005. The importance of abrogation of G2-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation. *Acta Biochimica Polonica* 52: 889-895.
- Saxena A, Viswanathan S, Moshynska O, Tandon P, Sankaran K, Sheridan DP. 2004. Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology* 75: 22-33.
- Schubert KM, Duronio V. 2001. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochemical Journal* 356: 473-480.
- Skvara H, Thallinger C, Wacheck V, Monia BP, Pehamberger H, Jansen B, Selzer E. 2005. Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death. *Anticancer Research* 25: 2697-2703.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *Journal of Cell Biology* 144: 281-292.

- 1  
2 Tichý A, Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Pejchal J, Vilasová Z, Cerman J,  
3  
4 Österreicher J. 2007. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-  
5 lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochimica Polonica* 54: 281-287.  
6  
7  
8 Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316. Review.  
9  
10 Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.  
11  
12 Vávrová J, Mareková M, Vokurková D. 2001. Radiation-induced apoptosis and cell cycle  
13 progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplasma* 48: 26-33.  
14  
15 Vávrová J, Rezacová M, Vokurková D, Psutka J. 2004. Cell cycle alteration, apoptosis and  
16 response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate.  
17 *Physiological Research* 53: 335-342.  
18  
19  
20 Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. 2005.  
21 Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by  
22 BH3-only proteins. *Genes Development* 19: 1294-1305.  
23  
24  
25 Yang T, Kozopas KM, Craig RW. 1995. The intracellular distribution and pattern of expression  
26 of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *Journal of Cell Biology*  
27 128: 1173-1184.  
28  
29  
30 Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a  
31 functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* 274:  
32 11549-11556.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

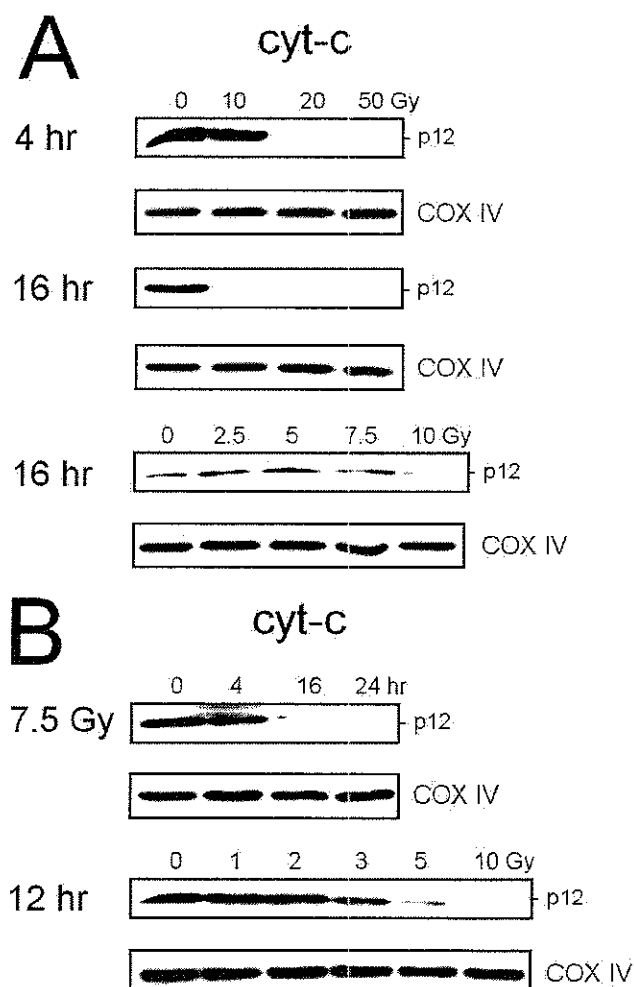
Deleted: 1





**Gamma-radiation induces decrease in Mcl-1 and Bid. The cells were irradiated and analyzed as indicated. Representative Western blots are shown. A. HL-60 cells. After sublethal (6 Gy) but not after lethal dose (20 Gy) the amount of full-length Mcl-1 (40-kDa) initially increased, with onset of apoptosis (confirmed by cleavage of Lamin B) it declined. Full-length Bid (22-kDa) was cleaved into t-Bid (a 15-kDa fragment). B. MOLT-4 cells. Mcl-1 expression again initially increased after cytostatic (1.5 Gy) but not after lethal dose (7.5 Gy), with onset of apoptosis (confirmed by cleavage of Lamin B) it declined as well as the amount of Bid (22-kDa). C and D. Integrated optical density (IOD) graphs of Mcl-1 blots shown in A and B, resp.**

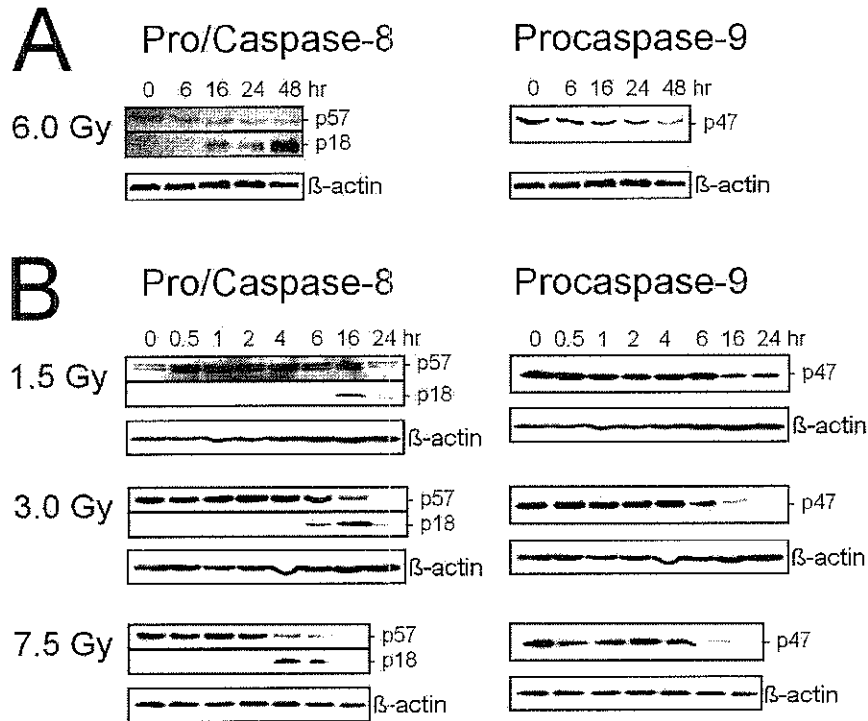
160x119mm (254 x 254 DPI)



**Gamma-radiation induces release of cytochrome c. The cells were irradiated and mitochondrial protein fractions were isolated and analyzed as indicated. Representative Western blots are shown. A. HL-60 cells. When irradiated by the doses of 10, 20, or 50 Gy, Bid was cleaved early after irradiation but cyt-c was released only by the lethal and supralethal doses 16 hours post-irradiation. B. MOLT-4 cells. Cyt-c was released in a dose-dependent manner 12 hours after irradiation. COX IV, cytochrome c oxidase IV used as a mitochondrial loading control.**

75x119mm (254 x 254 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Gamma-radiation induces activation of initial caspases. The cells were irradiated and analyzed as indicated. Representative Western blots are shown. A. HL-60 cells. Procaspase-8 (57-kDa) was activated after 16 hours (18-kDa subunit), while procaspase-9 (47-kDa) was activated 48 hours after irradiation by the dose of 6 Gy. B. MOLT-4 cells. Procaspase-8 and procaspase-9 were activated simultaneously after 16, 6, or 4 hours, when irradiated by the dose of 1.5, 3.0, or 7.5 Gy, resp.**

130x110mm (254 x 254 DPI)



## **10.2 Příloha 2 (Tichý et al., 2007)**

Tichý A, Zášková D, Řezáčová M, Vávrová J, Vokurková D, Pejchal J, Vilasová Z, Cerman J, Österreicher J. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochimica Polonica* 2007; **54**: 281-287.



## Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4

Aleš Tichý<sup>1,2,✉</sup>, Darina Zášková<sup>2</sup>, Martina Řezáčová<sup>2</sup>, Jiřina Vávrová<sup>1</sup>,  
Doris Vokurková<sup>3</sup>, Jaroslav Pejchal<sup>1</sup>, Zdena Vilasová<sup>1</sup>, Jaroslav Cerman<sup>2</sup> and  
Jan Österreicher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences in Hradec Králové, University of Defence in Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Institute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital Hradec Králové, Czech Republic

Received: 16 January, 2007; revised: 21 May, 2007; accepted: 01 June, 2007  
available on-line: 12 June, 2007

ATM kinase (ATM) is essential for activation of cell cycle check points and DNA repair in response to ionizing radiation (IR). In this work we studied the molecular mechanisms regulating DNA repair and cell death in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. Apoptosis was evaluated by flow-cytometric detection of annexin V. Early apoptotic cells were determined as sub-G1 cells and late apoptotic cells were determined as APO2.7-positive ones. Proteins involved in ATM signalling pathway were analysed by Western-blotting. We observed a rapid (0.5 h) phosphorylation of ATM declining after 6 h after irradiation by all the doses studied (1.5, 3.0, and 7.5 Gy). Checkpoint kinase-2 (Chk-2) was also phosphorylated after 0.5 h but its phosphorylated form persisted 4, 2, and 1 h after the doses of 1.5, 3.0, and 7.5 Gy, respectively. The amount of p53 protein and its form phosphorylated on Ser-392 increased 1 h after irradiation (1–10 Gy). The lethal dose of 7.5 Gy caused an immediate induction and phosphorylation of p53 after 0.5 h post-irradiation. At the time of phosphorylation of p53, we found simultaneous phosphorylation of the oncoprotein Mdm2 on Ser-166. Neither ATM nor its downstream targets showed a dose-dependent response after 1 h when irradiated by the doses of 1–10 Gy. MOLT-4 cells were very sensitive to the effect of IR. Even low doses, such as 1.5 Gy, induced apoptosis 16 h after irradiation (evaluated according to the cleavage of nuclear lamin B to a 48-kDa fragment). IR-induced molecular signalling after exposure to all the tested doses was triggered by rapid phosphorylation of ATM and Chk-2. Subsequent induction of p53 protein and its phosphorylation was accompanied by concomitant phosphorylation of its negative regulator, oncoprotein Mdm2, and followed by induction of apoptosis.

**Keywords:** ATM kinase, checkpoint kinase-2, p53, Mdm2, ionizing radiation

### INTRODUCTION

Various physical and chemical factors induce DNA lesions, including base damage, intra- and inter-strand cross-linking, and single- and double-strand breaks (DSBs) (Khanna *et al.*, 2001). DSBs cause remodelling of chromatin and formation of

so-called ionizing radiation (IR)-induced foci, where the proteins involved in radiation damage repair are localized within the first minutes after irradiation (Bekker-Jensen *et al.*, 2006). A very early step in the response of mammalian cells to DSBs induced by IR is activation of ATM kinase (Lavin *et al.*, 1995). ATM stands for ataxia-telangiectasia (A-T, a human auto-

✉Corresponding author: A. Tichý, Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences in Hradec Králové, University of Defence in Brno, Brno, Czech Republic; phone: (420) 973 253216; fax: (420) 973 253000; e-mail: tichy@pmfhk.cz

\*Preliminary report presented at: The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, 22–25 August, 2006, Kiev, Ukraine.

Abbreviations: ATM, ataxia telangiectasia-mutated kinase; Chk-2, checkpoint kinase-2; DSB, double strand break; IR, ionizing radiation; Mdm2, murine double minute 2 protein; wt, wild type.

somal recessive disorder), whose responsible gene is mutated. *ATM*, the defective gene in this pleiotropic disease (progressive cerebral ataxia, oculocutaneous telangiectasia, immunodeficiency), encodes a large serine/threonine kinase belonging to the phosphatidylinositol-3 kinase family (Powers *et al.*, 2004). A-T cells exhibit a specific phenotype including increased radiosensitivity, genome instability, cancer predispositions and others (Lavin & Shiloh, 1997). Cells derived from A-T patients are extremely sensitive to IR, radiomimetic drugs and topoisomerase inhibitors. The importance of ATM is undeniable, since it regulates all three cell cycle checkpoints and functions in the regulation of DNA repair and apoptosis, suggesting that it is a central controller of cellular responses to DSBs (Khanna *et al.*, 2001). Activation of ATM involves rapid intermolecular autophosphorylation of Ser-1981 that causes dissociation of the inactive dimer (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM affects numerous different targets *via* phosphorylation and some of them participate in the cell cycle arrest. These are p53, murine-double minute protein (Mdm2), and checkpoint kinase-2 (Chk-2) in the G1 checkpoint (Canman *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 2000; Maya *et al.*, 2001); Nbs1, Brca1, FancD2, and SMC1 in the transient IR-induced S-phase arrest (Taniguchi *et al.*, 2002; Yazdi *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002); and Brca1 and hRad17 in the G2/M checkpoint (Xu *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2001).

In this work we studied the molecular pathway initiated by IR in MOLT-4 cells. These cells are very radiosensitive; by clonogenic survival assay we determined the  $D_0$  value (the dose reducing cell survival to 37%) at 0.87 Gy, whereas for the human promyelocyte leukemic cell line HL-60 the  $D_0$  is 2.2 Gy (Vavrova *et al.*, 2004). We investigated mechanisms related to phosphorylation of ATM (Ser-1981) and therefore we studied the phosphorylation of p53 (Ser-392), Chk-2 (Thr-68) and Mdm2 (Ser-166). Here, we report a rapid phosphorylation of ATM and Chk-2 after exposure of cells to IR. We found that protein p53 was induced shortly after activation of ATM and Chk-2. Subsequent phosphorylation of p53 on Ser-392 appeared soon after induction of p53, facilitating its ability to bind to DNA. That was accompanied by concurrent phosphorylation of Mdm2 on Ser-166, which provides a platform for p53 degradation and decreases its transcriptional activity as part of an auto-regulatory feedback loop.

## METHODS

**Cell cultures and culture conditions.** MOLT-4 cells were obtained from the American Type Culture Collections (Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sig-

ma) supplemented with 20% fetal calf serum, 0.05% L-glutamine, 150 UI/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The cultures were split every second day by dilution to a concentration of 2×10<sup>5</sup> cells/ml. The cell counts were performed with a hemocytometer; the cell membrane integrity was determined by using the Trypan blue exclusion technique. Cell lines at up to 20 passages were used for this study.

**Gamma irradiation.** Exponentially growing MOLT-4 cells were suspended at a concentration of 2×10<sup>5</sup>/ml. Aliquots of 10 ml of cell suspension were plated into 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc) and irradiated at room temperature using <sup>60</sup>Co gamma-ray source with a dose-rate of 0.4 Gy/min, at a distance of 1 m from the source. After the irradiation the flasks were placed in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub> and aliquots of the cells were removed at various times after irradiation for analysis. The cells were counted and cell viability was determined with the Trypan blue exclusion assay.

**Flow-cytometric apoptosis detection.** We used APOPTTEST-FITC (DakoCytomation, Brno, CZ) for detection of apoptotic cells (annexin V-positive) according to the manufacturer's guide. Analysis was performed on an Epics XL flow-cytometer (Coulter Electronic, Hiialeah, FL, USA).

Early apoptotic cells were determined as sub-G1 cells in DNA content analysis. Following the incubation, 1×10<sup>4</sup> cells were washed with cold PBS (phosphate-buffered saline), fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide in Vindelov's solution for 30 min at 37°C. Fluorescence (DNA content) was measured using the Coulter Electronic apparatus.

Late apoptotic cells were determined by detection of the APO2.7 antigen. The cells were collected and washed twice with cold PBS with 5% fetal calf serum. Subsequently, 1×10<sup>5</sup> of cells were resuspended in 0.5 ml of PBS with 5% fetal calf serum and incubated with mouse monoclonal anti-APO2.7 antibody conjugated with phycoerythrin (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) for 0.5 h at 4°C and measured using the Coulter Electronic apparatus.

In all experiments three independent measurements were performed. Data were analysed using Epics XL System II software (Coulter Electronic).

**Electrophoresis and Western blotting.** At various times after irradiation, the MOLT-4 cells were washed with PBS and lysed. Whole cell extracts were prepared by lysis in 500 µl of lysis buffer (137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% *n*-octyl-β-glucopyranoside, 50 mM NaF, 20 mM Tris/HCl, pH=8, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 tablet of protein inhibitors Complete™ Mini, Roche). The lysates containing equal amounts of protein (30 µg) were loaded onto a 12% SDS/polyacrylamide gel. After electrophore-

sis, proteins were transferred to a PVDF membrane and hybridized with an appropriate antibody (anti-ATM (Ser-1981), anti-Chk-2 (Thr-68) or anti-Mdm2 (Ser-166) from Upstate, Chicago, IL, USA; anti-p53 or anti-p53 (Ser-392) from Exbio, Prague, CZ; anti-lamin B from Oncogene, Cambridge, MA, USA). After washing, the blots were incubated with a secondary peroxidase-conjugated antibody (Dako, High Wycombe, UK) and the signal was developed with a chemiluminescence (ECL) detection kit (Boehringer Mannheim) by exposure to an X-ray film (Foma, Hradec Kralove, CZ).

