

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra biochemických věd

**Stanovení bílkovinných inhibitorů apoptózy metodou ELISA**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Školitel-specialista: MUDr. Evžen Křepela, CSc.

Hradec Králové, 2009

Petra Daňková

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

4.9.2009

Petra Daňková

## **Poděkování**

Toto poděkování patří především panu MUDr. Evženu Křepelovi, CSc., mému vedoucímu v laboratořích molekulární a buněčné biologie na klinice pneumologie a hrudní chirurgie ve Fakultní nemocnici Na Bulovce, Praha, za odbornou pomoc a všechnen čas, který mi věnoval při přípravě bakalářské práce. Dále děkuji mému školiteli Doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za vstřícnost a užitečné rady.

## Obsah

Obsah.....	3
Úvod.....	5
Apoptóza .....	6
Význam apoptózy .....	6
Morfologické změny u apoptotických buněk .....	7
Rozlišení mezi apoptózou a nekrózou .....	7
Mechanismy spuštění apoptózy .....	8
Kaspasy.....	9
Vnější cesty apoptózy .....	11
Vnitřní cesty apoptózy .....	12
Efektorová fáze .....	13
Fagocytární fáze.....	14
Patologie apoptózy.....	14
Inhibitory apoptózy .....	15
Rodina IAPs .....	15
Struktura IAPs.....	15
Funkce IAPs.....	17
IAPs jako terapeutické cíle při léčbě rakoviny .....	20
ELISA.....	22
Imunochemické metody.....	22
ELISA .....	22
Popis jednotlivých kroků sendvičové ELISA metody .....	23
Materiál a pracovní postup.....	24

Odběr a typy použitých tkání.....	24
Příprava bílkovinných extraktů.....	24
Roztoky a reagensie .....	25
Příprava bílkovinných extraktů typu I a S .....	26
Stanovení celkové bílkoviny v extraktech I a S (BCA metoda stanovení).....	27
Chromogenní ELISA XIAPu a survivinu ve vzorcích Tu a Lu.....	29
Roztoky a reagensie .....	29
ELISA soupravy.....	30
Ředění bílkovinných extraktů I a S.....	32
Pracovní protokol pro chromogenní ELISU XIAPu a survivinu.....	32
Statistické metody .....	34
Výsledky.....	35
Závěr.....	41
Seznam použité literatury a zdrojů.....	42
Seznam použitých zkratk.....	47

## Úvod

Apoptóza je geneticky programovaný zánik buněk, tj. fyziologická nebo patogenetická smrt buněk, způsobená specifickými spouštěcími signály a molekulárními mechanismy. V řadě zhoubných nádorů jsou spuštění anebo průběh apoptózy u nádorových buněk inhibovány. Bílkovinné inhibitory apoptózy s BIR doménou (IAPs, tj. inhibitor of apoptosis proteins) jsou endogenní proteiny, které inhibují zevní i vnitřní dráhy apoptózy. Do rodiny IAPs u člověka patří osm členů: NAIP (BIRC1), cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), XIAP (BIRC4), survivin (BIRC5), apollon (BIRC6), livin (BIRC7) a ILP2 (BIRC8). Mnoho nádorových buněčných linií i primárních nádorů vykazuje zvýšenou či nadměrnou expresi IAPs. Primární nebo získaná rezistence nádorových buněk na běžně používanou klasickou chemoterapeutickou protinádorovou léčbu je jednou z hlavních překážek efektivní nechirurgické léčby nádorů. Díky současným poznatkům, které ukazují na zásadní úlohu IAPs v regulaci apoptózy u nádorových buněk, se objevují návrhy využít inhibici exprese a funkce IAPs jako terapeutickou strategii pro cílenou biologickou léčbu zhoubných nádorů. Do popředí našeho zájmu se dostali především XIAP a survivin, jako potenciální terapeutické cíle při léčbě rakoviny plic.

Cílem mé bakalářské práce podat přehled o biochemických podkladech a regulaci apoptózy a zejména o bílkovinných inhibitech apoptózy s BIR doménou, a současně o imunoanalytických biochemických metodách, zejména o sendvičové ELISA metodě. Praktickým cílem bylo zjistit rozdíly v hladině exprese XIAPu a survivinu ve tkáních nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung carcinoma, NSCLC) a plicním parenchymu u chirurgicky léčených pacientů. Dále pak porovnat rozdíly v expresi těchto proteinů ve tkáních NSCLC s ohledem na jejich histopatologický typ, stupeň diferenciaci a stádium nádoru, a na pohlaví a kouření pacientů s NSCLC. Koncentrace proteinů XIAP a survivin ve tkáních byla stanovena imunometrickou sendvičovou ELISA metodou.

## Apoptóza

### Význam apoptózy

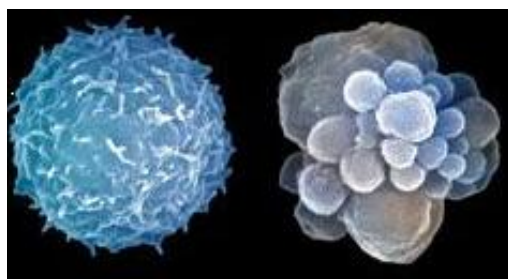
Termín apoptóza (z řec. apoptosis - padání, opadávání listů ze stromu) poprvé použil J.F. Kerr a jeho kolegové A.H. Wyllie a A.R. Currie v roce 1972, i když určité části pojmu byly výslovně popsány mnoho let před tím (Kerr 2002). Apoptóza je geneticky programovaný zánik buněk, tj. fyziologická nebo patogenetická smrt buněk, způsobená specifickými spouštěcími signály a molekulárními mechanismy, a nenavozující typickou zánětlivou reakci jako je tomu u nekrózy buněk (May a Deng 2006, Elmore 2007).

Porozumět mechanismům zapojených do procesu apoptózy v savčích buňkách nám dává vyšetření programované smrti buněk, která nastává během vývoje hlístice *Coenorhabditis elegans* (Horvitz 1999). Při vývoji tohoto organismu je eliminována programovanou smrtí přesně 131 buněk z celkového počtu 1090 somatických buněk. Zánik těchto buněk během vývojového procesu *C. elegans* je řízen geneticky s pozoruhodnou přesností. Apoptóza je nyní uznána a přijata jako významný a důležitý způsob smrti buněk, která zahrnuje jejich geneticky určenou eliminaci (May a Deng 2006, Elmore 2007).

Apoptóza nastává fyziologicky během vývoje a stárnutí organismu a udržuje homeostázu populací buněk ve tkáních (May a Deng 2006, Elmore 2007). Dospělé lidské tělo se skládá z téměř  $10^{14}$  buněk a odhadem  $10^{11}$  buněk je každý den odstraňováno apoptózou (Voet 2004). Apoptóza je podkladem řady fyziologických pochodů, jako je programovaný zánik buněk během embryogeneze (např. anatomický vývoj populací neuronů CNS, oddělení prstů), apoptóza enterocytů v proliferující buněčné populaci výstelky krypt tenkého střeva, zánik T- i B-lymfocytů po depleci cytokinů, involuce epitelů u dospělých v důsledku nedostatku určitých hormonů (destrukce sliznice endometria během menstruačního cyklu, regrese laktanční žlázy po ukončení kojení). Apoptóza je spuštěna i jako obranný mechanismus při imunitních reakcích (eliminace buněk infikovaných viry) nebo při poškození buněk toxickými látkami, ionizujícím zářením či patobiochemickými pochody v průběhu nemocí (May a Deng 2006, Elmore 2007). U řady zhoubných nádorů jsou spuštění anebo průběh apoptózy nádorových buněk inhibovány (May a Deng 2006, Elmore 2007).

## Morfologické změny u apoptotických buněk

Pomocí světelné a elektronové mikroskopie byly identifikovány různé morfologické změny vyskytující se během apoptózy (Hacker 2000). Počáteční fáze apoptózy epiteliálních buněk se projevuje jejich odtržením od sousedních buněk a extracelulární matrix (přerušení spojů buňka - buňka a buňka – bazální membrána). Objem buňky se zmenšuje, ubývá vody spolu s elektrolyty (zejména ionty  $K^+$ ). Plasmatická membrána (PM) vytváří četné váčkovité výběžky, které jsou retrahovány a opětovně vytvářeny. Proces vesikulace PM se nazývá *zeiosa*, tj. buněčný var (Obr. 1). V průběhu apoptózy v PM nastává ztráta asymetrie rozložení fosfolipidů, zejména fosfatidylserinu, mezi vnitřní a zevní polovrstvou PM. Charakteristickým rysem apoptózy je sraštění buněčného jádra a zahušťování chromatinu (karyopyknóza). Tyto změny jsou provázeny fragmentací DNA s mnohočetnými přerušeními dvojšroubovice DNA (dvojitě zlomy), která nejsou opravitelné a znemožňují biosyntézu funkčních genových transkriptů (Elmore 2007). Následuje fragmentace buněčného jádra, na tzv. mikrojádra, a dále fragmentace buňky na tzv. apoptotická tělíška. Žádná z těchto změn však nezpůsobuje typickou zánětlivou reakci jako je tomu u nekrózy. Uvedené morfologické změny vznikají v efektorové (exekutivní) fázi apoptózy a jsou důsledkem aktivace a aktivity řady enzymů, zejména aktivace zymogenů kaspas, tj. cysteinových aspartátově-specifických proteinas, a jimi působené proteolytické fragmentace mnoha různých proteinů.



Obr.1. vlevo normální lymfocyt, vpravo apoptotický lymfocyt se zeiosou PM

([www.fig.cox.miami.edu](http://www.fig.cox.miami.edu), 1.7.2009)

## Rozlišení mezi apoptózou a nekrózou

Nekróza je nekontrolovatelný a pasivní děj, který je důsledkem bioenergetické katastrofy buněk (způsobené nedostatkem tvorby ATP v mitochondriích) a který obvykle postihuje velké skupiny buněk. Oproti tomu apoptóza je geneticky řízený

proces, závislý na energii ve formě ATP a postihující pouze jednotlivé buňky nebo malé shluky buněk. Oba tyto procesy, jejichž morfologické obrazy jsou porovnány v Tabulce 1, se mohou vyvinout a probíhat nezávisle na sobě, následně, nebo současně (např. v tkáňových infarktech). Zda buňka zanikne apoptózou nebo nekrózou závisí na povaze a intenzitě působení „signálu smrti“, typu tkáně a jejím vývojovém stádiu, a na fyziologické kvalitě vnitřního prostředí (Fiers et al. 1999, Zeiss 2003, Elmore 2007). Při nízkých dávkách různých apoptotických podnětů, jako je např. ionizující a neionizující radiace, hypoxie, cytotoxické látky, teplota, může nastat smrt buňky apoptózou. Ale tytéž podněty ve vysokých dávkách mohou způsobit i nekrózu buněk.

Ztráta integrity buněčné membrány při nekróze má za následek vyplavení cytosolu do okolní tkáně, včetně chemotaktických molekul, a vznik zánětu. Protože apoptotické buňky zpravidla neuvolňují svůj obsah do okolí, neboť jsou rychle fagocytovány makrofágy či sousedními normálními buňkami, nevyvolávají zánětlivou reakci (Savill and Fadok 2000, Elmore 2007).

Tabulka 1. Porovnání morfologických znaků apoptózy a nekrózy

Apopóza	Nekróza
Jednotlivé buňky nebo malé shluky buněk	Velké ložiskové skupiny buněk
Smrštění buňky	Otok buňky
Agregace chromatinu k okrajům vnitřní jaderné membrány, fragmentace shluků chromatinu a vznik mikrojader	Chromatin dispergován
Neporušená buněčná membrána	Ruptury v buněčné membráně
Cytoplasma zachována v apoptotických tělíčkách	Cytoplasma uvolněna do mikrookolí
Bez zánětu	Obvykle přítomný zánět