## RESULTS

### Induction of apoptosis

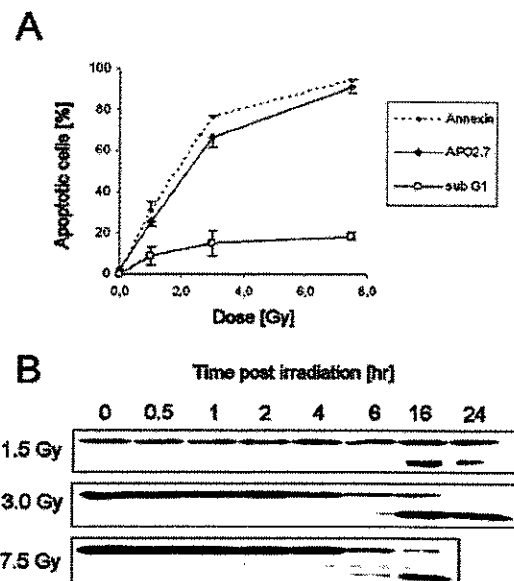
For detection of apoptosis 24 h after the irradiation we used four different methods: annexin V binding, DNA content measurement, detection of 7A6 antigen and caspase-catalysed cleavage of lamin B.

The first method uses flow-cytometric detection of annexin V binding to phosphatidylserine. Exposure of this phospholipid at the plasma membrane is a hallmark of apoptotic process; the method detects both early and late apoptotic cells. After 24 h, 30.7, 76.9, and 94.4% of cells were apoptotic when irradiated by 1.5, 3.0, and 7.5 Gy, respectively.

For determination of early apoptosis we used flow-cytometric determination of DNA content and so-called sub-G1 peak corresponding to apoptotic cells. After 24 h, 8.8, 15.1 and 18.4% of cells were apoptotic when irradiated by 1.5, 3.0, and 7.5 Gy, respectively.

For determination of late apoptosis we used flow-cytometric detection of APO2.7 antigen. Since this antigen is localized on the mitochondrial membrane of apoptotic cells, it is possible to perform the assay with permeabilization or without permeabilization, to detect the cells whose plasma membrane is already permeable. To determine cells in the late stage of apoptosis the method without permeabilization was used in this study. After 24 h, 25.5, 66.7, and 91.0% of cells were apoptotic when irradiated by 1.5, 3.0, and 7.5 Gy, respectively. Figure 1A shows the percentage of annexin V-positive, APO2.7-positive and sub-G1 cells 24 h after gamma irradiation with increasing doses.

Another method confirming the induction of apoptosis of MOLT-4 cells was Western blot analysis of fragmented nuclear protein lamin B. In non-irradiated cells lamin B is present in the nucleus as a 68-kDa protein. Irradiation causes its cleavage producing a 48-kDa fragment. The data obtained from Western blot analysis indicated that apoptosis was induced within 6 and 16 h, depending on the dose

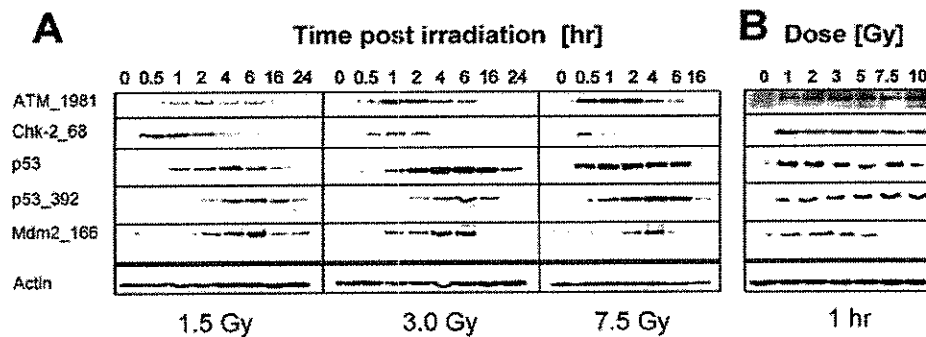


**Figure 1. Induction of apoptosis after gamma-irradiation.** MOLT-4 cells were irradiated by the doses of 1.5, 3.0, and 7.5 Gy and apoptosis was determined at the indicated times. A. Flow cytometric detection of apoptotic cells. Annexin V-positive cells were determined by APOFTEST (DakoCytomation), early apoptotic cells were measured as sub-G1 cells of DNA content analysis and late apoptotic cells were determined as APO2.7-positive ones. Each point represents the average of three independent experiments  $\pm$  S.E.M. B. Western blots analysis of lamin B. A 68-kDa nuclear protein is cleaved into a 48-kDa fragment when apoptosis is induced. Representative blots are shown.

of IR, since cleaved lamin B was detected 16 h after 1.5 Gy, and a small amount of the cleaved fragment could also be detected after 6 h after the doses of 3.0 or 7.5 Gy, respectively (Fig. 1B). Interestingly, after irradiation by the lethal dose of 7.5 Gy we did not find cleaved lamin B earlier than we did after the sublethal dose of 3.0 Gy, that is after 6 h, although this cleavage was more intense.

### Phosphorylation of ATM and Chk-2

In our experiments on MOLT-4 cells we found an increased amount of phosphorylated ATM (Ser-1981) as soon as 0.5 h after irradiation. This phosphorylation declined after 6 h after irradiation by the doses of 1.5 Gy, 3.0 or 7.5 Gy (Fig. 2A), i.e. just before the time when lamin B was cleaved and apoptosis was induced. After 0.5 h there was less active ATM after 1.5 or 3.0 Gy than after 7.5 Gy. Chk-2 was also found to be phosphorylated (Thr-68) within 0.5 h, but, unlike for ATM, its amount at that time was not affected by the dose. While the persistence of the phosphorylated form of ATM was the same (up to 6 h) after all the doses tested, phos-



**Figure 2.** Gamma-radiation induced phosphorylation of ATM and its downstream targets.

Representative Western blots are shown. A. MOLT-4 cells were irradiated by the doses of 1.5, 3.0, and 7.5 Gy and analysed at the times as indicated. IR induced rapid phosphorylation of ATM and Chk-2 with subsequent induction and phosphorylation of p53 and concomitant phosphorylation of Mdm2. These processes were followed by induction of apoptosis confirmed by detection of cleavage of lamin B (see Fig. 1B). B. MOLT-4 cells were irradiated by the doses as indicated and analysed 1 h after irradiation. Neither ATM nor its substrates exhibited a dose-dependent response. Only the amount of phosphorylated Mdm2 at Ser-166 was increased after the exposure to the doses up to 3 Gy, but after the dose of 5 Gy or higher it was decreased.

phorylation of Chk-2 (Thr-68) was detected up to 4, 2, and 1 h after 1.5, 3.0, and 7.5 Gy, respectively, and it preceded the accumulation of p53 (Fig. 2A). Although the amount of ATM after 0.5 h appeared to increase with an increasing dose, we did not observe any significant dose-dependence after 1 h after the exposure to the doses of 1–10 Gy, and also phosphorylation of Chk-2 did not exhibit a dose-dependent response 1 h post-irradiation (Fig. 2B).

#### Phosphorylation of p53

The p53 protein was up-regulated from 1 up to 16 h after the dose of 1.5 Gy with a maximum at 4 h. After the dose of 3.0 Gy the up-regulation of p53 was detectable from 1 to 24 h and it was more intense, with a maximum also at 4 h. The dose of 7.5 Gy induced p53 very rapidly and transiently (from 0.5 to 6 h) with a maximum within 1–2 h after irradiation (Fig. 2A). p53 was subsequently phosphorylated on Ser-392 beginning 2 h after the dose of 1.5 and 3.0 Gy, or 0.5 h after 7.5 Gy. The phosphorylation on Ser-392 persisted up to 16 h after irradiation by 1.5 and 3.0 Gy. After 7.5 Gy it declined after 6 h.

At the time of maximal phosphorylation of p53 we observed an increase in phosphorylated oncoprotein Mdm2 (Ser-166), i.e. from 4 to 6 h after the dose of 1.5 or 3.0 Gy, or from 2 to 4 h after 7.5 Gy (Fig. 2A).

Similarly to ATM and Chk-2, neither induction of p53 nor its phosphorylation on Ser-392 exhibited a dose-dependent response 1 h after the exposure to the doses of 1 to 10 Gy (Fig. 2B). All proteins analysed were up-regulated after 1 h after gamma irradiation, nevertheless none of them but Mdm2

exhibited a dose-dependent response. One hour after the exposure to doses up to 3 Gy the amount of Mdm2 phosphorylated on Ser-166 increased, however, after the dose of 5 Gy or higher we observed a decrease in Mdm2 phosphorylation (Fig. 2B), suggesting that not even this protein might be exploited as a biosimetric indicator.

#### DISCUSSION

MOLT-4 cells are derived from human T-cell leukemia, with immunophenotypic characteristics of thymocytes, expressing CD1<sup>+</sup> (49%), CD4<sup>+</sup> (55%), CD5<sup>+</sup> (72%), and CD7<sup>+</sup> (77%) (Greenberg *et al.*, 1988) and they are a suitable model system to study molecular mechanisms of gamma-radiation-induced apoptosis of T-lymphocytes. Work on p53-null mice has revealed that p53 protein is important for induction of apoptosis as a response of T-lymphocytes to DNA damage (Clarke *et al.*, 1993). Our results together with the work of other authors (Nakano & Shinohara, 1999; Nakano *et al.*, 2001) prove that in MOLT-4 cells accumulation of p53 precedes typical apoptotic changes, such as fragmentation of DNA (sub-G1 peak), changes in plasma membrane phospholipids (annexin V), loss of plasma membrane integrity and mitochondrial changes (APO2.7), and cleavage of nuclear structural proteins (lamin B).

Induction of apoptosis in MOLT-4 cells (p53 wt) after exposure to doses up to 10 Gy is faster than in HL-60 cells (promyelocytic leukemia, p53-null). MOLT-4 cells show a wide disparity in the time when apoptosis is induced after gamma irradiation. The cells die mostly by delayed apoptosis and by post-mitotic apoptosis. The results of our previ-

ous work show that the sub-G1 peak is not induced before 6 h after irradiation by doses up to 5 Gy. The cells accumulate mainly in S phase and less in G2 phase (not shown).

Figure 1A compares the percentage of apoptosis determined by three methods 24 h after irradiation — annexin V-positive, APO2.7-positive (without permeabilization) and sub-G1 cells. A comparison of these methods indicates that determination of annexin V-positive and APO2.7-positive cells shows approximately the same results (thus, 24 h after irradiation the plasma membrane of the majority of apoptotic cells was permeable). The third method, determination of sub-G1 cells, provides much different data. After the doses of 3.0 and 7.5 Gy we determined roughly the same fraction of early apoptotic cells, 15.1% and 18.4%, respectively. It seems that MOLT-4 cells quickly form apoptotic bodies, decompose and the flow-cytometer evaluates the resulting fragments as debris.

After 24 h almost all the cells irradiated by the dose of 7.5 Gy were APO2.7-positive (without permeabilization), their plasma membrane was permeable at that time and they were apoptotic. Endlich *et al.* (2000) reported that only 24% of MOLT-4 cells underwent apoptosis without attempting cell division after a dose of 4 Gy. Most of the cells did not die until 18 to 30 h, however, mitosis either failed or the division was aberrant. We noticed the beginning of apoptosis (according to cleavage of nuclear lamin B) 16 h after 1.5 Gy and after 6 h after 3.0 or 7.5 Gy, respectively. Endlich *et al.* (2000) observed that the apoptotic death process ended by formation of apoptotic bodies 36 to 60 h post-irradiation.

To date, the proteins that directly sense DNA damage in mammalian cells are largely unidentified and the mechanism by which these sensors transmit DNA damage recognition to ATM remains to be elucidated. Bakkenist and Kastan (2003) in their work on fibroblasts suggested that introduction of DSB causes a rapid change of a higher-order chromatin structure, and that this chromatin alteration initiates ATM activation. ATM responds primarily to DSB, whilst other forms of DNA damage, such as UV radiation-induced photoproducts and replication fork stalling signal through the ATM- and Rad3-related (ATR) kinases. Recent studies have demonstrated that ATM functions upstream of ATR following exposure to IR in S/G2 (Stiff *et al.*, 2006) and they both exhibit selective substrate specificity in response to different genotoxic agents (Helt *et al.*, 2005). In addition, Bekker-Jensen *et al.* (2006) have reported that ATM is spatially redistributed to DSB-flanking chromatin and ATR accumulates by single-stranded DNA. Two other kinases, Chk-1 and Chk-2, do not concentrate around the DNA damage sites but rapidly spread to the entire nucleus. Chk-1 and Chk-2

are structurally unrelated yet functionally overlapping serine/threonine kinases. Chk-1 is a labile protein, active even in unperturbed cell cycles, since it plays an important role in keeping Cdc25C prepared for responding to DNA damage by phosphorylating its Ser-216 during the S to M phase (Kaneko *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002). In contrast, Lukas *et al.* (2001) showed that Chk-2 is a relatively stable protein responding to gamma-radiation throughout the cell cycle and it appears to be inactive in the absence of DNA damage. Nevertheless, recent findings of specific target knockdowns (Xiao *et al.*, 2006) suggest that Chk-1 is the only checkpoint kinase relevant as a cancer drug target. Our study shows that MOLT-4 cells, having wt p53, exhibit the same response to gamma-irradiation as fibroblasts do, i.e. they phosphorylate ATM and Chk-2 quickly after irradiation.

We found ATM to be phosphorylated early after irradiation and this phosphorylation persisted 6 h. Later (after irradiation by all the doses tested) the amount of ATM decreased. This was due to the fact that ATM is degraded before DNA fragmentation in the later stages of apoptosis resulting in the predominance of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). This is consistent with the results of Mukherjee *et al.* (2006), who proved that H2A.X (one of the core histones phosphorylated by ATM within the first minutes after irradiation) is phosphorylated in the later stages of apoptosis solely by DNA-PK, while ATM is dispensable for this process. Matsuoka *et al.* (2000) showed on fibroblasts that phosphorylated ATM subsequently phosphorylates Chk-2 on Thr-68. Here we show that after 0.5 h the amount of active ATM after 1.5 or 3.0 Gy was significantly less than after 7.5 Gy, nevertheless, even that amount was sufficient to activate Chk-2, which was phosphorylated within 0.5 h too.

Exposure to IR causes damage to DNA in the form of DSBs. This immediately activates ATM, which is involved in the cell cycle regulation and DNA repair and further conducts the signal up to p53 protein. It is well known that p53 possesses protective functions, such as stimulation of nucleotide excision repair and induction of cell cycle arrest (*via* other gene products) that is needed in order to check and repair the DNA damage. In contrast to these protective properties, p53 has also been implicated in the induction of apoptosis in certain cell types following DNA damage (reviewed in Ljungman, 2000). Work of Nakano *et al.* (2001) and our previous work (Szkanderova *et al.*, 2003) showed the radiation-induced apoptosis in MOLT-4 cells to be fully p53-dependent.

Both ATM and Chk-2 contribute to the precise control of an important element of the cellular emergency team, the p53 protein. Acting as a transcription factor for a number of downstream genes

that mediate either cell cycle arrest or apoptosis, p53 plays a critical role in maintaining genomic integrity after cellular stress by preventing propagation of damaged DNA. Nakano *et al.* (1999) and Szkan-derova *et al.* (2003) suggested that the level of p53 must reach a threshold for the cells to undergo apoptosis.

Protein p53 was up-regulated after 1 h after irradiation by the cytostatic or the sublethal dose (1.5 and 3.0 Gy). The lethal dose (7.5 Gy) induced up-regulation of p53 very quickly (within 0.5 h, which was the time of activation of ATM and Chk-2). This rapidity reflects the emergency state in the cell after a large DNA insult and the need to urgently induce enough p53 to stop the cell cycle and to try to repair the damage or induce apoptosis.

But the up-regulated p53 does not function properly until post-translationally modified. The carboxyl terminus of p53 functions as an allosteric regulator. Phosphorylations on Ser-315 and Ser-392 localized within this domain enhance its sequence-specific DNA binding (Criswell *et al.*, 2003). Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates p53 on Ser-392, but Claudio *et al.* (2006) demonstrated that Cdk9 itself is capable of such phosphorylation independently of CK2. Sakaguchi *et al.* (1997) showed that phosphorylation of Ser-392 stabilizes the tetramer formation of p53 that is critical for p53's ability to activate transcription because it facilitates phosphorylation of the transactivation domain due to a more favourable conformation. In this study, we also demonstrated that p53 was phosphorylated on Ser-392 and this phosphorylated form persisted 16 h after the cytostatic or the sublethal dose and 6 h after the lethal one. We showed in our previous work (Szkan-derova *et al.*, 2003) that IR causes in MOLT-4 cells also phosphorylation on Ser-15 and both phosphorylations on Ser-392 and on Ser-15 show similar temporal patterns (they both decline after 6 h).

Whilst Bekker-Jensen *et al.* (2006) showed that U2OS human osteosarcoma cells treated with a DSB-generating insult (1–10 Gy) respond after 1 h by a homogeneous increase of phosphorylated p53 (Ser-15) throughout the entire nucleus, our experiments revealed no dose-dependent response of phosphorylation of p53 (Ser-392) 1 h after the exposure to the doses of 1 to 10 Gy (Fig. 2B).

Our results indicate that molecules involved in downstream pathways activated by ATM rather than ATM itself and its direct downstream targets would be suitable for biodosimetry in practice. ATM and its substrates might be used only in the low dose-range, although for reliable biodosimetry not a single one, but several biological indicators of the absorbed dose should be exploited.