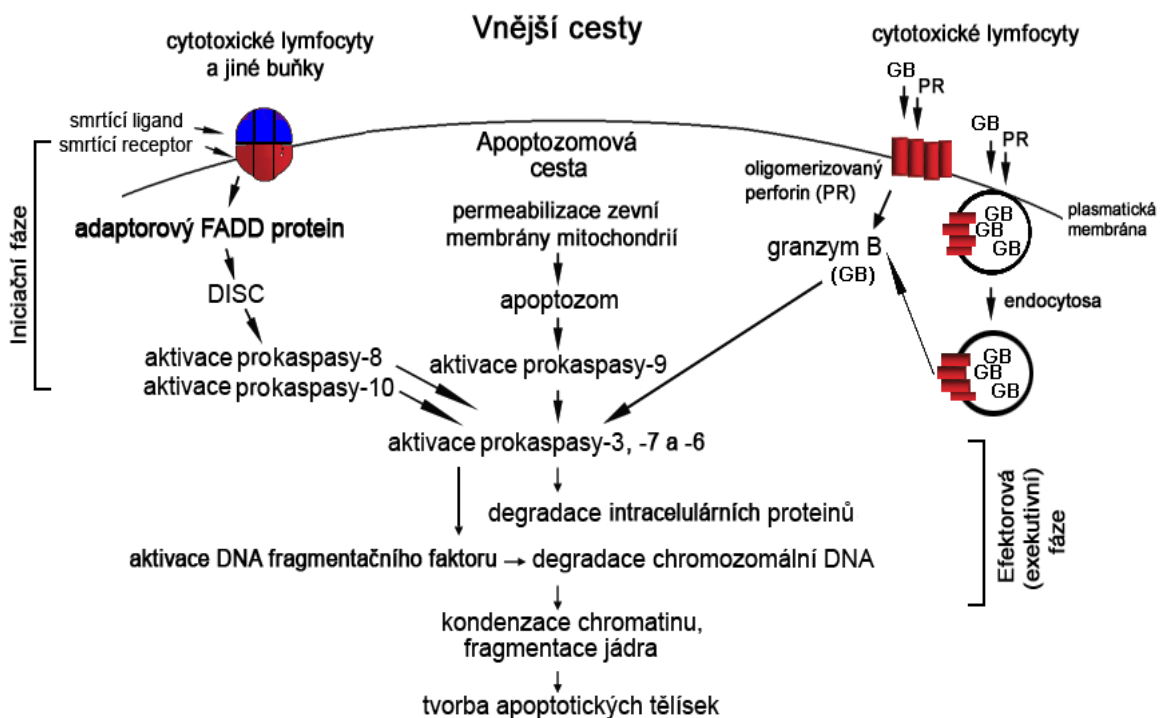
### Mechanismy spuštění apoptózy

Mechanismy apoptózy jsou vysoce komplexní a energeticky náročné procesy, zahrnující kaskádu molekulárních událostí vedoucích k devitalizaci buňky. Signální dráhy vedoucí k apoptóze je možné rozdělit na dvě hlavní skupiny: *vnitřní dráhy*



(intrinsic pathways), k nimž patří PIDDosomová dráha a mitochondriální dráha, sestávající z kaspasa-dependentní složky a kaspasa-independentních složek, a *vnější dráhy* (extrinsic pathways), které jsou zprostředkovány apoptotickými receptory a dále granzymy, tj. sekrečními serinovými proteinasami cytotoxických lymfocytů, zejména granzymem B (Obr.2).

Vnitřní a vnější signální cesty apoptosy vedou ke spuštění efektorové (exekutivní) fáze apoptózy. Tato fáze je zahájena proteolytickou aktivací zymogenů efektorových kaspas, tj. prokaspasy-3, -7 a -6. Aktivní kaspasy -3, -7 a -6 vykonají fragmentaci mnoha desítek cytosolových, cytoskeletárních, membránových a jaderných proteinů (Slee et al. 2001, Sakahira et al. 1998) čímž dojde v důsledku ireversibilní ztráty vnitřní a vnější molekulární integrity a dynamiky k devitalizaci buňky a k expresi specifických molekulárních signálů na povrchu apoptotických buněk a jejich fragmentů. Takto jsou apoptotické buňky označeny k fagocytóze.



Obr. 2. Zjednodušené schema apoptotických cest (upraveno podle Elmore 2007)

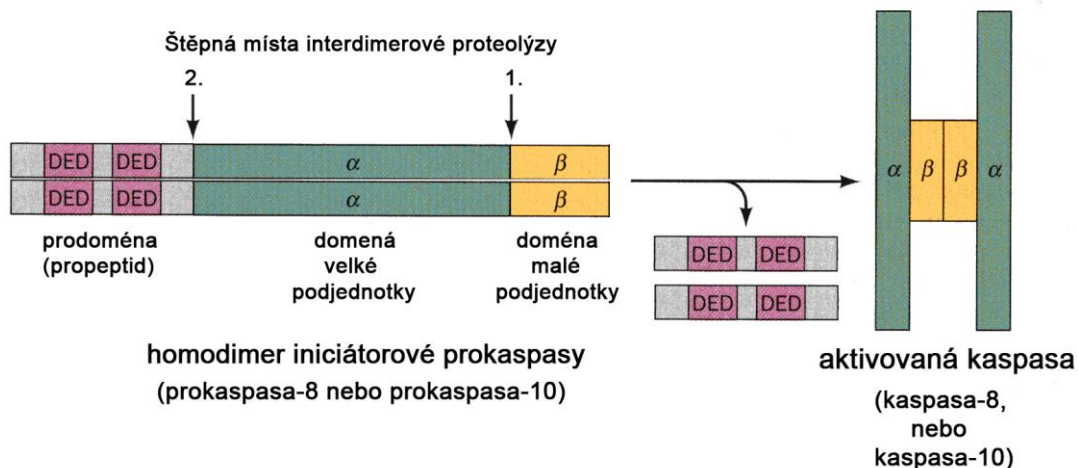
## Kaspasy

Vlastní proces apoptózy nastává proteolýzou intracelulárních bílkovin, které jsou pro buňku životně důležité. Enzymy, které tuto proteolýzu katalyzují, se nazývají kaspasy

(caspase = cysteine aspartate-specific proteinase, aspartát-specifické cysteinové proteínasy). Tyto proteínasy štěpí substrátovou proteínovou molekulu za zbytkem aspartátu. Kaspasy jsou členy tzv. ICE (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme) rodiny cysteinových proteínas. Jsou syntetizovány v neaktivní formě jako proenzymy (zymogeny), prokaspasy, a jsou ve viabilních buňkách lokalizovány v cytoplasmě. Prokaspasa-2, která obsahuje sekvenci aminokyselin s funkcí jaderného lokalizačního signálu, je však lokalizována jak v cytoplasmě, tak v buněčném jádře.