We proved that MOLT-4 cells (p53 wt) respond to the IR-induced damage by phosphorylation

of ATM and Chk-2 (within 0.5 h after irradiation). We also proved that phosphorylation of p53 protein (2 h after irradiation) is accompanied by phosphorylation of its negative regulator, Mdm2 protein, which occurs concomitantly with maximal p53 phosphorylation.

#### Acknowledgement

The authors thank the Ministry of Defence of the Czech Republic for financial support (projects MO0FVZ0000501 and OBUKHK2005001).

#### REFERENCES

- Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF (2001) ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**: 969–974.
- Bakkenist C, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499–506.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* **173**: 195–206.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**: 1677–1679.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* **362**: 849–852.
- Claudio PP, Cui J, Ghafouri M, Mariano C, White MK, Safak M, Sheffield JB, Giordano A, Khalili K, Amiri S, Sawaya BE (2006) Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII. *J Cell Physiol* **208**: 602–612.
- Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA (2003) Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 5813–5827.
- Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC (2000) Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat Res* **1**: 36–48.
- Greenberg JM, Gonzalez-Sarmiento R, Arthur DC, Wilkowski CW, Streifel BJ, Kersey JH (1988) Immunophenotypic and cytogenetic analysis of Molt-3 and Molt-4: human T-lymphoid cell lines with rearrangement of chromosome 7. *Blood* **5**: 1755–1760.
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA (2005) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem* **280**: 1186–1192.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**: 25–27.
- Kaneko YS, Watanabe N, Morisaki H, Akita H, Fujimoto A, Tominaga K, Terasawa M, Tachibana A, Ikeda K, Nakanishi M (1999) Cell-cycle-dependent and ATM-in-

- dependent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* 18: 3673–3681.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD (2001) ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Diff* 8: 1052–1065.
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14973–14977.
- Kim ST, Lim DS, Canman, CE, Kastan MB (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274: 37538–37543.
- Lavin MF, Shiloh Y (1997) The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 15:177–202.
- Lavin MF, Khanna KK, Beamish H, Spring K, Watters D, Shiloh Y (1995) Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 20: 382–383.
- Ljungman M (2000) Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2: 208–225.
- Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB (2000) ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404: 613–617.
- Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2001) DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 61: 4990–4993.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10389–10394.
- Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: Role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15: 1067–1077.
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* 5: 575–590.
- Nakano H, Shinohara K (1999) Correlation between unirradiated cell TP53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 cells. *Radiat Res* 151: 686–693.
- Nakano H, Kohara M, Shinohara K (2001) Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 306: 101–106.
- Powers JT, Hong S, Mayhew CN, Rogers PM, Knudsen ES, Johnson DG (2004) E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 4: 203–214.
- Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D (1997) Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 36: 10117–10124.
- Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, O’driscoll M, Jeggo PA (2006) ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 25: 5775–5782.
- Szkanderova S, Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Pavlova S, Smardova J, Stulik J (2003) Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol (Prague)* 49: 191–196.
- Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, Lane WS, Kastan MB, D’Andrea AD (2002) Convergence of the Fanconi anemia and Ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109: 459–472.
- Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Psutka J (2004) Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res* 53: 335–342.
- Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J (2002) SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 16: 571–582.
- Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Zhang H (2006) Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 8: 1935–1943.
- Xu B, Kim ST, Kastan MB (2001) Involvement of Brca1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21: 3445–3450.
- Xu B, O’Donnell AM, Kim ST, Kastan MB (2002) Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 62: 4588–4591.
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14795–14800.

### **10.3 Příloha 3 (Tichý, 2006)**

Tichý A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta Medica* (Hradec Králové) 2006; **49**: 13-18. Review.



## APOPTOTIC MACHINERY: THE BCL-2 FAMILY PROTEINS IN THE ROLE OF INSPECTORS AND SUPERINTENDENTS

*Aleš Tichý*

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

**Summary:** Programmed cell death, apoptosis, plays an integral role in a variety of biological events, e.g. morphogenesis, removal of unwanted or harmful cells, tissue homeostasis etc. Members of the Bcl-2 family have been described as the key players in the regulation of the apoptotic process. This family consists of proteins that prevent apoptosis (Bcl-2-like) and two structurally distinct subgroups (Bax-like and BH3-only) that on the contrary promote cell death. Majority of their response is concentrated to the mitochondrial level. In this paper, besides reviewing some new information in this field we focused on how they interact among each other and on the way they sense and influence the death signals from the environment. Here, we compare Bcl-2 family to inspectors and superintendents since they supervise the manufacturing process of cell death and they determine whether the cell will die or it will resist and survive.

**Key words:** Apoptosis, Bcl-2 family proteins, Mitochondria, Caspases

### Introduction

Programmed cell death or apoptosis is a process of self-destruction with distinctive morphological features, which is important to embryonic development, maintenance of homeostasis, and pathogenesis of many diseases (48,50). Apoptosis is like a cellular death producing manufactory with a number of employees. Many workers such as caspase enzymes execute the job of the killers but it is up to the officers, who control the production and the managers who integrate the communication within the factory to decide whether the cell machinery will stop or continue working. One of these managers and officers are proteins of Bcl-2 family.

To understand properly the particular functions of Bcl-2 proteins we shall primarily describe from where the death signal comes from, how is it mediated and executed and then how Bcl-2 proteins affect it.

### 1. Triggering the programmed death

A great number of death stimuli might trigger a programmed cell death. They can induce a death signal, which further expands by at least two caspase-dependent signaling pathways. The death receptor pathway is usually discussed as the first one. Members of TNF (Tumour Necrosis Factor) super family trigger apoptosis extracellularly. The second pathway is called mitochondrial.

#### 1.1 Death receptor pathway

TNF-like members such as TNF $\alpha$ , TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), FasL (also called CD95L) and TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) also designated as death ligands (25) bind to specific death receptors (DR) integrated in cytoplasmic membrane, thus inducing DR trimerisation. This causes a recruitment of adaptor proteins TRADD (TNF-Receptor-1 Associated Death Domain) and/or FADD (Fas-Associated Death Domain), which happens via 70-80 amino acid interaction motifs, called the death domain. TRADD and FADD contain another motif, called the death effector domain (DED) which recruits an immature protease, procaspase-8 (see below), leading to the formation of the death inducing signaling complex (DISC).

##### 1.1.1 Caspase family

An essential step in the execution phase of the apoptotic death program involves the sequential cleavage and activation of a hierarchical cascade of cystein-aspartate proteases, caspases, which are the key workers of the apoptotic machinery.

They are minimally activated in the healthy cells being synthesized as zymogens, which need further enzymatic activation at specific aspartate residues to fulfil their function. Caspases can be classified as the initiators of apoptosis, including so-called apical or upstream caspase-2, -8, -9, -10 and, probably, -11 and the executioners of apoptosis

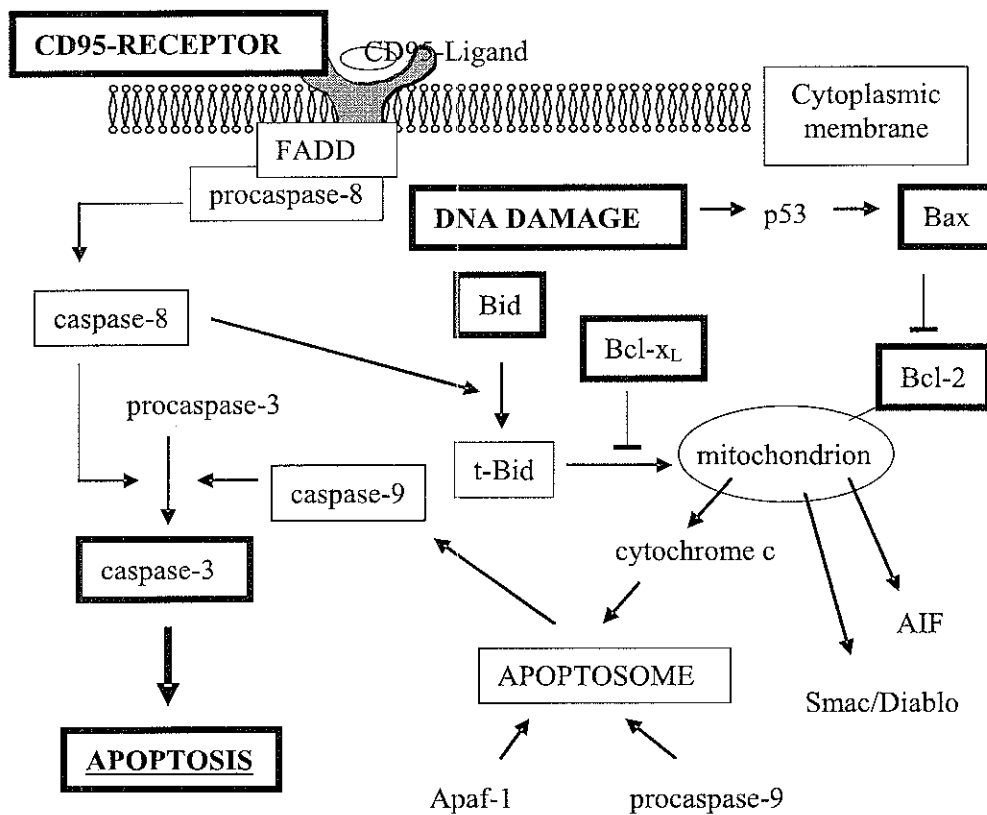
(downstream caspases), which are caspase-3, -6 and -7 (35). The initiator caspases appear at the beginning of the death signal pathway and they are characterised by presence of an extended N-terminal caspase recruitment domain (CARD) or DED (see above). In order to be activated caspases bind by these domains to the specific scaffold or adaptor proteins (e.g. TRADD, FADD) whose task is to ensure close proximity permitting proteolytical auto processing of molecules of procaspases (39).

Effector caspases or executioners of apoptosis, in turn, do that crucial job and cleave the vital cellular substrates and they are responsible for the nucleus breakdown and characteristic morphological and biochemical features of apoptosis (formation of apoptotic bodies, exposure of phosphatidylserine at the surface of the cytoplasmic membrane as a signal to macrophages for subsequent phagocytosis etc.).

By the proteolytic cleavage in DISC procaspase-8 becomes the mature initiator caspase-8 that transmits and amplifies the death-inducing signal to other downstream executioner caspases such as caspase-3, -6 and -7.

In contrast to mitochondrial pathway, the death receptor pathway is out of control of Bcl-2 family proteins, although the simple model of TNF-like members-mediated apoptosis is complicated by the existence of an amplification loop in cases of low initial caspase-8 activation. In this scenario, caspase-8 activates the pro-apoptotic BH3-only protein Bid that translocates to mitochondria and induces cytochrome c release (3); see Activation of BH3-only death factors.

Receptor pathway can be inhibited by the caspase-8 homologue FLIP which contains its own DED and it can interact with adaptor proteins but it can not transmit the death signal because it is not capable of cleavage of other caspases (29). Alternatively, a competitive inhibition might



**Fig. 1:** Schematic model of apoptotic signalling pathways leading to activation of caspase-3. In the death receptor pathway plays the key role caspase-8, which is activated in the death inducing signalling complex localized near the cytoplasmic membrane. Mature caspase-8 then cleaves either procaspase-3 or (in the case of its low activation) Bid (22 kDa) into t-Bid (15 kDa). t-Bid translocates to mitochondria where it induces changes of mitochondrial membrane with subsequent release of cytochrome c. The mitochondrial pathway is under control of Bcl-2 proteins. The activation of Bax-like proteins leads as well to mitochondrial membrane permeabilization. Bcl-2-like survival factors block these events by binding Bax-like and BH3-only proteins either from mitochondria or ER. The release of cytochrome c later results in activation of caspase-9, which together with caspase-8 activates the main executioner of apoptosis, caspase-3. For more details see text (according to 18).

appear as an action of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), which compete with caspases at the active sites of their substrates (43).

### 1.2 Mitochondrial pathway

Several death receptor-independent apoptotic stimuli can contribute to triggering mitochondrial pathway: UV- and  $\gamma$ -irradiation, chemotherapeutic drugs, viruses, bacteria, withdrawal of cytokines, neutrophins and growth factors or anoikis – detachment from the extracellular matrix (5). As Scaffidi et al. (42) reported, under certain circumstances (especially in some so-called type II cells) TNF-like factors can also trigger mitochondrial pathway in order to amplify the death signal in the case that caspase-8 is minimally activated (see Activation of BH3-only death factors).

Each of these stimuli targets certain cellular components and transmits the death signal up to mitochondria. We still know little about the exact mechanism, but mitochondria must play a central role in this pathway, since it is sure that the outer membrane gets permeable for some proteins of the mitochondrial intermembrane space, which further plays a crucial role in activation of the main downstream caspases. It is cytochrome c, which is probably the most important protein involved. When cytochrome c is released from mitochondria it binds WD-40 repeats of another protein, Apaf-1, thus triggering its ATP-dependent oligomerization and formation of so-called apoptosome, a large apoptosomal complex of 1.4 MDa. This complex recruits procaspase-9 and allosterically enhances (by about 1000-fold) its activity, which leads to effective cleavage of caspase-3 and caspase-7 (40).

Bcl-2 family members do not control only the release of cytochrome c from the outer mitochondrial membrane, but also almost 30 other proteins (33). One of them is the “Second mitochondria-derived activator of caspase” (Smac) and serine protease Htr2A/Omi whose task is to ensure apoptosome formation by triggering sequestration and/or degradation of cytosolic proteins – inhibitors of apoptosis (IAPs) – preventing their caspase inhibitory function (49). Anyway, the most important regulators of mitochondrial apoptotic pathway are Bcl-2 proteins. How do they influence mitochondria and what is the mode of their action?

## 2. Bcl-2 protein family

In higher eukaryotes this family involves up to 30 homologues that can have absolutely different impact on the cell fate by promoting or inhibiting apoptosis depending on their structural features. These features are Bcl-2 homology (BH) domains being highly conserved throughout this family. The pro-survival proteins contain BH1, BH2, BH3 and BH4 domain, whereas the pro-death members have, at least, a BH3 domain (17). The Bcl-2 family classification derives from homologues encoded in *Caenorhabditis elegans*, a nematode on which the first apoptotic studies were performed.

Bcl-2 proteins can be grouped in three categories: (i) Bcl-2-like survival factors such as Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Dival/Bcl-2-L-10 and Bcl-B; (ii) pro-apoptotic BH3-only death factors such as Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim<sub>L</sub>/Bod, Bad, Bid, Noxa, PUMA/Bbc3 and Bmf; and (iii) pro-apoptotic Bax-like factors Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-x<sub>s</sub> and *Drosophila* DEBCL, a subgroup not presented in *C. elegans* (5).

### 2.1 Bcl-2-like survival factors

Every Bcl-2 like survival factor contains three to four homology domains (BH1–BH4). The BH1–BH3 domains form the hydrophobic pocket and the N-terminal BH4 domain stabilizes the protein structure from the backside (2). Since Petros et al. (34) referred about the NMR structure of Bcl-x<sub>L</sub> complex with the BH3 domain of the death factors Bak and Bad, we know that BH3 domain is a random coil when free in solution, but it adopts an amphiphatic  $\alpha$ -helix when completed with another protein member. Therefore it just fits into the hydrophobic pocket, thus forming a heterodi/oligomer.

However, there are reports indicating that mode of action of Bcl-like survival factors is tricky and more complex. First, BH3 domains are not available for binding in all proteins at all times needing a post-translation modification and/or a conformational change (41; see Bax-like and BH3-only death factors below). Second, a plenty of proteins (such as R-Ras, Raf-1, calcineurin, Bap31, BAG-1/Hsc70 or p53 binding protein – p53BP-2) without BH3 domain were shown to bind Bcl-2 survival factors (38). Third, solution of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> structure revealed surprising structural homology with bacterial pore-forming toxins such as colchicin and diphtheria toxin (2, 34), so it is likely that Bcl-2-like proteins use part of the hydrophobic pocket for other purposes than binding, namely for formation of ion- or protein-conducting channels (45). Finally, Bcl-2 was shown to prevent lipid peroxidation by scavenging oxygen radicals functioning as an antioxidant (19) or by inhibition of caspases involved in production of oxygen radicals. In addition, we also have to consider regulatory effects of proteins that are not presented under *in vitro* binding conditions.

Briefly, Bcl-2-like survival factors tail-anchored in intracellular membranes (mitochondrial, nuclear, endoplasmic reticulum) can scavenge pro-apoptotic death factors (and even some BH3-lacking proteins) and in contrast to the death factors they do so without any major change in conformation or subcellular localization (5).

### 2.2 Bax-like death factors

This subgroup consists of four members. The first one isolated was named Bax for Bcl-2-associated protein X, since it immunoprecipitated together with Bcl-2 and blocked its survival activity when co-expressed (31). Two other homologues were isolated in mammals, Bak and Bok/Mtd (16, 20) and one in *Drosophila*, Drob/dBorg/DEBCL (7,11).

Bax-like death factors comprise BH1–BH3 domains and their pro-apoptotic behaviour was originally associated with the lack of stabilizing BH4 domain as its absence could unfold the hydrophobic pocket and trigger conformational changes conferring pro-apoptotic activity. Nevertheless, there are some cellular proteins such as Mcl-1 or A1 and all viral homologues lacking BH4 region and they are potent cell survival and not death factors (1). Moreover, Bcl-x<sub>L</sub> lacks BH1 and BH2 but retains BH4 and possesses pro-survival activity (4).

### 2.2.1 Mitochondrial targeting

The diversity of the BH3-region helix seems to be crucial for mitochondrial targeting and later pro-apoptotic activity. It is less packed to the hydrophobic pocket in Bax than in Bcl-x<sub>L</sub> and therefore more available for binding to the hydrophobic grooves of Bcl-2-like survival factors (41). Another difference consists in the fact that hydrophobic membrane-anchoring C-terminus ( $\alpha 9$ ) of Bcl-2 is exposed immediately after proteosynthesis and needs to be targeted to membranes instantly in order to prevent clustering and precipitation. On the other hand,  $\alpha 9$  terminus of molecule of Bax is folded back in the hydrophobic groove and therefore it is protected from binding to membranes as well as to other proteins (30) at least until  $\alpha 9$  is exposed.

Mitochondrial targeting of Bax is determined by some yet unknown protein or post-translational modification that uncovers  $\alpha 9$ , but we still do not fully understand the mechanism of membrane targeting, insertion, oligomerization and channel formation on molecular level. One model proposes that Bax is weakly attached to mitochondrial membrane, with intact hydrophobic pocket and it is kept inactive by an unknown inhibitory protein or by a specific lipid. Another model involves conformational changes and exposure of BH3 domain which enables either Bcl-2-like factors inhibition of Bax and cell survival upon death signal or stable membrane insertion of Bax, oligomerization and/or interaction with VDAC/ANT (voltage-dependent anion channel, adenosine nucleotide transporter). Subsequent pore or channel formation releases cytochrome c and triggers caspase cascade (5).

### 2.2.2 Mode of action of Bax-like death factors is not fully elucidated

Mitochondria have been the focus of the majority of studies aimed at explaining the role of the Bcl-2 family in cell death. Evidences for such a role are: loss of mitochondrial potential and release of pro-apoptotic factors including cytochrome c, AIF and caspase activation upon disruption of mitochondrial membrane (17) which probably involves channel formation and its opening rather than membrane rupture. It is not clear whether Bax directly forms a channel or interacts with a pre-existing one. Even number of investigators (32,28,44) has not found an importance of PT pore for the cytochrome c-releasing activity of Bax. On the other hand, such a channel might be permeability transi-

tion (PT) pore whose main components are voltage-dependent anion channel (VDAC) in the outer membrane, adenosine nucleotide transporter (ANT) in the inner membrane and cyclophilin D in the matrix. This channel allows passage of molecules up to 1.5 kDa, therefore one hypothesis is that Bax would interact with PT pore increasing its size. Then even higher molecular weight molecules (up to 15 kDa) as cytochrome c can pass through (54).

In summary, Bax-like death factors either form channels or interact with channel-forming proteins, and as Korsmeyer (21) proposed, Bcl-2 survival factors (tail-anchored to different intracellular membranes) sequester Bax-like factors, thus co-working like a survival/death rheostat. Nevertheless, the exact mode of the Bax-like death factors action stays controversial.

### 2.3 BH3-only death factors

The BH3-only death factors share only the short BH3 domain with each other and with the rest of the Bcl-2 family. They function as mediators of death signalling and sensors for cellular integrity (e.g. Bim for cytoskeleton integrity, Bad for growth factor withdrawal and Bid as a sensor for death receptor pathway signalling; see below). BH3-onlies are kept in an inert state preventing inappropriate cell death and one or several of the following mechanisms activate them.

#### 2.3.1 Activation of BH3-only death factors

Each of mammalian BH3-onlies is regulated differently, depending on the nature of the protein and the origin of apoptotic stimulus. One mechanism is transcriptional induction. For example p53 is a transcription factor that induces PUMA/Bbc3 and Noxa after DNA damage affected by chemotherapeutics, UV- and  $\gamma$ -irradiation (22).

Cytokine or growth factor withdrawal, anoikis and death receptor ligation induce a second possible way of BH3-onlies activation – post-translational modification – phosphorylation/dephosphorylation. For instance, phosphorylated Bad is inactive and sequestered in cytoplasm by binding to 14-3-3 scaffold protein (55). Dephosphorylation of Bad processed by calcineurin (51) makes Bad free and available for interaction with Bcl-2-like survival factors, thus triggering apoptosis.

Another mechanism is based on proteolysis; it involves Bid when the death receptor pathway is not fully activated. Active caspase-8 cleaves Bid (22 kDa) into a truncated fragment, tBid (15 kDa), thereby exposing a binding site for N-myristoylation (56), which together with its high affinity to mitochondrial cardiolipin (26) causes targeting of tBid to mitochondria (24). tBid seems to change lipid composition of the outer mitochondrial membrane (15), making it more permeable during apoptosis. Besides that, tBid is able to release Bax-like factors from Bcl-2-like factors as well as to stimulate oligomerization and membrane insertion of Bax and Bak (14,52). Pro-apoptotic role of Bid is undeniable, but probably cell-type dependent (53). Moreover, Bid

can be cleaved also by other caspases (24) and even by non-caspase proteases e.g. cathepsin B (46), but so far this often occurs after mitochondria perforation and probably serves as a positive feedback loop.

Lastly, BH3-onlies are bound in the inactive state to the important macromolecular structures such as microtubules being placed as the stress sensors that are released after apoptotic stimuli. For instance, Bim is bound to a light chain of dynein motor complex on microtubules. Taxol, a microtubule-polymerising drug, can trigger the release of Bim and its association with Bcl-2/ Bcl-X<sub>L</sub> (36).

In summary, once BH3-onlies are post/translationally activated, they interplay with Bcl-2-like survival factors. They inactivate Bcl-2-like survival factors that restrict Bax-like death factors oligomerization. These free pro-apoptotic factors undergo conformational changes, subsequently disturb the outer mitochondrial membrane and release caspase-activating and other pro-apoptotic factors (23).

### 3. Conclusion: Bcl-2 inspectors and superintendents

In the cell death producing machinery Bcl-2 family proteins are working on the very important posts. The fact that they exist as inactive conformers needing activation by death signals suggests that members of this family are strategically positioned within the cell (just like the inspectors) to record damage at the specific sites and to rapidly converge diverse cell injuries on the common apoptotic pathway (8). In mammals, the execution of the most of so-called "death orders" takes place by the central part of the manufactory - the mitochondrion. This is the target of the Bcl-2 family proteins, the mediators of apoptosis. Their major function is to directly control the outer mitochondrial membrane permeability and subsequent release of several pro-apoptogenic factors (cytochrome c, Smac etc.) although the exact mechanism is still to be determined.

Subcellular distribution of Bcl-2 family proteins no doubt plays a crucial role in their ability to regulate apoptosis. Some of these superintendents (Bcl-2) are also localized on endoplasmic reticulum serving as a first line of defence against apoptotic signals (5). They sequester pro-apoptotic proteins keeping them away from their site of action (the mitochondria). On the other hand, Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> on the mitochondria inhibit the death factors that have already accumulated there (47) functioning as a second defence line.

### 4. Outlook

Recent genetic and biochemical studies (6,10,37) showed that Bcl-2 proteins act in coordinated and interdependent manner, since Bax- and Bak-like pro-apoptotic proteins are not able to execute death in the cells where BH3-only proteins have not been activated in response to the stress stimuli. Despite of increasing number of publications and new

findings about the interactions among Bcl-2 family proteins we are still far from full understanding the complexity of the controlling pathways. Basically, BH3-only proteins (activated via one of the mechanisms mentioned above) can act through Bcl-2 and Bax subfamilies because they contain the binding site for BH3-only proteins (the hydrophobic pocket). However, this fact contradicts a variety of recent findings, which might be misleading. Most of the contemporary studies have been done with over expressed proteins and the binding affinities among particular Bcl-2 proteins have not been determined yet. Therefore, we can hardly say which interactions might occur under the physiological conditions. Hence, only some general models of the mode of the Bcl-2 family action can be proposed.

We are still dealing with the questions like what mechanisms induce the loss of mitochondrial integrity, how the intramitochondrial proteins are released, what role plays calcium in this process etc. Answering such questions will surely help us to find new therapeutic attitudes (9,12,27) and it would be probably of great implications because physiological apoptosis is essential for healthy development and homeostasis of mammals.

Dysregulation of programmed cell death leads to various diseases in humans, including cancer, certain neurodegenerative diseases etc. For example, failure to remove autoimmune cells (that arise during development or that develop as a result of somatic mutation during an immune response) can result in autoimmune diseases or (in the case of damaged or mutant cells) in cancer. Therefore compounds that block survival and activate pro-apoptotic proteins as recently discovered BH3-mimetics (13) could offer a new way to treat cancer and other diseases. This way would be targeted at Bcl-2 proteins family but a lot of further work in this field is needed.

#### Acknowledgement

Thanks are due to Professor Jirina Vavrova and Assoc. Professor Jaroslav Cerman for helpful discussion and critically reading this review and their encouragement to write this paper. Supported by project MSM 0021620820, Ministry of Education, Czech Republic.

#### References

1. Adams JA, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
2. Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishbashi Y, Ohta S and Morikawa K. Crystal structure of rat Bcl-x<sub>L</sub>: implications for the functions of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem* 1997;272:27886-92.
3. Belka C, Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 2002;78(8):643-58.
4. Boise LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE et al. Bcl-x, Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
5. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immun* 2003;39:615-47.
6. Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionary conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Science* 2002;115:1567-74.
7. Brachmann CB, Jassim OW, Waschmuth BD, Cagan RL. The drosophila Bcl-2 family member dBorg1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation. *Curr Biol* 2000;10:547-50.

8. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7(3):249-57.
9. Cerman J, Čáp J, Marcková M et al. The role of apoptosis in pituitary adenomas in the field of conventionally used therapeutic approaches. *Annals NY Acad Sci* 2003;1010:520-4.
10. Cheng EH, Wei MC, Weiler S et al. Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> sequester BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001;8:705-11.
11. Colussi PA, Quinn LM, Huang DC et al. Debel, proapoptotic Bcl-2 homologue is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *J Cell Biol* 2000;148:703-14.
12. Červinka M, Cerman J, Rudolf E. Apoptosis in Hep-2 cells treated with etoposide and colchicine. *Cancer Detect Prev* 2004;28:214-26.
13. Degtarev A, Lugovskoy A, Cardone M et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-x<sub>L</sub>. *Nat Cell Biol* 2001;3(2):173-82.
14. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Monnetssuit S, Lauper S. Phosphorylation of Bid by casein kinase I and II regulates its cleavage by caspase-8. *Mol Cell* 1999;8:601-11.
15. Esposti MD. Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer protein. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:331-40.
16. Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:45-9.
17. Fridman JS, Parsels J, Rehemtulla A, Maybaum J. Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-XS. *J Biol Chem* 2001;276:4205-10.
18. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
19. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
20. Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merry A, Chen S. Mid, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>. *J Biol Chem* 1998;273:8705-10.
21. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879-86.
22. Lakin ND, Jacsok SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999;18:7644-55.
23. Letai A, Bassik M, Walensky L, Sorcinelli M, Weiler S, Korsmeyer S. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183-92.
24. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
25. Locksley RM, Killeen M, Lenardo MJ. The TNF and TNF superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
26. Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie X, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2000;2:754-61.
27. Marcková M, Čáp J, Vokurková D, Cerman J. Effect of therapeutic doses of ionising radiation on the somatomammotroph pituitary cell line, GH3. *Endocrine J* 2003;50:621-8.
28. Marzo I, Brenner C, Zamzami N et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998;187(8):1261-71.
29. Medema JP, Scalfidi C, Kischkel FC et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signalling complex (DISC). *EMBO J* 1997;16:2794-804.
30. Nechushtan A, Smith CL, Hsu Y-T, Youle RJ. Confirmation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999;18:2330-41.
31. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
32. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcineviciute A, Hoek JB, Farber JL. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1999;274(44):31734-9.
33. Patterson SD, Spahr CS, Daugas E et al. Mass spectrophotometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* 2000;7:137-44.
34. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG et al. Solution structure of the anti-apoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;98:3012-7.
35. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death *J Cell Mol Med* 2004;8(4):432-44.
36. Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with dynein motor complex. *Mol Cell* 1999;3:287-96.
37. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 2002;109(suppl):S97-107.
38. Reed J. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17:3225-36.
39. Robertson JD, Enoksson M, Suomella M, Zhivotovskiy B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:29803-9.
40. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999;13:3179-84.
41. Sattler M, Liang H, Nettesheim D et al. Structure of Bcl-x<sub>L</sub>-Bak peptide complex: recognition between regulators and apoptosis. *Science* 1997;275:983-6.
42. Scalfidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-87.
43. Shi Z. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-70.
44. Shimizu S, Tsujimoto Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(2):577-82.
45. Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC. Ion channel activity of the BH3-only Bcl-2 family member, Bid. *J Biol Chem* 1999;274:21932-6.
46. Stoka V, Turk B, Schendel SL et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases is the most likely route. *J Biol Chem* 2001;276:3149-57.
47. Thomenius MJ, Clark WD. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J Cell Science* 2003;116:4493-9.
48. Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
49. Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002;9:20-6.
50. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.
51. Wang HG, Pathan N, Ethell IM et al. Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science* 1999;284:339-43.
52. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK et al. tBid, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes Bak to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000;14:2060-71.
53. Yin XM, Wang K, Gross A et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *1999;400(6747):886-91.*
54. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67-71.
55. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist Bid in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x<sub>L</sub>. *Cell* 1996;87:619-28.
56. Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. Post-translational N-myristoylation of Bid as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 2000;290:1761-5.

Submitted July 2005.  
Accepted March 2006.

*Mgr. Aleš Tichý,*  
*Charles University in Prague,*  
*Faculty of Medicine in Hradec Králové,*  
*Department of Medical Biochemistry,*  
*Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové,*  
*Czech Republic.*  
*e-mail: tichya@lfhk.cuni.cz*

#### **10.4 Příloha 4 (Řezáčová et al., 2008)**

Řezáčová M, Tichý A, Vávrová J, Vokurková D, Lukášová E. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? *Leukemia Research* 2008; přijato k tisku.



# Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4?

Martina Řezáčová<sup>a,\*</sup>, Aleš Tichý<sup>b</sup>, Jiřina Vávrová<sup>b</sup>,  
Doris Vokurková<sup>c</sup>, Emílie Lukášová<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, 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 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>d</sup> Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Czech Republic

Received 14 September 2007; received in revised form 11 December 2007; accepted 20 December 2007

## Abstract

Mutations in NBS1 gene are related to higher occurrence of malignancies. In this work we studied response of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4 to ionizing radiation. We detected IRIF (ionizing radiation forming foci) containing histone  $\gamma$ H2A.X, protein 53BP1, and Nbs1, which were formed around double-strand breaks of DNA. We found dose-dependent increase in foci number (colocalization of  $\gamma$ H2A.X and 53BP1) and  $\gamma$ H2A.X amount (integral optical density) 1 h after irradiation. After dose of 1.5 Gy the number of foci decreases with time, but 72 h after irradiation 9% of live cells still contained big foci around unrepaired DNA damage. Western blot method revealed massive phosphorylation of H2A.X during apoptosis induction, 6–24 h after irradiation by doses 1.5 and 3 Gy. Cells with apoptotic morphology showed strong phosphorylation of H2A.X, but it was not accompanied by 53BP1.

1 h after irradiation by lethal doses 5 and 10 Gy we detected by Western blot a decrease in repair proteins Mre11, Rad50, and Nbs1. While phosphorylation of H2A.X 1 h after irradiation was detected by both confocal microscopy and Western blot, phosphorylation of Nbs1 on serine 343 was not detectable in MOLT-4 cells. Despite functional ATM and p53 the phosphorylation of Nbs1 on serine 343 was impaired in these cells, and might be responsible for high radiosensitivity of MOLT-4 cells.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** MOLT-4; Leukemia; Radiation; Nbs1; DNA repair; H2A.X; Phosphorylation

## 1. Introduction

Double-strand breaks of DNA (DSB) are the deadliest DNA lesions resulting from the exposure to ionizing radiation (IR) and also as an unavoidable consequence of stochastic errors during DNA replication [1]. The DNA damage response network involves parallel modulation of a wide array of signaling pathways, including lesion processing and repair, activation of cell cycle checkpoints, apoptotic pathway, and many less characterized stress signals [2,3]. Very

early event in response to irradiation is formation of IR induced foci (IRIF), dynamic microscopically discernible structures containing thousands of copies of proteins involved in various aspects of DSB metabolism. IRIF can be used as a marker of DSB localization [4–6]. Bekker-Jensen et al. [7] proved that DSB flanking chromatin marked by  $\gamma$ H2A.X (histone H2A.X phosphorylated on serine 139) is occupied by ATM kinase, Mdc1 and 53BP1. BRCA1 and proteins of MRN complex (Mre11-Rad50-Nbs1) also react with this compartment. Other proteins related to DNA repair are not stably accumulated in the IRIF (Chk1, Chk2, Ku70, Sms1, Smc3, DNA-PK). Checkpoint effectors such as p53 and Cdc25c are not located at the site of DSB at all [7].

\* Corresponding author. Tel.: +420 495 816 166; fax: +420 495 512 715.  
E-mail address: rezacovam@lfhk.cuni.cz (M. Řezáčová).