U člověka bylo dosud identifikováno 11 různých kaspas. Z toho: 4 kaspasy, kaspasa-2, -8, -9, a -10, se účastní spuštění apoptózy, a proto se nazývají *iniciátorové apoptotické kaspasy*; 3 kaspasy, kaspasa-3, -6, -7, se podílejí na průběhu efektorové (exekutivní) fáze apoptózy proteolytickou fragmentací mnoha pro buňku životně důležitých proteinů a proteolytickou aktivací (kaspasa-3) DNA fragmentačního faktoru (DFF) (Widlak a Garrad 2005 a 2009), a proto se nazývají *efektorové (exekutivní) apoptotické kaspasy*; 3 kaspasy, kaspasa-1, -4, -5, jsou důležité pro spuštění zánětu, a proto se nazývají *inflamatorní kaspasy*; kaspasa-14 se podílí na diferenciačních procesech (Cohen 1997, Hu et al. 1998, Denault a Salvesen 2002, Fuentes-Prior a Salvesen 2004).

*Iniciátorové apoptotické prokaspasy* mají dlouhou N-terminální prodoménu. Tato prodoména u prokaspasy-8 a -10 obsahuje tandem dvou tzv. DED (death effector domain) domén a u prokaspas-2 a -9 pak tzv. CARD (caspase activation recruiting domain) doménu. Tyto prokaspasy se vyskytují jako monomery, jsou inducibilně aktivovány homodimerizací (Obr. 3) v multiproteinových iniciačních komplexech (DISC, apoptozom, PIDDozom) a následně jsou strukturně upraveny na kaspasy interdimerovou proteolýzou. *Efektorové (exekutivní) apoptotické prokaspasy* mají naproti tomu krátkou N-terminální prodoménu, která neobsahuje specifické strukturální moduly. Tyto prokaspasy se vyskytují jako homodimery a jsou inducibilně aktivovány proteolytickou fragmentací účinkem *iniciátorových apoptotických kaspas*. *Efektorové (exekutivní) apoptotické prokaspasy* mají ve srovnání s *iniciátorovými apoptotickými kaspasami* mnohem širší spektrum proteinových substrátů (Fischer et al. 2003, Timmer a Salvesen 2007). Aktivované kaspasy jsou  $\alpha_2\beta_2$  heterotetramery, složené ze dvou velkých  $\alpha$  podjednotek a dvou malých  $\beta$  podjednotek (Obr. 3).



Obr. 3. Aktivace iniciátorové prokaspasy (upraveno podle Voeta 2004)

### Vnější cesty apoptózy

Jedna z vnějších cest aktivace apoptózy začíná na plazmatické membráně oligomerizací a aktivací apoptotických receptorů („receptorů smrti“). Tento proces je zpravidla navozen spontánně trimerizovanými cytokiny typu apoptotických bílkovinných ligandů (např. FasL, TRAIL), které se navazují na své komplementární monomerní receptory exprimované v plazmatické membráně buňky. Vznikají tedy komplexy apoptotický ligand/apoptotický receptor (death-ligand/death-receptor). Mezi apoptoticky nejúčinnější komplexy ligand/receptor patří FasL (Apo-1L)/FasR, TRAIL (Apo-2L)/DR4 a TRAIL (Apo-2L)/DR5 (May a Deng 2006, Elmore 2007). Buňky, které ve své plazmatické membráně exprimují apoptotické ligandy se nazývají *apoptózu indukující buňky*. Buňky, které byly uvedeny do apoptózy apoptotickými ligandy jiných buněk se nazývají *apoptózu vykonávající buňky*. Apoptotické receptory, exprimované v plazmatické membráně, mají extracelulární doménu, na kterou se váže komplementární apoptotický ligand exprimovaný v plazmatické membráně *apoptózu indukující(ch) buňky (-něk)*, a intracelulární DD doménu (DD-death domain; smrtící doména). Pro spuštění apoptózy je zapotřebí trimerizace monomerních apoptotických receptorů účinkem trimerizovaného komplementárního apoptotického ligandu, což vede k navázání adaptorových molekul FADD jejich DD doménami na DD domény ligandovaných apoptotických receptorů. Následuje navázání molekul prokaspasy-8 nebo -10 jejich DED doménami na DED domény navázaných FADD molekul. Tím se vytvoří multiproteinový aktivační komplex prokaspasy-8 a -10 zvaný DISC (death inducing signaling complex; smrt indukující signální komplex). V DISCích nastává

homodimerizace a tím aktivace prokaspasy-8 a -10 a jejich interdimerová proteolytická úprava. Během ní se homodimery aktivních prokaspas navzájem rozštěpí nejprve v místech mezi doménami velké a malé podjednotky a poté mezi prodoménou a doménou velké podjednotky. Druhá proteolýza tedy vede k uvolnění aktivní kaspasy-8 a -10 z DISCu do cytoplasmy.

Aktivované cytotoxické lymfocyty (CTLs) jsou schopny zabíjet cílové buňky (exprimující receptory Fas, DR4 a DR5) nejen působením FasL a TRAILu, ale rovněž vektoriální sekrecí granzymů (serinových proteinas), zejména granzymu B a perforinu, do imunologické synapse (konjugační zóny) mezi cílovou buňkou a CTL(s). Ta je vytvořena po rozpoznání cílové buňky kontaktované CTL(s). Ze štěrbin imunologické synapse jsou granzym B (a další granzymy) i perforin internalizovány do cílových buněk endocytózou. Apoptotické působení granzymu B (a další granzymů) v cílové buňce nastane až po jejich translokaci z endocytárních vesikul do cytoplasmy. Apoptotické působení granzymu B je mnohočetné a spočívá: 1) v přímé proteolytické aktivaci prokaspasy-3 a -7; 2) v permeabilizaci zevní membrány mitochondrií (a tím ve spuštění mitochondriálních cest apoptosy) prostřednictvím proteolytické fragmentace proapoptotického proteinu Bid a antiapoptotického proteinu Mcl-1 (je v komplexu s Bim); a 3) v přímé proteolytické aktivaci DFF po translokaci do buněčného jádra (Trapani and Smyth 2002, May a Deng 2006, Elmore 2007).