Human T-lymphocyte leukemia and lymphoma cells greatly differ in their radiosensitivity. An important factor affecting sensitivity to DNA-damaging agents, such as IR, is the ability to repair sublethal damage. It has been reported by Uckun et al. [8] that 37% of isolated T-cell-derived acute lymphoblastic leukemia cells have the ability to repair radiation-induced damage, and their survival curves showed a significant shoulder. Also main agent responsible for adult T-cell leukemia – T-cell leukemia virus – reduces expression of DNA-repair genes Rad51, XRCC1, Ung1 and RPA [9].

T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4, used in our study, are immunophenotypically similar to thymocytes as to the expression of CD1–CD8: they are CD1<sup>+</sup> (49%), CD4<sup>+</sup> (55%), CD5<sup>+</sup> (72%) and CD7<sup>+</sup> (77%) [10]. MOLT-4 cells are very sensitive to IR, similarly as pre-T-lymphoma cells HSB-2. On the other hand, frequently used T-lymphoma cells CEM and Jurkat are much more radioresistant. While CEM and Jurkat cells do not express functional p53 and undergo apoptosis after cell cycle arrest in G2/M phase [11,12], apoptosis of MOLT-4 cells is fully p53 dependent [13,14]. In response to irradiation by the dose of 4 Gy, only 24% of MOLT-4 cells die by quick apoptosis without previous aberrant mitosis, majority of the cells die 18–30 h after irradiation after aberrant mitosis. The process results in formation of apoptotic bodies and cell collapse 36–40 h after irradiation [15].

In our previous study [16] we found that MOLT-4 cells have limited capacity to repair DNA damage during low dose-rate (3.9 mGy/min) irradiation, as the  $D_0$  value did not substantially changed with dose-rate (0.87 Gy for 600 mGy/min, 0.78 Gy for 3.9 mGy/min). One of the most important regulatory pathways activated in response to DSB is autophosphorylation of ATM kinase [17] and its downstream processes. ATM kinase at MOLT-4 cells is phosphorylated on serine 1981 within 30 min after irradiation by the dose of 1.5 Gy, consequently Chk2 is phosphorylated on threonine 68 [18]. The activated kinases then phosphorylate p53 on serine 392 and serine 15 [14]. Activation of p53 negative regulator Mdm2 was also detected [18].

MRN complex is crucial in repair of radiation damage and checkpoint signaling. Patients suffering from mutations in NBS1 (Nijmegen breakage syndrome, NBS), similarly to patients with dysfunctional ATM kinase (ataxia-telangiectasia) are extremely radiosensitive, cannot repair radiation-induced damage [19,20] and have many other similar defects, mainly immunodeficiency, partial body degeneration and higher risk of cancer. At 90% of patients with NBS deletion of 5 nucleotides in exon 6 of NSB1 (657del5) was described [21]. NBS patients have high predisposition to lymphoid malignancy [22]. NBS patients, who are homozygous, having mutation in both NSB1 alleles show a characteristic predominance for malignant lymphoproliferative disorders, i.e. 22/25 patients suffered from lymphoma [23]. Incidence of heterozygous carriers of 657del5 mutation of NBS1 gene is low in healthy population (Slavic popu-

lation 0.5%, German population 0.1%) [24]. Chryanowska et al. [25] studied mutation 657del5 of NBS1 and found it in 3 of 270 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and in 2 of 212 patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL). ALL is the most common malignant disorder in childhood. 20–25% of children with ALL suffer a relapse. Varon et al. [26] analyzed mutations in NBS1 in children patients with first relaps of ALL and found 4 different mutations of NBS1 gene in 15% of patients. Resnick et al. [24] found in group of 68 pediatric patients with lymphoid malignancies 657del5 mutation in two children, one with ALL, second with NHL. Several relatives of the second patient, who were carriers of the same mutation, had cancer (ALL, breast cancer, GI cancer). The authors presume, that mutations in NBS1 increase predisposition to malignancies.

In this study we evaluated changes of proteins related to DNA damage recognition (H2A.X) and repair (MRN complex) and phosphorylation of Nbs1 on serine 343 at MOLT-4 cells exposed to IR.

## 2. Material and methods

### 2.1. 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.

### 2.2. 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) and irradiated using a <sup>60</sup>Co gamma-ray source with a dose-rate of 1 Gy/min. After irradiation the flasks have been placed in the incubator and the aliquots of the cells have been removed at various times after irradiation for analysis.

### 2.3. Flow-cytometric analysis and apoptosis detection

For apoptosis detection we used Apoptest-FITC kit (Dako-Cytomation, 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, Hiialeah, 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).

#### 2.4. 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 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.

#### 2.5. Immunocytochemistry

The cells were fixed with 4% freshly prepared paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT), washed in PBS, permeabilized in 0.2% Triton X-100/PBS for 15 min at RT, and washed in PBS. 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 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 and Nbs1 mouse monoclonal anti-phospho-histone H2A.X and mouse monoclonal anti-Nbs1 (Upstate) and for detection of 53BP1 rabbit polyclonal antibody and rabbit polyclonal Nbs1-phospho S343 (Cell Signaling) 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  $\times$  5 min) in PBS. Counterstaining was performed by TO-PRO-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).

#### 2.6. Western blotting

MOLT-4 cells were washed with a PBS at various times after irradiation. 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 (rabbit polyclonal antibody gamma H2A.X, rabbit polyclonal antibody Nbs1-phospho S343 and rabbit monoclonal antibody Mre11 from Cell Signaling, mouse monoclonal anti-Nbs1 from Upstate, mouse monoclonal anti actin beta and rabbit polyclonal antibody anti Rad50 from Sigma) at 4 °C overnight. After washing, the blots were incubated with secondary antibody (DakoCytomation) and the signal was developed with a chemiluminescence detection kit (Boehringer).

### 3. Results

#### 3.1. Apoptosis

MOLT-4 cells were very sensitive to the effect of IR of  $^{60}\text{Co}$  and during 6 days after irradiation we observed induction of dose-dependent apoptosis. Using flow-cytometric detection of Annexin V binding, we found 29 and 62% of the MOLT-4 cells apoptotic after 16 h after irradiation by the doses of 1 or 3 Gy, resp. (9% in control). Maximal apoptosis occurred after 72 h when 33 and 92% of the cells were Annexin V positive. After both doses the number of apoptotic cells begun to decrease 144 h after the irradiation (Fig. 1).

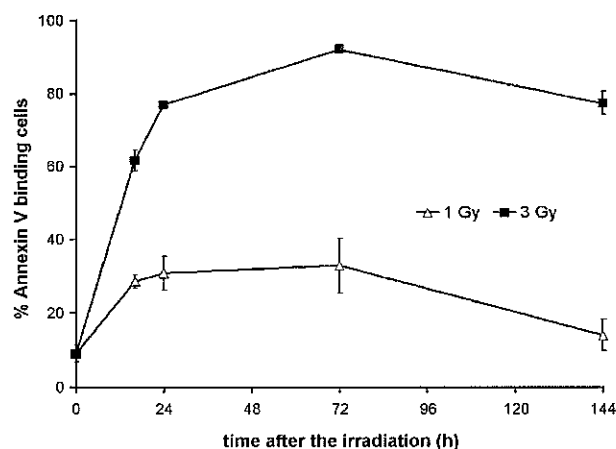


Fig. 1. Dynamic of apoptosis induction after irradiation of MOLT-4 cells by the dose of 1 Gy (open triangles) and 3 Gy (black squares). Apoptosis was measured by flow-cytometric detection of Annexin V binding, as described in Section 2. Mean values from 3 independent experiments  $\pm$ S.D. are given. Apoptosis peaks 24–72 h after irradiation.

### 3.2. Cell cycle

Distribution of the cells in cell cycle phases was analyzed by DNA content measurement. After both doses of 1 or 3 Gy statistically significant increase in the number of cells in S (control 36%, 1 Gy 51%, 3 Gy 53%) and G2 (control 7%, 1 Gy 17%, 3 Gy 17%) phase was detected 6 h after the irradiation. The increase in percentage of cells in S and G2 phase persisted in the cells irradiated by the dose of 3 Gy only (S 56%, G2 17% 24 h after irradiation) (Fig. 2A). Fig. 2B shows representative results of flow-cytometric analysis of the cell cycle 6, 24 and 72 h after the irradiation by the dose of 1 Gy. Maximal increase in percentage of cells in S phase of the cell cycle is apparent 6 h after the irradiation.

### 3.3. Dynamics of H2A.X phosphorylation and $\gamma$ H2A.X foci formation

We studied dynamics of  $\gamma$ H2A.X foci formation in MOLT-4 cells after irradiation by the dose of 1.5 Gy (Fig. 3A). Phosphorylation of H2A.X in response to radiation-induced DSB occurred quickly and IRIF could be detected as soon as 2 min after irradiation. After this dose majority of the cells fail to repair DNA lesions and die by apoptosis within 72 h after the irradiation (Fig. 1). With increasing time of

incubation after irradiation the number of foci in remaining live cells decreased and 72 h after irradiation 90% of the live MOLT-4 cells are comparable with control, sham-treated cells (without foci). However, 72 h after the irradiation 9% of the live cells still contained single big focus with colocalized  $\gamma$ H2A.X and 53BP1. These big foci are probably formed around severe DNA lesions, which cannot be repaired. In control cells these big foci were not observed. Fig. 4 shows three types of cells, which were detected immunocytochemically 72 h after irradiation by the dose of 1.5 Gy. In the majority of the live cells (90%)  $\gamma$ H2A.X was not detectable and radiation-induced damage was repaired (4A), 9% of the live cells contained big focus, indicating irreparable DNA damage (4B) and sporadically apoptotic cells (which in general are lost during the staining procedure due to their lower adherence) with typical morphology and extremely high intensity of  $\gamma$ H2A.X (4C) were detected.

We also used Western blot analysis of H2A.X phosphorylation after doses of 1.5 and 3 Gy. Phosphorylation was detected by this method within 30 min after irradiation and the amount of  $\gamma$ H2A.X increased in time (Fig. 3B). This increase was probably related to apoptosis induction, which was detectable from 16 h after irradiation by both studied doses.

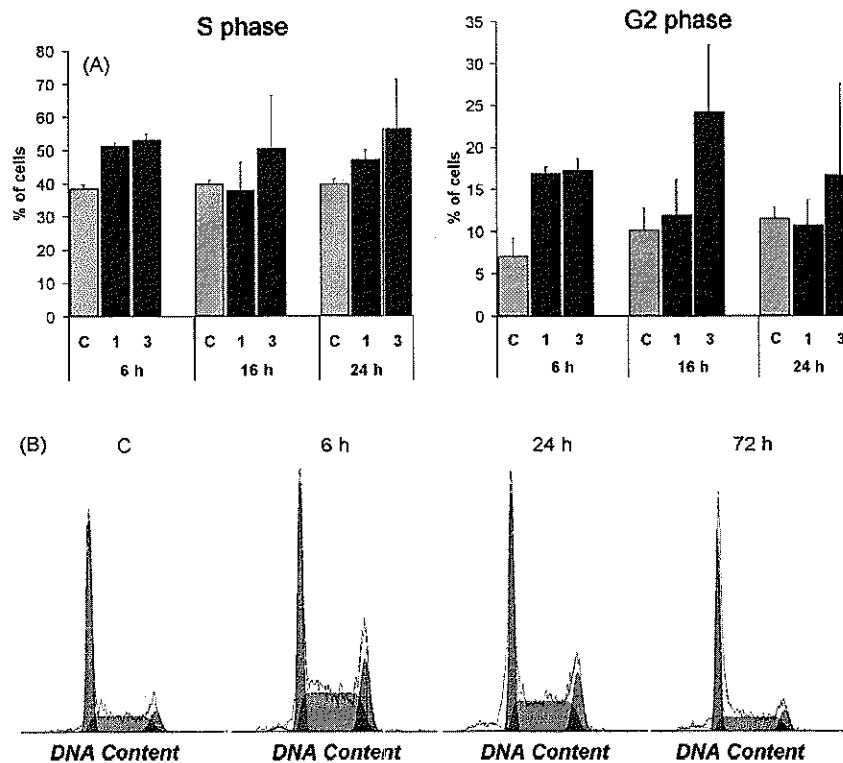


Fig. 2. Effect of irradiation on distribution of MOLT-4 cells in cell cycle phases determined by flow-cytometric analysis of DNA content. (A) Dynamic of accumulation of the cells in S and G2 phase of cell cycle. (C) Sham-treated control, (1) 1 Gy, and (3) 3 Gy. Mean values from 3 independent experiments  $\pm$  S.D. are given. (B) Representative results of DNA content analysis after irradiation by the dose of 1 Gy.

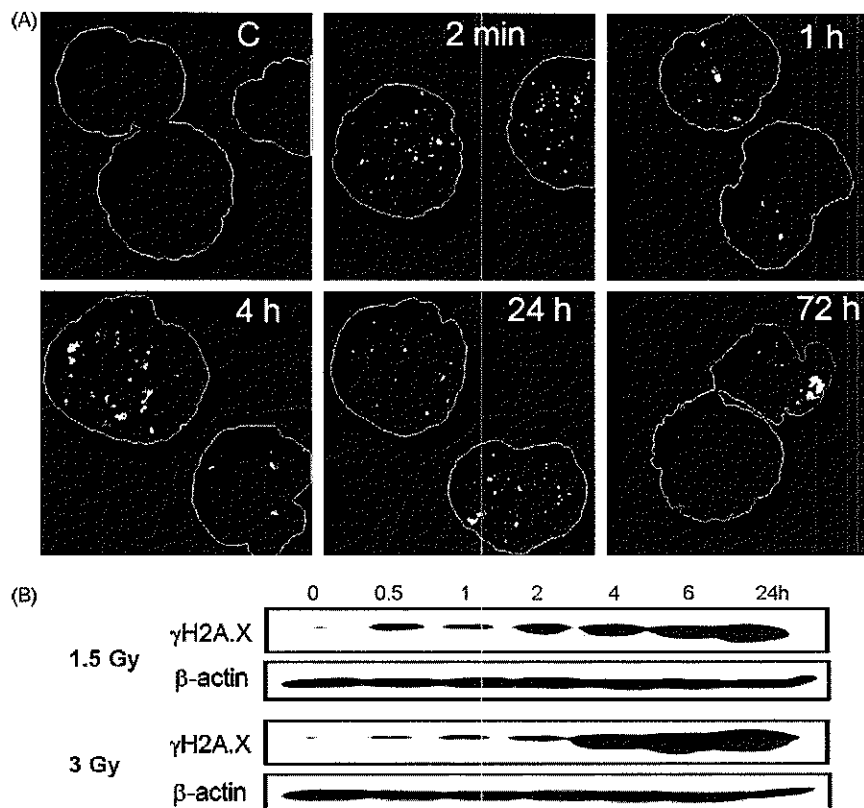


Fig. 3. Phosphorylation of H2A.X in response of MOLT-4 cells to ionizing radiation. (A) Dynamic  $\gamma$ H2A.X foci formation in live cells detected by immunocytochemical staining and confocal microscopy after irradiation of the cells by the dose of 1.5 Gy. Foci are detectable 2 min after irradiation and their number decreases in time. Outlined are nuclei of the cells, corresponding to TO-PRO-3 counterstaining. (B) Dynamic of H2A.X phosphorylation as detected in whole cell lysates by Western blot after irradiation of the cells by 1.5 and 3 Gy.

### 3.4. Phosphorylation of H2A.X and colocalization with 53BP1 is dose-dependent

DNA damage in MOLT-4 cells 1 h after irradiation by an increasing dose of IR was detected by phosphorylation of histone H2A.X on serine 139 ( $\gamma$ H2A.X). Confocal microscopy of immunostained  $\gamma$ H2A.X in individual cells revealed formation of nuclear foci in all irradiated cells (Fig. 5A). These foci were formed around DSB, colocalized with 53BP1, and the number foci was dose-dependent in the dose range 1–3 Gy (Fig. 5B). Since it is difficult to distinguish individual foci for doses above 4 Gy, we also measured intensity of H2A.X phosphorylation per nucleus by image analysis software. The intensity of H2A.X phosphorylation, measured as integrated optical density (IOD) of appropriate fluorescence, showed linear dose-dependence for the doses up to 5 Gy and then formed plateau (Fig. 5C).

### 3.5. $\gamma$ H2A.X, 53BP1 and Nbs1 colocalize in IRIF, but Nbs1 is not phosphorylated

Using confocal microscopy we studied colocalization of proteins 1 h after irradiation of the cells by the dose of 1.5 Gy. Upon irradiation we detected localization of 53BP1 in  $\gamma$ H2A.X foci. 53BP1 was also marginally detectable in

sham-treated control cells, but did not form discernible foci. It is presumed that 53BP1 serves as an adaptor molecule and allows recruitment of other signaling and repair proteins to the sites of DSB. We found also colocalization of 53BP1 and nibrin (Nbs1) part of repair complex MRN. However, we did not observe colocalization of  $\gamma$ H2A.X and phosphorylated Nbs1 (Fig. 6).

### 3.6. Western blot analysis of MRN complex

Using Western blot method we observed changes in proteins of DNA-repair complex MRN, 1 h after irradiation by the doses of 1–10 Gy. We found that all proteins were present in control cells. Irradiation by the high doses of 5–10 Gy caused decrease in amount of all three components, Mre11, Rad50 and Nbs1. Phosphorylation of H2A.X increased in dose-dependent manner, but phosphorylation of Nbs1 on serine 343 was not detected (Fig. 7).