### **Vnitřní cesty apoptózy**

Vnitřní cesty apoptózy jsou iniciovány rozmanitou škálou nereceptorových podnětů, které vytvářejí intracelulární signály působící přímo na vnitřní cíle v buňce. Tyto cesty vycházejí z mitochondrií anebo lysosomů po permeabilizaci jejich membrány přímým nebo nepřímým účinkem různých buněčných stresorů, např. nedostatkem určitého růstového faktoru, hormonu nebo cytokinu, toxiny, genotoxiny, chemoterapeutiky, volnými radikály, ionizující a neionizující radiací, hypoxií, hypertermií nebo virovou infekcí. Tyto podněty vedou ke zvýšení permeability nebo ruptuře zevní mitochondriální membrány, jejímž důsledkem je únik intermembránových mitochondriálních proteinů do cytoplasmy (Saelens et al. 2004, May a Deng 2006, Elmore 2007).

Jedna skupina proapoptotických mitochondriálních proteinů, zahrnující cytochrom-c (cyt-c), Smac protein (second mitochondria-derived activator of caspases) a serinovou

proteinasu HtrA2 (high temperature requirement protein A2), aktivuje v cytoplasmě apoptozomovou kaspasovou dráhu. Přitom cyt-c se váže na komplex dATP•Apaf-1 protein čímž dojde k hydrolyze dATP na dADP a nukleotidové výměně dADP za nový dATP se současným otevřením konformace Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) proteinu. Na následně vytvořený heptamer Apaf-1 proteinu se svými CARD doménami navážou monomery prokaspasy-9. Ty následně vytvoří homodimery a interdimerovou proteolýzou mezi doménami velké a malé podjednotky se změni na aktivní kaspasu-9. Kaspasa-9 je aktivní pokud je navázána v apoptozomu a její funkcí je proteolyticky aktivovat zymogeny efektorových prokaspas -3 a -7 (Eckelman et al. 2006).

Smac protein a serinová proteinasa HtrA2 podporují apoptózu tím, že se v cytoplasmě navážou na bílkovinné inhibitory apoptózy s BIR doménou (tzv. IAPs; inhibitors-of-apoptosis proteins) a potlačují jejich antiapoptotickou aktivitu, čímž podporují pokračování apoptotické kaskády.

Do druhé skupiny proapoptotických mitochondriálních proteinů patří AIF (apoptosis inducing factor) a endonukleasa G (Endo-G). AIF a Endo-G jsou transportovány do jádra kde způsobí štěpení DNA na fragmenty o velikosti ~50-300 kbp (kilopárobází) a kondenzaci chromatinu (Joza et al. 2001, Widlak a Garrard 2005).

Spuštění mitochondriálních cest apoptosy je negativně i pozitivně regulováno proteiny Bcl-2 rodiny (Cory a Adams 2002). Antiapoptotické proteiny této rodiny (např. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-W a Bag) blokují permeabilizaci zevní mitochondriální membrány, zatímco proapoptotické proteiny této rodiny (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk a Bcl-10) ji podporují. Antiapoptotické i proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny mají pro iniciaci mitochondriální apoptózy velký význam, protože převaha funkce jedné z uvedených podrodin může rozhodnout o tom, zda buňka dokončí svůj zánik apoptózou nebo bude celý apoptotický proces zastaven (Ravagnan et al. 2002).

### **Efektorová fáze**

Efektorová fáze začíná aktivací zymogenů efektorových (exekutivních) kaspas -3,-7 a -6. Tyto aktivní kaspasy se podílí na apoptotické devitalizaci buňky tím, že proteolyticky fragmentují a tím inaktivují nebo naopak aktivují mnoho proteinů důležitých pro viabilitu buňky, resp. pro zahájení či průběh apoptózy (Fischer et al. 2003, Timmer a Salvesen 2007). Aktivní kaspasa-3 po translokaci z cytoplasmy do

buněčného jádra proteolyticky aktivuje DNA fragmentační faktor (DFF), resp. jeho endonukleasovou podjednotku DFFB tím, že proteolyticky rozštěpí inhibiční podjednotku DFF, tj. DFFA, která je v inhibičním/ chaperonovém komplexu s DFFB (Widlak a Garrad 2005 a 2009). Aktivní deoxyribonukleasa DFFB je homodimer (popř. vyšší oligomer), která štěpí jadernou DNA na tzv. oligonukleosomální fragmenty, přičemž nejkratší fragment má délku přibližně 200 párů bází (Widlak a Garrad 2005 a 2009).

### **Fagocytární fáze**

Poslední částí apoptózy je úklid apoptotických buněk a tělísek. Na jejich povrchu jsou vystaveny molekuly fosfatidylserinu a další molekulární rozpoznávací znaky, které jsou rozeznány a navázány specifickými receptory fagocytujících buněk, tj. makrofágy, resp. histiocyty, a popř. dalšími buňkami přicházejícími do kontaktu s apoptotickými buňkami a tělísky. Některé receptory fagocytujících buněk mají pouze funkci navazovací, jiné, např. receptor (-y) fosfatidylserinu mají i funkci signální a spouští vlastní proces pohlcení apoptotických buněk a tělísek.

### **Patologie apoptózy**

Abnormality v regulaci, resp. účinnosti apoptózy mohou být významnou součástí vzniku různých onemocnění (May a Deng 2006, Elmore 2007). Nadměrná apoptóza je sdružena např. se syndromem získané imunitní nedostatečnosti (AIDS), aplastickou anémií, diabetes mellitus typu I, neurodegenerativními chorobami (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Kenedyho choroba), roztroušená skleróza, ischemicko-reperfúzní syndrom, myelodysplastický syndrom, spinální svalová atrofie, Wilsonova choroba a široké spektrum vývojových vad. Suprese apoptózy je sdružena se vznikem a progresí solidních zhoubných nádorů a leukemií i autoimunitních chorob, např. lymfoproliferativních autoimunitních syndromů, Hashimotovy strumy, systémového lupus erythematodes, revmatoidní artritidy a také různých vývojových vad (Fadeel et al. 1999, May a Deng 2006).