## 4. Discussion

Ataxia-telangiectasia (AT) is rare, multi-system, autosomal recessive disease, characterized by neuronal degene-

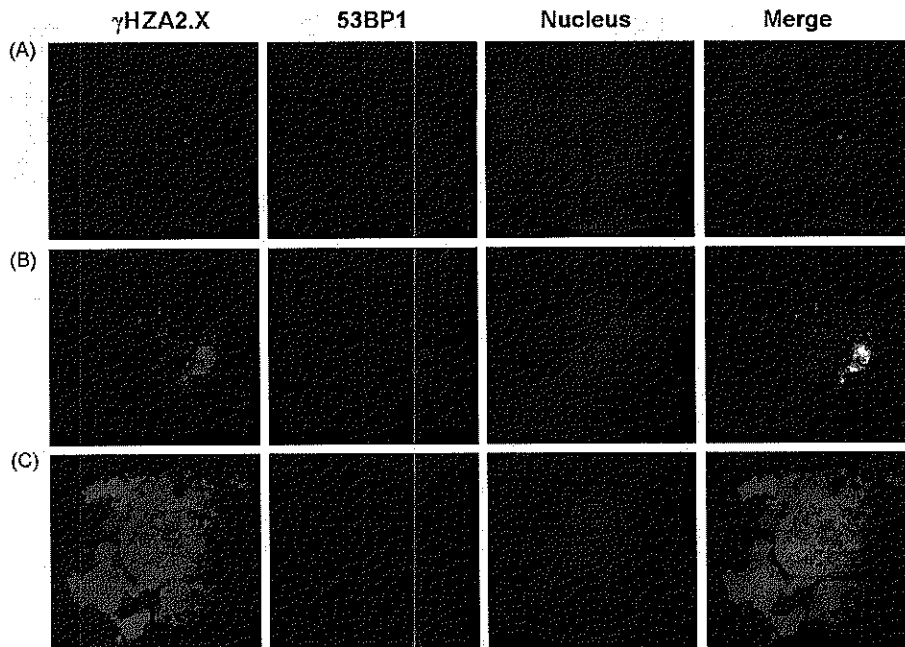


Fig. 4. Detection of  $\gamma$ H2A.X (green) and 53BP1 (red) 72 h after irradiation by the dose of 1.5 Gy. Nuclear counterstaining by TO-PRO-3 (blue). Three distinct types of cells are found. (A) Cells comparable to control cells, which do not contain discernible IRIF. This type represents 90% of the evaluated cells. (B) Cells with single big focus, where  $\gamma$ H2A.X colocalizes with 53BP1, are found in 9% of the evaluated cells. This single focus probably indicated unreparable DNA lesion. (C) Apoptotic cells, with typical chromatin condensation and nuclear fragmentation. Apoptotic cells exhibit massive positivity for  $\gamma$ H2A.X, but without 53BP1.

322 eration, genome instability, and an increased risk cancer.  
 323 Approximately 10% of AT homozygotes develop cancer,  
 324 mostly of the lymphoid system (Hodgkins and non-  
 325 Hodgkin's lymphoma, and leukemia) [27]. The ATM gene  
 326 has also been found to be mutated or deleted in the major-  
 327 ity of case of T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL)—a  
 328 rare form of mature leukemia that occurs both in adults as a

sporadic disease and in younger patients suffering AT [28].  
 AT patients are highly radiosensitive, and radiotherapy is not  
 suitable for the treatment of their malignancies.

The cells of human T-lymphocyte leukemia MOLT-4  
 are very radiosensitive, but it has been proved that ATM  
 kinase in these cells is functional, quickly activated after  
 irradiation [18] and its downstream targets are also phos-

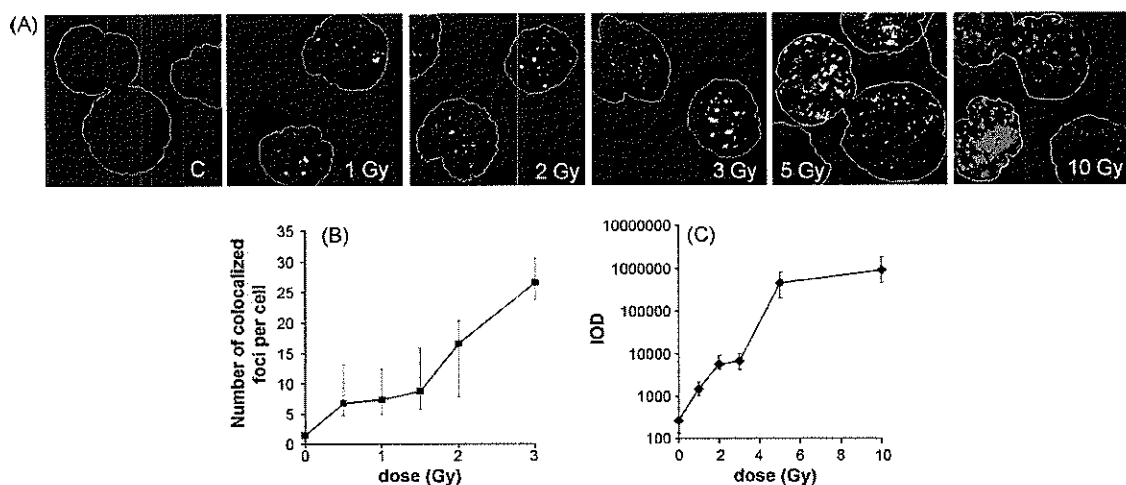


Fig. 5. Dose-dependence of  $\gamma$ H2A.X foci formation 1 h after irradiation. (A)  $\gamma$ H2A.X foci formation detected by immunocytochemical staining and confocal microscopy 1 h after irradiation. Outlined are nuclei of the cells, corresponding to TO-PRO-3 counterstaining. (B) Number of the foci containing  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 per nucleus increases in dose-dependent manners for dose range 0.5–3 Gy. Medians  $\pm$  1st and 3rd quartile are shown. (C) The graph summarizes dose-dependent increase of intensity of fluorescence used for  $\gamma$ H2A.X detection. Amount of fluorescence per nucleus was measured using image analysis software (see Section 2). This parameter shows nearly linear dose-dependent increase for doses up to 5 Gy. Medians  $\pm$  1st and 3rd quartile are shown.

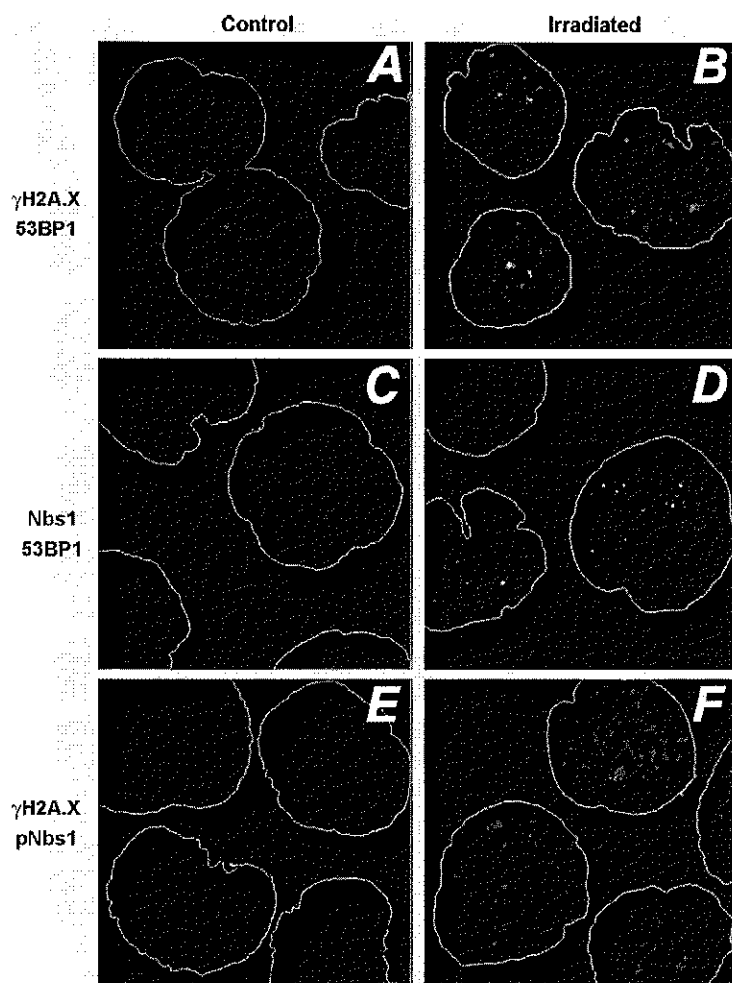


Fig. 6. IRIF formation 1 h after irradiation of the cells by the dose of 1.5 Gy. Images are merge of red (A, B, C, D for 53BP1; E, F for pNbs1-ser343) and green fluorescence (A, B, E, F for  $\gamma$  H2A.X; C, D for Nbs1) with outlined nuclei (TO-PRO-3). 1 h after irradiation by the dose of 1.5 Gy IRIF containing  $\gamma$ H2A.X, 53BP1 and Nbs1 are formed (B, D, F), but Nbs1 is not phosphorylated in IRIF in MOLT-4 cells (F). (A, C, E) Control cells.

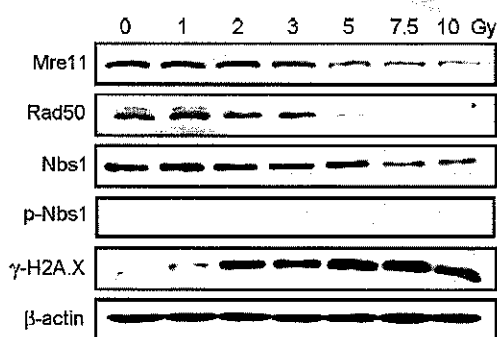


Fig. 7. Western blot analysis of MRN complex and  $\gamma$ H2A.X 1 h after irradiation by the doses of 1–10 Gy. Representative Western blots are shown. Decrease of Mre11, Rad50 and Nbs1 amount was detected after irradiation by lethal doses (5–10 Gy). While phosphorylation of H2A.X on serine 139 is dose-dependant, phosphorylation of Nbs-1 on serine 343 was not detected.

phosphorylated, including p53 [14]. It is known that defect in NBS1 gene (which disables function of repair protein Nbs1) causes similar symptoms as ATM kinase defect, including high radiosensitivity [21]. The disease is known as Nijmegen breakage syndrome. Protein Nbs1, also called p95 or nibrin, is together with Mre11 and Rad50 a part of DNA-repair complex. MRN complex plays an important role in nucleolytic processing of DNA ends, recombination, repair and checkpoint signaling. Activity of MRN is regulated by ATM. All three components of MRN are phosphorylated in response to DNA damage. So far, the best characterized is phosphorylation of Nbs1. It seems that dynamic accessibility of ATM-phosphorylated Nbs1 to DSB sites is essential for the biological roles of the MRN complex [29]. One of the most important roles of phosphorylated Nbs-1 is inhibition of DNA replication after irradiation and activation of intra S-phase check point. Lukas et al. [1] proved colocalization of Nbs1 phosphorylated on serine 343 with  $\gamma$ H2AX in the laser-induced DSB. In this study with MOLT-4 cells we

336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354

proved colocalization of  $\gamma$ H2A.X and Nbs1 in IRIF induced by 1.5 Gy irradiation, but we did not detect phosphorylated form of Nbs1 (on serine 343) in IRIF nor by Western blot. It seems that Nbs1 and ATM have a role in the same biochemical pathway. It has been proved previously [30] that defects of ATM prevent Nbs1 phosphorylation, and that Nbs1 phosphorylation is required for normal radiosensitivity of cells. In MOLT-4 cells ATM function seems to be unaffected [18]. In presented study we detected unmodified form of Nbs1 in both sham-treated and irradiated cells, and proved that upon irradiation Nbs1 is recruited to the site of DSB. However, no phosphorylation of Nbs1 on serine 343 could be detected in MOLT-4 cells, which might be the reason of their high radiosensitivity. Also the amount of MRN proteins detected in cell lysates decreased after irradiation by the supralethal doses (5 and 10 Gy) as soon as after 1 h.

As shown here, MOLT-4 cells die after irradiation by apoptosis. 16 h after irradiation by the doses of 1 and 3 Gy 30% resp. 62% of the cells were A+. The cells are rapidly degraded to small apoptotic bodies, which cannot be detected as subG1 peak. The cells are accumulated shortly in S and G2 phase of the cell cycle after irradiation by doses 1 and 3 Gy. This accumulation occurs also after irradiation by the high supralethal dose of 7.5 Gy [14]. However, this cell cycle arrest does not have protective effect during low dose-rate irradiation, as proved in Vávrová et al. [16]. That work compared behavior of HL-60 cells of human promyelocyte leukemia, which react to irradiation with lower doses by accumulation in G2 phase and are more radioresistant, with behavior of MOLT-4 cells after exposure to low dose-rate irradiation, where the majority of the dose is delivered to cells with arrested cell cycle. While at HL-60 cells the decrease in dose-rate has protective effect and increases  $D_0$ , in MOLT-4 cells  $D_0$  does not significantly change and stays at 0.8 Gy. Taking these data together supports the hypothesis that repair of radiation-induced damage in MOLT-4 cells is not effective, regardless of their functional ATM. We account this to defective Nbs1 phosphorylation. Some genetic studies [24,26] indicate that mutations in NBS1 gene are related to higher risk of malignancies and that these mutations may also play important role in relapse of ALL.

Quick response of eukaryotic cells to IR is formation of IRIF around DSB. In MOLT-4 cells we detected IRIF as soon as 2 min after irradiation (by colocalization of  $\gamma$ H2A.X and 53BP1). The number of foci decreases in time, and 72 h after irradiation most of the cells are comparable to sham-treated control cells, without any foci. Sparsely we could detect cells containing big focus (unrepaired lesion) or cells with fragmented nucleus, with high positivity of  $\gamma$ H2A.X and without 53BP1 foci, which are apoptotic cells. Phosphorylation of H2A.X in the sites of DNA fragmentation during apoptosis was recently suggested [31]. The authors 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. Since only live cells adhere well to the slides during immunocytochemical staining used in our experiments, we also detected  $\gamma$ H2A.X by Western blot from cell lysates, which enables analysis of whole cell population. Indeed, Western blot reveals increasing positivity of  $\gamma$ H2A.X during 24 h after irradiation, which correlates with apoptosis onset.

It can be concluded that doses from 1 to 4 Gy of  $\gamma$ -radiation induce dose-dependent formation of foci containing  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 in MOLT-4 leukemia cells. Also Nbs1 is found in IRIF in MOLT-4 cells. Despite functional ATM and p53 the phosphorylation of Nbs1 on serine 343 is impaired in these cells, and might be responsible for high radiosensitivity of MOLT-4 cells. H2A.X is also strongly phosphorylated in apoptotic cells, where it is not accompanied by 53BP1.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM0021620820) and by the Ministry of Defense of the Czech Republic (project OBUKHK2005001).

**Contributions.** Martina Řezáčová, Jiřina Vávrová and Emílie Lukášová provided the concept, design, data analysis, drafting of the paper, and critical revision. Martina Řezáčová, Aleš Tichý, Doris Vokurková provided experimental analysis, contributed to the data analysis and interpretation, and provided technical support.

#### References

- [1] Lukas C, Bartek J, Lukas J. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny local lesions pose great global challenges. *Chromosoma* 2005;114:146–54.
- [2] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155–68.
- [3] Rashi-Elkeles S, Elkon R, Weizman N, Linhart C, Amariglio N, Sternberg G, et al. Parallel induction of ATM-dependent pro and anti-apoptotic signals in response to ionizing radiation in murine lymphoid tissue. *Oncogene* 2006;25:1584–92.
- [4] Banáth JP, MacPhail SH, Olive PL. Radiation sensitivity, H2A.X phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 2004;64:7144–9.
- [5] Barma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2A.X in response to double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462–7.
- [6] Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. P53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000;151:1381–90.
- [7] Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 2006;173:195–206.
- [8] Uckun FM, Chandan-Langlie M, Jaszcz W, Obuz V, Waddick K, Song CW. Radiation damage repair capacity of primary clonogenic blasts in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1993;55:1431–6.
- [9] Mamane Y, Loignon M, Palmer J, Hernandez E, Cesaire R, Alaoui-Jamali M, et al. Repression of DNA repair mechanisms in IRF-4-expressing and HTLV-1-infected T lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:43–51.