## **Inhibitory apoptózy**

### **Rodina IAPs**

Bílkovinné inhibitory apoptózy s BIR doménou (IAPs, tj. inhibitor of apoptosis proteins) jsou endogenní proteiny, které inhibují zevní i vnitřní dráhy apoptózy. Prvním objeveným neviróvým buněčným savčím IAP byl NAIP (BIRC1; neural apoptosis-inhibitory protein). Poté bylo objeveno dalších sedm IAPs: cIAP1 (BIRC2; cellular IAP), cIAP2 (BIRC3; cellular IAP), XIAP (BIRC4; X-linked IAP), survivin (BIRC5), apollon (BIRC6), livin (BIRC7; známý také jako melanoma IAP (ML-IAP)), ILP2 (BIRC8; IAP-like protein 2). Následně bylo všech osm inhibitorů apoptózy rozděleno do tří tříd dle jejich struktury, funkce a exprese (Verhagen et al. 2001, Dean et al. 2007). V buňkách jsou dva mechanismy ukončení aktivity kaspas: prvním je inhibice jejich enzymatické aktivity, druhým je proteolytická degradace ubikvitinylované kaspasy v proteozomu (Riedl a Shi 2004, Eckelman et al. 2006). IAPs regulují různé buněčné procesy: apoptózu i dělení buněk, neapoptotickou intracelulární signalizaci a homeostázu mědi (Hunter et al. 2007, LaCasse EC et al. 2008, Srinivasula a Ashwell 2008).

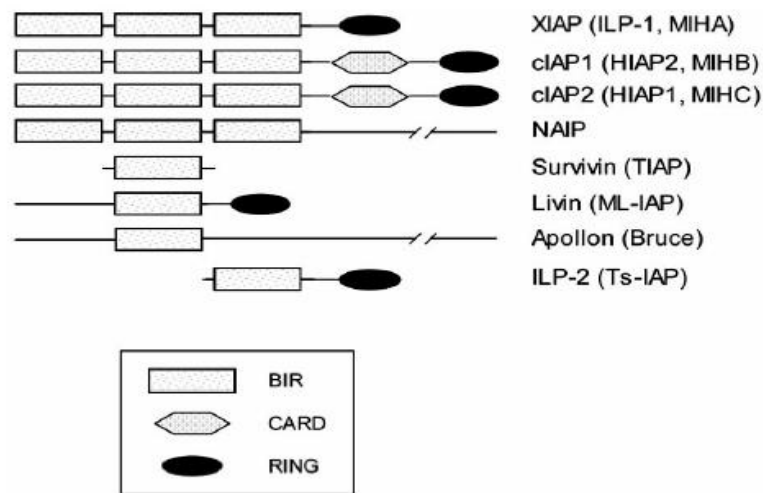
První IAP byl identifikován u baculoviru a byly zjištěny jeho schopnosti inhibovat apoptózu napadených hmyzích buněk (Crook et al. 1993, Dubrez-Daloz et al. 2008). Geny kódující molekuly IAPs byly pak identifikovány u evolučně značně vzdálených organismů: virů, kvasinek, hlístic, ryb a savců.

Do popředí našeho zájmu se dostali především XIAP a survivin, jako potenciální terapeutické cíle při léčbě rakoviny. Těmto dvěma členům IAP rodiny budu dále věnovat nejvíce pozornosti.

### **Struktura IAPs**

IAPs jsou složené z několika proteinových domén, které mají specifické funkce a určují jejich činnost. IAPs jsou si strukturně podobné, obsahují jednu nebo tři BIR (Baculovirus IAP repeat) domény (Obr. 4). BIR doména je úsek 70-80 aminokyselin skládající se z variabilní sekvence CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>HX<sub>6</sub>C (C=cystein, H=histidin, X=jiná aminokyselina) a tvořící kulovité struktury, které obsahují tři nebo čtyři  $\alpha$ -helixy a

různý počet antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů stabilizovaných atomem zinku. Až na některé výjimky většina BIR domén obsahuje ve svém povrchu vazebná místa (tzv. IBM-interacting exosite) pro N-konec aminokyselinových sekvencí známých jako IBM (IAP binding motif) sekvence (Shi 2002, Dubrez-Daloz et al. 2008). IBM se vyskytuje v různých proteinech, např. Smac, HtrA2, malé podjednotce kaspasy-9, -3 a -7 (Vaux a Silke 2003, Dubrez-Daloz et al. 2008). Nejmenší člen rodiny IAPs survivin obsahuje pouze BIR doménu, zatímco struktura ostatních IAPs je složitější.



Obr. 4. Strukturní domény v molekulách IAPs (Fulda 2008)

Další strukturní doménou vyskytující se v IAPs je tzv. RING (really interesting new gene), která leží v karboxyterminální oblasti, obsahuje strukturu „zinkového prstu“ a má funkci E3-ubikvitin ligasy (Vaux a Silke 2005, Dubrez-Daloz et al. 2008). Účinkem této domény jsou IAPs ubikvitinylovány nebo jsou ubikvitinylovány jejich vazební partneři jako je kaspasa-3, -7, -9, Smac, ASK1 (apoptotic signal-regulating kinase 1) a další (Juany et al. 2000, Dubrez-Daloz et al. 2008). RING doménu obsahují XIAP, cIAP1, cIAP2, livin a ILP-2.

CARD (caspase activation recruitment domain) je další důležitou doménou. Vyskytuje se v c-IAP1 a c-IAP2 a je umístěna mezi třetí BIR doménou a RING doménou (Fulda 2008). CARD zprostředkuje interakci s jinými proteiny nesoucími CARD doménu (Fulda 2008).

Protein NAIP je atypický, kromě základní BIR domény obsahuje ještě centrální NOD (nucleotide-binding oligomerisation domain) a C-terminální LRR (leucine rich



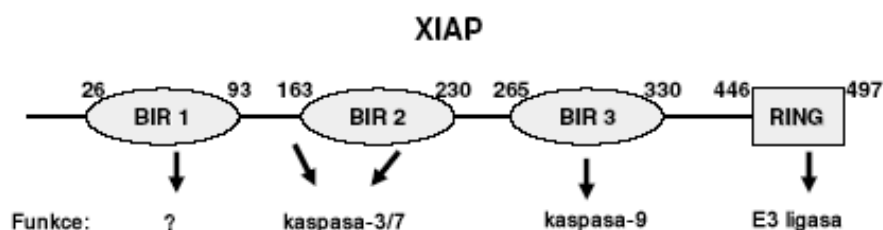
repeat). NOD je oligomerizační doména a LRR má patrně význam pro v detekci specifického ligandu.

Survivin ve své molekule obsahuje jednu BIR doménu a C-terminální coiled-coil (CC) doménu, která zprostředkovává lokalizaci survivinu na mikrotubulech během mitosy (Li 1998, Dean et al. 2007).