- [10] Greenberg JM, Gonzalez-Sarmiento R, Arthur DC, Wilkowski CW, Streifel BJ, Kersey JH. Immunophenotypic and cytogenetic analysis of MOLT-3 and MOLT-4: human cell lines with rearrangement of chromosome 7. *Blood* 1988;72:1755-60.
- [11] Aldridge DR, Radford IR. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res* 1998;58:2817-24.
- [12] Syljuasen RG, McBride WH. Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in Jurkat T cells. *Radiat Res* 1999;152:328-31.
- [13] Nakano H, Kohara M, Shinohara K. Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 2001;306:101-6.
- [14] Szkanderová S, Vávrová J, Řezáčová M, Vokurková D, Pavlová Š, Šmardová J, et al. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol* 2003;49:191-6.
- [15] Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC. Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat Res* 2000;153:36-48.
- [16] 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;53:335-42.
- [17] Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
- [18] Tichý A, Zaskodová D, Rezacova M, Vavrova J, Vokurkova D, Pejchal J, et al. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochim Pol* 2007;54:281-7.
- [19] Khanna KK, Jackson S. DNA double-strand breaks: signaling, repair and cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247-54.
- [20] Bartek J, Lukas J. Damage alert. *Nature* 2003;421:486-8.
- [21] Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanoska KH, Saar K, et al. A novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93:467-76.
- [22] Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome. Related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 1997;31:321-4.
- [23] Wegner RD, Chrzanoska KH, Sperling K, Stumm M. Ataxia-telangiectasia variants (Nijmegen breakage syndrome). In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. Primary immunodeficiency diseases, a molecular and genetic approach. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 324-34.
- [24] Resnick IB, Kondratenko I, Pashanov E, Maschan AA, Karachunsky A, Togoiev O, et al. 657del5 mutation in gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls. *Am J Med Genet* 2003;120A:174-9.
- [25] Chrzanoska KH, Piekutowska-Abramczyk D, Popowska E, Gladkowska-Dura M, Maldyk J, Szczywska M, et al. Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. *Int J Cancer* 2006;118:1269-74.
- [26] Varon R, Reis A, Henze G, Graf-Einsiedel H, Sperling K, Seeger K. Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 2001;61:3570-2.
- [27] Boultonwood J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukemia and lymphoma. *J Clin Pathol* 2001;54:512-6.
- [28] Stoppa-Lyonnet D, Soulier J, Laugé A, Dastot H, Garand R, Sigaux F, et al. Inactivation of the gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood* 1998;91:3920-6.
- [29] Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, et al. Mdc couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* 2004;23:2674-83.
- [30] Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, et al. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 2000;25:115-9.
- [31] Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, et al. DNA-PK phosphorylates histone H2A X during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:575-90.



### **10.5 Příloha 5 (Řezáčová et al., 2005)**

Rezacova M, Vavrova J, Vokurkova D, Tichy A, Knizek J, Psutka J. The importance of abrogation of G2-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation. *Acta Biochimica Polonica* 2005; **52**: 889-895.

## The importance of abrogation of G<sub>2</sub>-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation

Martina Řezáčová<sup>1</sup>✉, Jiřina Vávrová<sup>2</sup>, Doris Vokurková<sup>3</sup>, Aleš Tichý<sup>1</sup>, Jiří Knížek<sup>4</sup>  
and Jan Psutka<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry, and <sup>4</sup>Institute of Medical Biophysics, Faculty of Medicine Hradec Králové, Charles University Prague, Hradec Králové, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Radiobiology, and <sup>5</sup>Department of Military Medical Service Organization, School of Military Health Sciences, Hradec Králové, University of Defence Brno, Hradec Králové, Czech Republic; <sup>3</sup>Institute of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic; ✉e-mail: rezacoam@lfhk.cuni.cz

Received: 13 December, 2004; revised: 15 February, 2005; accepted: 06 May, 2005  
available on-line: 11 July, 2005

**Background:** In this work we studied the relationship between the enhanced expression of DR5 receptor and the effect of combination of TRAIL and ionizing radiation on cell cycle arrest and apoptosis induction in human leukemia cell line HL-60. **Material and methods:** DR5, APO2.7 and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Proteins Bid and Mcl-1 were analyzed by Western-blotting. For clonogenic survival, colony assay on methylcellulose was used. **Results:** Ionizing radiation caused significantly enhanced positivity of DR5 receptors 24 h after irradiation with high doses (6 and 8 Gy). An increase of DR5 receptor positivity after a dose of 2 Gy was not statistically significant and application of TRAIL 48 h after irradiation did not increase the apoptosis induction. However, a decrease of radiation-induced G<sub>2</sub> phase arrest and an increase of apoptosis were observed when TRAIL was applied 16 h before irradiation with the dose of 2 Gy. Incubation with 6 µg/l TRAIL for 16 h reduced D<sub>0</sub> value from 2.9 Gy to 1.5 Gy. The induction of apoptosis by TRAIL was accompanied by Bid cleavage and a decrease of antiapoptotic Mcl-1 16 h after incubation with TRAIL. **Conclusion:** TRAIL in concentration of 6 µg/l applied 16 h before irradiation by the dose of 1.5 Gy caused the death of 63% of clonogenic tumor cells, similarly as the dose of 2.9 Gy alone, which is in good correlation with the enhanced apoptosis induction.

**Keywords:** TRAIL, ionizing radiation, DR5 receptor, apoptosis, HL-60 cells

TRAIL is a potent activator of cell death acting through so-called „death receptors“ DR4 and DR5. TRAIL preferentially kills tumor cells while it is non-toxic towards most of normal tissues. Plasilova *et al.* (2002) have shown that TRAIL does not have any negative effect on the number of CFU-GM colonies and clusters derived from bone marrow cells of AML patients in complete remission and lymphoma patients without bone marrow involvement, as well as cells derived from normal cord blood. On the other hand, it suppressed the growth of early primary leukemia and myelodysplasia progenitors.

The receptors for TRAIL, DR4 and DR5, contain a cytoplasmic “death-domain” capable of engaging the cell suicide apparatus through an adap-

tor molecule intermediate such as a Fas-associated death domain protein (Srivastava, 2001). The main pathway which activates the apoptotic process started by death receptors leads through death inducing signaling complex (DISC) assembly and activation of caspase 8 and further activation of caspase 3 (Gong & Almasan, 2000). However, the apoptotic process can be also activated by TRAIL through the mitochondrial pathway. In such case, Bid (Bcl-2 inhibitory BH3-domain-containing protein) is cleaved by caspase 8, the apoptosome is assembled, caspase 9 is activated, and it further activates effector caspase 3 (Belka *et al.*, 2001). Wen *et al.* (2000) has shown that for cells of hematopoietic lineages Jurkat, HL-60 and U-937 apoptosis induced by TRAIL is related mainly to the mitochondrial pathway, i.e.

**Abbreviations:** AML, acute myeloid leukemia; ATM, ataxia telangiectasia-mutated; CFU-GM, colony-forming unit granulocyte macrophage; DR, death receptor; FCS, fetal calf serum; HDR, high dose-rate; LDR, low dose-rate; mAB, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Bid activation and accumulation of cytochrome *c* in the cytosol. An increased expression of antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> significantly reduces apoptosis induction by TRAIL in HL-60 cells. Caspase 8 and 9 inhibitors also inhibit apoptosis induced by TRAIL. Another member of the Bcl-2 protein family is Mcl-1. High level of Mcl-1 in hematopoietic cells is responsible for survival of hematopoietic progenitor cells (Kitada & Reed, 2004). Mcl-1 is one of the very labile proteins of the Bcl-2 family; it contains sequences enabling quick degradation. Expression of Mcl-1 significantly increases after therapy using growth factors and cytokines. Parallels exist between Mcl-1 and Bcl-2, suggesting that Mcl-1 also reacts with Bax and therefore extends the survival of hematopoietic cells in cytotoxic conditions (Zhou *et al.*, 1997).

Several observations indicate that radiation and receptor-induced apoptosis each use distinct although partially overlapping pathways. Efforts to combine ionizing radiation and TRAIL in cancer therapy are therefore reasonable. Ionizing radiation in doses up to 10 Gy causes in HL-60 cells (which lack functional p53) a long G<sub>2</sub> phase arrest and apoptosis is observed as late as 48 h after irradiation (Marekova *et al.*, 2003). Ionizing radiation induces apoptosis by causing double strand breaks of DNA, activation of ATM kinase and by the mitochondrial pathway by activation of proapoptotic members of Bcl-2 family (Bakkenist & Kastan, 2003). Abrogation of G<sub>2</sub> phase arrest, e.g. by caffeine, has a strong radiosensitizing effect in HL-60 cells (Vavrova *et al.*, 2003).

In our work we looked for the most effective sequence of the combination of therapeutic doses of ionizing radiation and TRAIL. The application of TRAIL after irradiation has been supported by some of the previous studies (Belka *et al.*, 2001), proving the increase of receptors containing death domain after irradiation of Jurkat cells. Also application of etoposide, ara-C and doxorubicin increases DR5 receptors in HL-60, Jurkat and U-937 cells. Wen *et al.* (2000) have found that treatment of these cells with the above-mentioned cytostatics for 6 h followed by TRAIL application causes stronger apoptosis induction in comparison to simultaneous treatment. However, Kim *et al.* (2001) have shown that doxorubicin increases the amount of DR5 receptor and enhances TRAIL-induced apoptosis also in normal lung and skin fibroblasts.

In our work we studied the expression of DR5 receptor after irradiation of HL-60 cells and the expression of members of Bcl-2 protein family (Mcl-1 and Bid), which can significantly affect apoptosis induction. We looked for the lowest dose of TRAIL, which in combination with the therapeutic dose of 2 Gy of ionizing radiation, would have a significant effect on apoptosis induction and the loss of clono-

genic survival in human promyelocytic leukemia HL-60 cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell cultures and culture conditions.** Human leukemia HL-60 cells were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, Salisbury, UK). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) supplemented with 20% fetal calf serum, 0.05% L-glutamine, 150 UI/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin in a humidified incubator at 37°C and controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cultures were divided every 2nd day by dilution to a concentration of 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml. The cell counts were performed with a hemocytometer, the cell membrane integrity was determined by using the Trypan blue exclusion technique. Cell lines at no more than 20 passages were used for this study.

**Gamma irradiation.** Aliquots of 10 ml of cell suspension (2 × 10<sup>5</sup>/ml) were plated into 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc) and irradiated at room temperature using <sup>60</sup>Co γ-ray source with a dose-rate of 0.5 Gy/min, at a distance of 1 m from the source. After the irradiation the flasks were placed in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub> and aliquots of the cells were removed at various times after irradiation for analysis. The cells were counted and cell viability was determined with the Trypan blue exclusion assay.

**TRAIL** (TNF-related apoptosis-inducing ligand). For the experiments Killer TRAIL™ (Alexis, Germany) was used. TRAIL was diluted in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.7, 300 mM NaCl, 0.006% Tween 20, 1% sucrose, 0.5 mM DTT (dithiothreitol).

**Cell cycle analysis.** The cells were collected and washed with cold PBS (phosphate-buffered saline), and fixed in 70% ethanol. For the fixation of low molecular fragments of DNA the cells were incubated for 5 min at room temperature in a phosphate buffer and then stained with propidium iodide (PI) in the Vindelov's solution for 30 min at 37°C. The fluorescence (DNA content) was measured with a Coulter Electronic (Hialeah, FL, USA) apparatus. A minimum of 10000 cells analyzed in each sample served to determine the percentages of cells in each phase of the cell cycle, using the Multicycle AV software. Three independent experiments were performed.

**In vitro clonogenic survival assay.** The radiation survival curves were generated using an *in vitro* clonogenic assay. The HL-60 cells (10<sup>2</sup>–10<sup>5</sup>/ml) were mixed in the Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 0.9% methylcellulose, 30% fetal calf serum and 10% conditioned medium from the 5637 human bladder carcinoma cell line. One mil-

lilitre of the plating mixture was dispersed into 35 mm tissue culture Petri dishes. The colonies (containing 40 or more cells) were counted after 14 days of incubation in 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> at 37°C and the curves were generated. All semi-solid cultures were performed in duplicates. Two independent experiments (4 measurements) were performed.

**Flow cytometry.** The cells were washed twice with PBS containing 5% FCS and 0.02% NaN<sub>3</sub>. Then,  $1 \times 10^5$  cells suspended in 0.5 ml of PBS with 5% FCS and 0.02% NaN<sub>3</sub> were incubated with mAbs:

**1. APO2.7 antibody:** For the apoptosis detection mouse phycoerythrin (PE)-conjugated mAb APO2.7 clone 2.7 A6A3 (obtained from Immunotech, Prague, CR) specific for a 38 kDa mitochondrial protein (7A6 antigen) was used. The cells were incubated with mAbs for 30 min at 4°C. The method with nonpermeabilised cells was used.

**2. Antibody to DR5:** For detection of TRAIL receptor DR5 mAb to DR5 clone HS201 (obtained from Alexis, Germany) was used. The cells were incubated with mAb for 15 min at room temperature. Then the cells were washed with PBS containing 5% FCS and 0.02% NaN<sub>3</sub> and incubated with anti-mouse IgG(Fcγ)-PE (obtained from Beckman-Coulter, USA) for 15 min at room temperature.

All flow cytometric analyses were 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 10000 cells was collected for each sample in a list mode file format. The list mode data were analyzed using Epics XL System II software (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). Three independent experiments were performed.

**Electrophoresis and Western blotting.** At various times after irradiation, the HL-60 cells were washed with PBS and lysed. Whole cell extracts were prepared by lysis in 500 µl of lysis buffer (137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% n-octyl-β-D-glucopyranoside, 50 mM NaF, 20 mM Tris, pH 8, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Complete™Mini). The lysates containing equal amount of protein (30 µg) were loaded onto a 12% SDS/polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane and hybridized with an antibody (rabbit anti-Bid polyclonal antibody from PharMingen, 1:500, and anti-Mcl-1 antibody developed in rabbit by Sigma-Aldrich, 1:1500). After washing, the blots were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibody diluted 1:1000 (Dako, High Wycombe, UK) and the signal was developed with a chemiluminescence (ECL) detection kit (Boehringer Mannheim).

**Statistical analysis.** The results were statistically evaluated with Student's *t*-test. The values represent the mean ±S.D. (standard deviation of the mean). The statistical significance of the difference of means in comparable sets is indicated.

The statistical evaluation of the clonogenic survival curves was performed as follows: At first clonogenic survival curves were approximated by linear combination of orthogonal polynomials. Together the highest polynomial degree was determined with the help of statistical test by testing of appropriate regression coefficient against zero; the test was rejected on significance level  $\alpha = 5\%$  (Ralston, 1973). Statistical evaluation of mutual (un)identity of clonogenic survival curves was provided with help of two-dependence (two-sided) *t*-test. It was found out from *P*-value dependence on the dose or concentration in which dose or concentration range the clonogenic survival curves do not mutually statistically differ and in which domains they are mutually statistically different.

## RESULTS

### DR5 receptors after irradiation

As the main goal of this study was to find the most effective sequence for combination of TRAIL and ionizing radiation, we evaluated changes in expression of TRAIL DR5 receptors after exposure of HL-60 cells to different doses of ionizing radiation. As shown in Fig. 1, ionizing radiation induced a significant increase of DR5 receptors after irradiation with the doses of 6 and 8 Gy, as detected by flow cytometry 24 h after irradiation. On the other hand, the therapeutically used dose of 2 Gy (a dose usually used as one fraction during fractionated radiotherapy) did not significantly increase DR5 receptors.

### Combination of ionizing radiation followed by TRAIL

As the most pronounced (albeit nonsignificant) increase of TRAIL DR5 receptors was detected 48 h after irradiation with the dose of 2 Gy, we decided to add TRAIL to the culture medium at this time. The cells were irradiated with the dose of 2 Gy and 48 h later TRAIL was added to culture medium in a final concentration of 20 µg/l. However, no significantly greater effect of the combination treatment was obtained (not shown).

### Combination of TRAIL treatment followed by ionizing radiation

In our further experiments we observed an effect of a 16-h-long incubation with TRAIL and a consecutive irradiation by the dose of 2 Gy on HL-60 cells. HL-60 cells were incubated for 16 h in the presence of TRAIL (5–100 µg/l). When TRAIL had

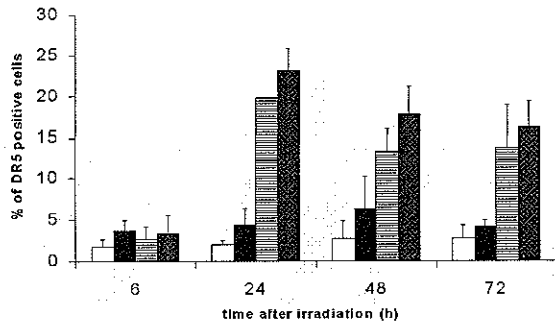


Figure 1. The effect of irradiation of HL-60 cells on positivity of TRAIL receptor DR5.

The cells were irradiated by the dose of 2, 6 and 8 Gy of ionizing radiation and the positivity of DR5 receptors was determined by flow cytometry 6, 24, 48 and 72 h after the irradiation. Each point represents the average of three independent experiments  $\pm$ S.E.M.  $\square$ , Control;  $\blacksquare$ , 2 Gy;  $\text{▨}$ , 6 Gy;  $\blacklozenge$ , 8 Gy.

been washed away, one group was irradiated by the dose of 2 Gy. Immediately after the irradiation the clonogenic test was started and the number of colonies was determined on 14th day of cultivation. As far as the clonogenic survival of HL-60 cells is concerned, the application of TRAIL 16 h before irradiation with the dose of 2 Gy had an additive effect. The concentration of TRAIL which caused a decrease of the colony number to 50% ( $EC_{50}$ ) was 19.1  $\mu$ g/l for nonirradiated cells. In the case of cells irradiated with the dose of 2 Gy after 16 h of incubation with TRAIL, the  $EC_{50}$  value decreased to 6.3  $\mu$ g/l. From the  $P(c)$  behavior it was observed that in the concentration range from 0 to 35.4  $\mu$ g/l,  $P(c) \leq 0.01$ , and therefore both tabular dependencies may statistically be considered as highly different; in the concentration range 35.4 to 45.2  $\mu$ g/l, where  $0.01 < P(c) \leq 0.05$ , as different, and within the concentration range from 45.2 to 51.9  $\mu$ g/l, where  $0.05 < P(c) \leq 0.1$ , as marginally different.