## Funkce IAPs

Uvedené apoptotické signální dráhy konvergují do aktivace efektorových prokaspas. Pro správný vývoj a přežití organismu je přesná regulace kaspas naprosto zásadní a jejich nepřiměřená aktivace může mít závažné následky, pokud jde o vznik různých onemocnění. Primární regulace proapoptických kaspas se uskutečňují na úrovni genové exprese a na úrovni posttranslačního mechanismu jejich aktivace. Jak již bylo popsáno v kapitole o těchto enzymech, kaspasy jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy a následně aktivovány přesně kontrolovanými procesy. Na regulaci aktivace a aktivity kaspas -9, -3 a -7 se podílí specifické intracelulární bílkovinné inhibitory patřící do rodiny IAPs (Deveraux et al. 1999, Hunter et al. 2007). Z rodiny IAPs je však pouze XIAP pravým inhibitorem kaspas, a to kaspasy-9, -3 a -7, ostatní IAPs jen váží kaspasy, ale neinhibují je (Eckelman et al. 2006).

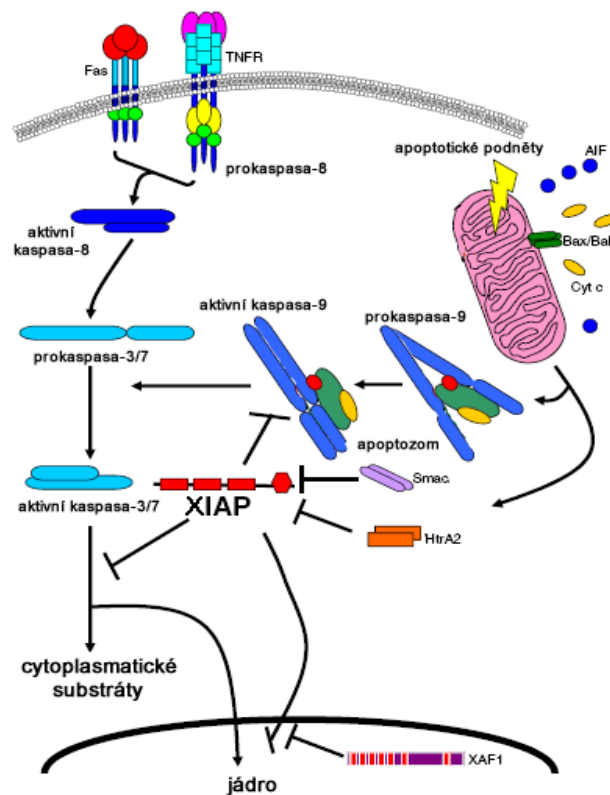
XIAP (BIRC4), známý také jako hILP, je protein o hmotnosti přibližně 57 kDa, obsahuje tři BIR domény (BIR1-3) a jednu RING doménu, jejichž známé interakce a funkce jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5. Struktura XIAP (Schimmer et al.2006)

Funkce XIAPu je naznačena na obrázku 6. Studie ukazují, že BIR1 doména má úlohu mimo inhibování kaspas, a to jako silný regulátor buněčného cyklu a mitosy (Uren et al. 1999, Schimmer et al. 2006). BIR2 doména s částí spojovacího peptidového linkeru, umístěného na N-konci BIR2 domény, váže a inhibuje kaspasu-3 a -7. Pokrývá v kaspase-3 či -7 celou vazebnou část pro substrát, čímž blokuje aktivní místo těchto

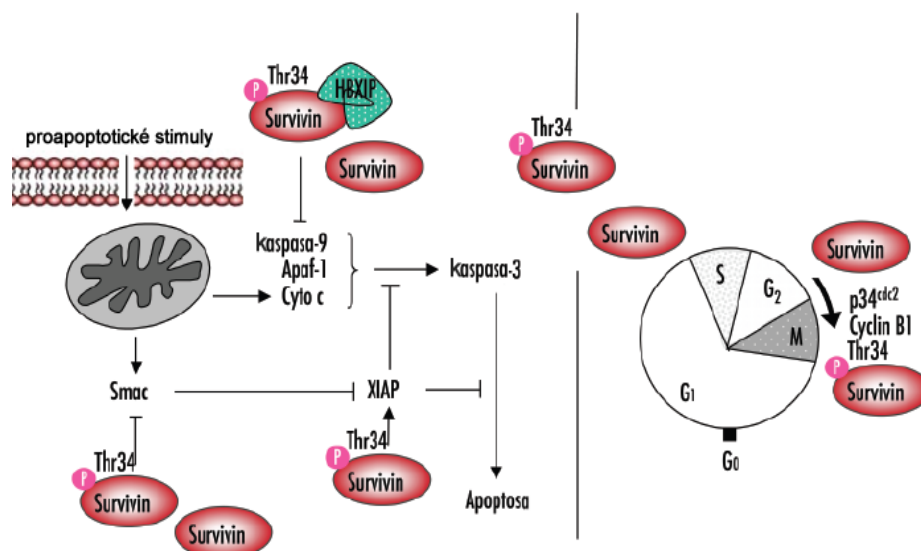
kaspas (Sun et al. 1999, Schimmer et al. 2006). BIR3 doména váže a sekvstruje monomer kaspasy-9, čímž se předchází aktivaci kaspasy-9. BIR3 interaguje s N-koncovou sekvencí menší podjednotky kaspasy-9 a dále s částí povrchu menší podjednotky kaspasy-9, který je nutný pro její homodimerizaci. Výsledkem je „uzamknutí“ neaktivní monomerní formy kaspasy-9 v heterodimeru XIAP•kaspasa-9, v němž kaspasa-9 nemá schopnost katalyticky štěpit bílkovinné substráty (Shiozaki et al. 2003, Schimmer et al. 2006). BIR2 a BIR3 domény XIAPu obsahují tzv. IBM-vazebná místa vážící v proteinech N-koncové aminokyselinové sekvence s charakterem IBM. V C-terminální části sekvence XIAPu je tzv. RING doména, která má ubikvitin E3-ligasovou aktivitu. Ta je schopna podporovat degradaci proteinů značením jejich molekuly molekulami ubikvitinu, což je polypeptid. Ubikvitinem označuje XIAP i sám sebe a podněcuje tak svou vlastní destrukci (Yang et al. 2000, Schimmer et al. 2006). Prostřednictvím RING domény XIAP ubikvitinyluje také své endogenní antagonisty Smac a Htra2. Mutace této domény snižuje, ale nezruší antiapoptotický efekt XIAP proteinu (Schimmer et al. 2006).