In the following experiments we studied the effect of a 16-h-long incubation with 6  $\mu$ g/l TRAIL (concentration close to  $EC_{50}$  when combined with 2 Gy irradiation, as mentioned above) combined with the irradiation with the dose of 2 Gy on the mode of cell death and cell cycle progress. Apoptosis was detected by two different methods — sub $G_1$  peak (Fig. 2) and APO2.7 positivity (Fig. 3). The method analyzing the sub $G_1$  peak detects early phase of apoptosis, while the method analyzing the mitochondrial antigen APO2.7 in nonpermeabilised cells detects a later phase of apoptosis (Marekova *et al.*, 2003). We proved that the combination (TRAIL followed after 16 h by 2 Gy irradiation) is more effective in induction of apoptosis, which was more intensive and lasted longer after irradiation.

When looking for the mechanism involved in the enhanced apoptosis induction we found that the

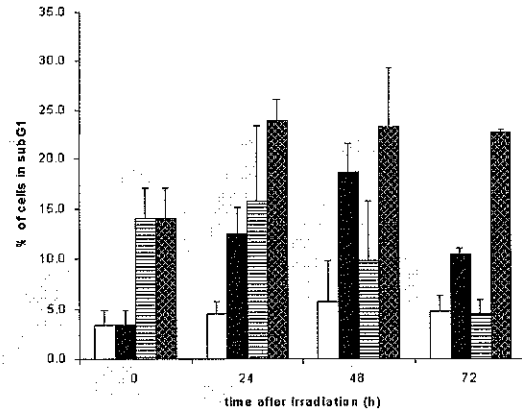


Figure 2. The comparison of effect of the 16-h-long incubation with 6  $\mu$ g/l TRAIL, the irradiation by the dose of 2 Gy, and their combination on apoptosis induction (detection of sub $G_1$  cells during DNA content analysis) in HL-60 cells.

TRAIL was applied 16 h before irradiation and washed away immediately after irradiation. Cells in early phase of apoptosis are detected as sub $G_1$  peak (i.e. cells with lower amount of DNA than cells in  $G_1$  phase of cell cycle) due to fragmentation and loss of DNA during apoptosis. Each point represents the average of three independent experiments  $\pm$ S.E.M.  $\square$ , Control;  $\blacksquare$ , 2 Gy;  $\text{▨}$ , TRAIL 6 ng/ml;  $\blacklozenge$ , combination.

application of TRAIL inhibited the cell cycle arrest in  $G_2$  phase, which is observed 24 h after irradiation with the dose of 2 Gy. A representative result of one out of three experiments is shown in Fig. 4. There was a statistically significant decrease of the percentage of cells in  $G_2$  phase 24 h after TRAIL and irra-

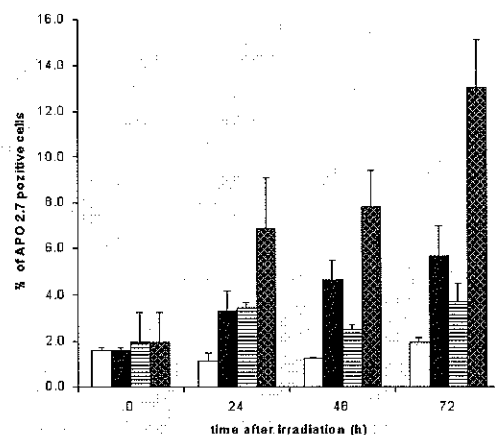


Figure 3. The comparison of effect of the 16-h-long incubation with 6  $\mu$ g/l TRAIL, the irradiation by the dose of 2 Gy, and their combination on apoptosis induction (detection of mitochondrial membrane antigen APO2.7, without permeabilization) in HL-60 cells.

TRAIL was applied 16 h before irradiation and washed away immediately after irradiation. Mitochondrial membrane antigen APO2.7 is a specific marker of apoptosis. When used without digitonin permeabilization of cell membrane it detects cells in later phase of apoptosis. Each point represents the average of three independent experiments  $\pm$ S.E.M. For designations see Fig. 2.

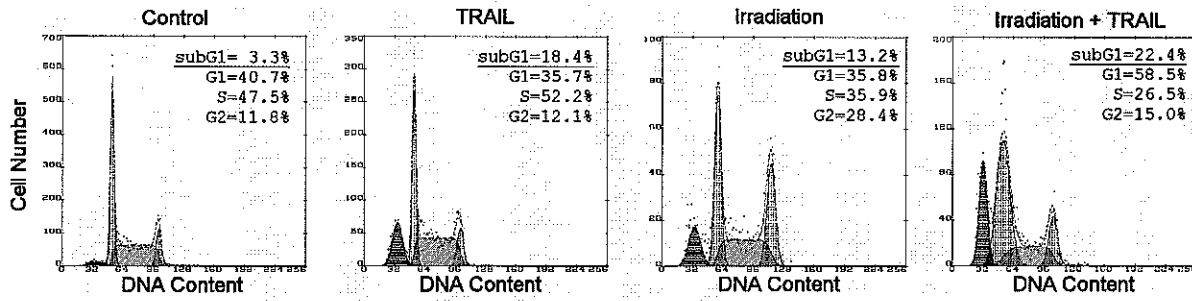


Figure 4. The effect of 16-h-long incubation with TRAIL (6 µg/l) and consecutive irradiation by the dose of 2 Gy on abrogation of cell cycle arrest in G<sub>2</sub> phase.

TRAIL was applied 16 h before irradiation and washed away immediately after irradiation. The cells were analyzed 24 h after irradiation. The percentage of subG<sub>1</sub> cells is calculated from the total cell count, distribution of the cells in cell cycle (the percentage of cells in G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) is calculated only among the cells in the cycle (excluding subG<sub>1</sub>). Representative results of one out of three independent experiments.

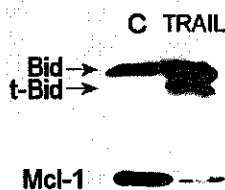


Figure 5. TRAIL induced changes in proteins of Bcl-2 family.

HL-60 cells were incubated with TRAIL (100 µg/l) for 16 h. Bid and Mcl-1 proteins were detected by Western blotting. TRAIL induced increase of truncated form of Bid (15 kDa) and decrease of Mcl-1 levels.

radiation (13.9 ± 1.2%) in comparison to the irradiated only (2 Gy) group (27.2 ± 6.3%).

We next proved that a 16-h-long incubation with TRAIL induces changes in Bid and Mcl-1, pro-

teins of the Bcl-2 family, in HL-60 cells. Using Western blot analysis we detected induction of the proapoptotic form of Bid (t-Bid) and inhibition of the anti-apoptotic protein Mcl-1 (Fig. 5).

Effect of TRAIL on radiosensitivity of HL-60 cells

Incubation with 6 µg/l TRAIL for 16 h reduced the D<sub>0</sub> value (the dose of ionizing radiation after which 37% of clonogenic HL-60 cells survive) from 2.9 Gy to 1.5 Gy. From the P(c) behavior it was observed that in the dose range from 0 to 2.77 Gy, P(c) ≤ 0.01, and therefore both tabular dependencies may be considered as statistically highly different; in the dose range 2.77 to 2.98 Gy, where 0.01 < P(c) ≤ 0.05, as different, and within the dose range 2.98 to 3.09 Gy, where 0.05 < P(c) ≤ 0.1, as marginally different. The preincubation of HL-60 cells with TRAIL did not change the radiosensitivity itself, but shifted the dose-response curves due to the additional killing of the cells by TRAIL (Fig. 6).

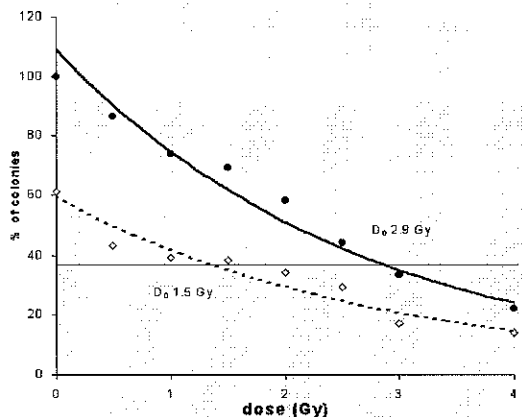


Figure 6. The effect of 16-h-long incubation with 6 µg/l TRAIL and consecutive irradiation by the dose of 2 Gy on clonogenic survival of HL-60 cells.

For the clonogenic survival data, each point is a mean of 4 measurements from two experiments ± S.D. The clonogenicity test has been started immediately after the end of the irradiation. Equations of generated curves: Control:  $y = 109.22e^{-0.3781x}$ , TRAIL:  $y = 59.711e^{-0.3519x}$ . ●, Control; ◇, TRAIL.

DISCUSSION

Cancer cells often develop a resistance to chemotherapy or irradiation through mutations in the p53 tumor-suppressor gene, which prevent apoptosis induction in response to cellular damage. The HL-60 cells (devoid of p53) are more radioresistant in comparison to the human T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4 (wild type p53), mainly due to the long repair of radiation-induced damage during the G<sub>2</sub> phase arrest of the cell cycle. Irradiation of HL-60 cells by a low dose-rate gamma radiation (0.23 Gy/h, LDR) caused prolonged irradiation in G<sub>2</sub> phase and increased radioresistance in comparison to a high dose-rate irradiation (0.6 Gy/min, HDR). The cells repaired their damage already during the LDR irradiation (Vavrova *et al.*, 2004). When the HL-60 cells were irradiated by a low dose-rate gamma

radiation in the presence of the ATM kinase inhibitor caffeine, the  $D_0$  value decreased from 3.7 Gy to 2.2 Gy (LDR in the presence of caffeine) (Vavrova *et al.*, 2003).

The effect of therapeutic doses of ionizing radiation on tumor cells can be enhanced by combining ionizing radiation with other substances which selectively enhance apoptosis induction in these cells. One of such selective inducers of apoptosis is TRAIL. From our and others (Wen *et al.*, 2000) results it is apparent that TRAIL induces apoptosis regardless of p53 status. We proved that in the range of low doses (up to 4 Gy) the application of 6  $\mu\text{g/l}$  TRAIL 16 h before irradiation significantly reduces the  $D_0$  value from 2.9 Gy to 1.5 Gy. This observation is in good correlation with the results showing that application of low concentration of TRAIL prevents the accumulation of the cells irradiated by the dose of 2 Gy in  $G_2$  phase of the cell cycle, and therefore disables the reparation of radiation-induced damage, which in turn causes enhanced apoptosis induction. The relatively long interval of detectable apoptosis induced by a combination of TRAIL and irradiation could be caused by the attempt of the irradiated cells to enter mitosis with an insufficiently repaired DNA, which is responsible for delayed post-mitotic apoptosis in later intervals. Similar results were obtained during studies of the combined effect of caffeine applied 30 min before irradiation (Vavrova *et al.*, 2003).

The importance of the mitochondrial pathway of apoptosis induction after TRAIL seems to be beyond doubts in the case of leukemic cells. Belka *et al.* (2001) have shown the activation of Bid 4–6 h after application of TRAIL in Jurkat cells. In our work we detected an active form of Bid and a significant decrease of the antiapoptotic Mcl-1 16 h after treatment of HL-60 cells with TRAIL.

The interactions of TRAIL and radiation were studied in the HL-60 cell line, because these cells are sensitive to apoptosis induced by TRAIL alone and they are less sensitive to ionizing radiation ( $D_0 = 2.2$  Gy) in comparison to hematopoietic stem cells ( $D_0 = 1$  Gy) (Vavrova *et al.*, 2002). We proved a dose dependent up-regulation of DR5 receptor after the studied doses of radiation (6 and 8 Gy). After the dose of 2 Gy the expression of DR5 receptor increased (but not significantly) only 48 h after irradiation. When TRAIL was applied 48 h after irradiation of the cells by the dose of 2 Gy we did not detect a higher amount of apoptosis in comparison to nonirradiated cells. Belka *et al.* (2001) have described an increase of DR5 receptor expression in Jurkat cells 12 and 24 h after the dose of 10 Gy. A 6-h-long incubation of HL-60 cells with increasing concentrations of ara-C (1–100  $\mu\text{mol/l}$ ) also significantly increased the DR5 receptor amount. However, even the dose of 8 Gy did not cause an increase of DR5 receptors dur-

ing 6 h after irradiation in our experiments with HL-60 cells. The expression of DR5 receptors increased also after 6-h-long incubation of HL-60 cells with 50  $\mu\text{mol/l}$  doxorubicin (Wen *et al.*, 2000). It seems to be apparent that both ara-C and doxorubicin are better inducers of the DR5 receptor expression in comparison to ionizing radiation. On the other hand, doxorubicin was also found to sensitize normal nontumor lung and skin fibroblasts to TRAIL (Kim *et al.*, 2001). When we applied TRAIL 48 h after irradiation by the dose of 2 Gy (i.e. during the period of the highest expression of DR5 receptors after this dose of radiation) we did not detect an increased apoptosis after TRAIL in comparison to the nonirradiated group.

We proved in this work that the incubation of HL-60 cells with TRAIL 16 h before irradiation prevented the accumulation of cells in the  $G_2$  phase after irradiation and induced a higher degree of apoptosis of irradiated cells. This resulted in a synergic effect, where the  $EC_{50}$  value decreased from 19.1  $\mu\text{g/l}$  (TRAIL) to 6.3  $\mu\text{g/l}$  (TRAIL + irradiation by the dose of 2 Gy). The results of Kim *et al.* (2001) proved that TRAIL-resistant Jurkat clones were not cross-resistant to ionizing radiation. The combined treatment of radiation and TRAIL synergistically increased the cell death through the activation of the caspase pathway in clones resistant to TRAIL-induced apoptosis. When TRAIL and ionizing radiation were applied together no increase of DR5 or DR4 receptors was detected. This means that the synergic effect was caused by TRAIL receptor-independent activation of the caspase 8 cascade pathway. The interaction of irradiation and TRAIL involves multiple genes such as DR5, caspase 8, caspase 3, and Bcl-2 family. Marini *et al.* (2003) proved that the expression of receptor DR5, the adaptor molecule FADD and initiator caspase 8 or 10 is required for the combined effect of TRAIL and irradiation. FADD is not necessary for the ionizing radiation effect, but it is absolutely essential for the TRAIL-induced apoptosis. FADD negative cells show no additive effect of radiation and TRAIL.

Procaspase 8 seems to be the key molecule in the apoptosis induced through death receptors. Its function can be partially substituted by caspase 10. The down-regulation of Bcl-2 and Mcl-1 also plays an important role in apoptosis induction. We proved that after a 16-h-long incubation of HL-60 cells with TRAIL the active form of Bid appears and the amount of Mcl-1 significantly decreases, which can also contribute to a stronger effect of ionizing radiation.

We proved that the anti-tumor effect of TRAIL applied 16 h before irradiation of HL-60 cells (p53 negative) was linked with the higher intensity of apoptosis induction and with the abrogation of the  $G_2$  phase arrest induced by ionizing radiation.

We also showed that the therapeutically used dose of 2 Gy did not significantly increase DR5 receptor positivity of HL-60 cells. The combined effect of irradiation (2 Gy) and TRAIL (6 µg/l) is synergistic mostly because the application of TRAIL before irradiation prevents the cells from accumulating in G<sub>2</sub> phase, and consequently they cannot repair the radiation-induced damage sufficiently. This causes enhanced apoptosis induction, which is also demonstrated in the decrease of the D<sub>0</sub> value from 2.9 Gy to 1.5 Gy.

#### Acknowledgement

The authors thank the Grant Agency of the Czech Republic (grant project No. 202/02/D023) for financial support.

#### REFERENCES

- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 486–488.
- Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W (2001) Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* **20**: 2190–2196.
- Gong B, Almasan A (2000) Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells. *Cancer Res* **60**: 5754–5760.
- Kim MR, Lee JY, Park MT, Chun YJ, Jang YJ, Kang CM (2001) Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells. *FEBS Lett* **505**: 179–184.
- Kitada S, Reed JC (2004) Mcl-1 promoter insertions dial-up aggressiveness of chronic leukemia. *J Natl Cancer Inst* **96**: 642–643.
- Marekova M, Vavrova J, Vokurkova D (2003) Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma irradiated HL-60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Gen Physiol Biophys* **22**: 191–200.
- Marini P, Jendrossek V, Durand E, Gruber C, Budach C, Belka C (2003) Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionizing radiation. *Radiother Oncol* **68**: 189–198.
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, Neuwirtova R, Čermák J, Necas E, Andera L, Stopka T (2002) TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* **16**: 67–73.
- Ralston A (1973) *A First Course in Numerical Analysis*. McGraw Hill Book Comp, New York, St. Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney.
- Srivastava RK (2001) TRAIL/APO-2L: Mechanism and clinical applications in cancer. *Neoplasia* **3**: 535–546.
- Vavrova J, Vokurkova D, Marekova M, Blaha M, Jebavy 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* **48**: 51–57.
- Vavrova J, Marekova-Rezacova M, Vokurkova D, Szkan্দerova S, Psutka J (2003) Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiat Environ Biophys* **42**: 193–199.
- Vavrova J, Rezacova M, Vokurkova D, Psutka J (2004) Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol Res* **53**: 335–342.
- Wen J, Ramedevi N, Nquyen D, Perkins C, Worthington E, Bhalla K (2000) Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* **96**: 3900–3906.
- Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW (1997) Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* **89**: 630–643.