Obr. 6. XIAP inhibuje apoptózu vazbou na aktivní kaspasu-9, -3 a -7 (upraveno podle Huntera et al. 2007)

XIAP může také inhibovat apoptózu prostřednictvím mechanismů, které nesouvisí s jeho schopností vázat kaspasy. Funguje jako regulátor buněčné signalizace, buněčné proliferace, maturace T-lymfocytů, aktivuje NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), což je transkripční faktor, který má silný proliferační a antiapoptotický účinek, napomáhá přežití postmitotických neuronů a kardiomyocytů při zvýšené zátěži a účastní se dalších důležitých buněčných procesů (Dubrez-Daloz et al. 2008). XIAP je exprimován v mnoha normálních dospělých tkáních (Dubrez-Daloz et al. 2008).

Survivin (BIRC5) je protein o hmotnosti 17 kD, který obsahuje jednu BIR doménu a CC doménu. Jeho role spočívá v regulaci apoptózy i mitózy buněk. Je vysoce exprimován v dělicích se normálních buňkách (s maximem exprese v G<sub>2</sub>/M fázi buněčného cyklu) a v nádorových buňkách, v nichž často jeho exprese není závislá na fázi buněčného cyklu. Ve zdravých tkáních dospělých jedinců se survivin exprimuje pouze minimálně (Ambrosini et al. 1997, Dean et al. 2007, Zangemeister-Wittke a Simon 2004).



Obr. 7. Úloha survivinu při apoptóze a jeho vazební partneři, exprese survivinu ve zdravých dělicích se buňkách ve fázi G<sub>2</sub>/M buněčného cyklu (Zangemeister-Wittke a Simon 2004)

Survivin se v buňkách vyskytuje v cytoplasmě a v jádře, a to v poměru 6:1 (Fortugno et al. 2002) a v nádorových buňkách je přítomen rovněž v intermembránovém prostoru mitochondrií (Dohi et al. 2004a). Po permeabilizaci zevní mitochondriální membrány se mitochondriální pool survivinu uvolní do cytoplasmy, kde interaguje s vazebnými

partnery, tj. s proteiny XIAP a HBXIP (Obr. 7), které zprostředkují jeho anti-apoptickou funkci (Dohi et al. 2004b, Marusawa et al. 2003). Survivin společně s HBXIP proteinem (hepatitis B X-interacting protein) tvoří proteinový komplex, který váže prokaspasu-9 a tím znemožní její aktivaci v apoptozomu (Marusawa et al. 2003). Survivin dále tvoří komplex s XIAP proteinem, a to prostřednictvím své BIR domény a BIR1 a BIR3 domén XIAPu. V tomto komplexu je zvýšena stabilita XIAPu a XIAP má vyšší inhibiční účinek na aktivitu kaspasy-9 (Dohi et al. 2004b).

### **IAPs jako terapeutické cíle při léčbě rakoviny**

Světová zdravotnická organizace odhaduje, že se každým rokem diagnostikuje 11 milionů nových případů rakoviny a tyto počty budou nadále stoupat. Plicní rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na rakovinu na celém světě. Častěji postihuje muže, ale i u žen její incidence stoupá (web WHO). Postupný vznik zhoubného nádoru je multifaktoriální a složitý proces, který zahrnuje transformaci normálních zdravých buněk v buňky nádorové, jejich proliferaci v primární nádor, která je provázena neovaskularizací, a progresivní růst nádoru s jeho lokální invazí a popřípadě i šířením (metastazování) hematogenní či lymfatickou cestou do vzdálených orgánů. Hlavními znaky vzniku a vývoje maligního nádoru jsou: soběstačnost buněk v tvorbě růstových signálů, necitlivost buněk vůči inhibičním růstovým signálům, únik z apoptózy, neomezený replikační potenciál, trvalá neoangiogeneze, histoinvaze nádoru a jeho metastázování (Hanahan a Weinberg 2000).

Mnoho nádorových buněčných linií i primárních nádorů vykazuje zvýšenou či nadměrnou expresi IAPs. Tyto biochemické změny jsou nejmarkantněji vyjádřeny u survivinu. Survivin je exprimován zejména v různých embryonálních tkáních a rovněž v mnoha typech nádorů, zatímco v diferencovaných buňkách zdravých tkání dospělých jedinců je exprimován minimálně. Přítomnost vysoké hladiny survivinu ve vzorku biopsie nádoru často koreluje se špatnou prognózou onemocnění, zvýšenou mírou selhávání léčby a relapsem nádorové nemoci (Ambrosini et al. 1997, Hunter et al. 2007, LaCasse et al. 2008,). IAPs jiné než survivin však nemají stejný klinickopatologický význam u různých nádorových nemocí. Např. zvýšená exprese XIAPu koreluje se špatnou prognózou a závažností onemocnění u akutní myeloidní leukémie (AML) a renálního karcinomu (Hess et al. 2007), ale nikoli u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) (Ferreira et al. 2001a). Zvýšená exprese XIAPu je spojena s kratším

přežíváním a nižší odpovědí na léčbu u AML (Hess et al. 2007), ale nikoli s odpovědí na klasickou chemoterapii u nemocných s pokročilým NSCLC (Ferreira et al. 2001b).

Primární nebo získaná rezistence na běžně používanou chemoterapeutickou léčbu je hlavní překážkou efektivní nechirurgické léčby nádorů. Díky současným poznatkům, které ukazují na zásadní úlohu IAPs v regulaci apoptózy nádorových buněk, se objevují návrhy využít inhibici exprese a funkce IAPs jako terapeutickou strategii pro biologickou léčbu zlovolných nádorů (LaCasse et al. 2008). XIAP je hlavním inhibitorem efektorových kaspas, a proto je většina těchto přístupů zaměřena na jeho neutralizaci či eliminaci jeho exprese. Mnohé klinické studie se zabývají využitím tzv. AS ODNs (antisense oligodeoxynucleotides) jako selektivních inhibitorů v expresi genů. AS ODNs jsou malé úseky DNA, přibližně 12-30 nukleotidů dlouhé a komplementární pro specifické vlákno mRNA. Hybridizace AS ODNs a specifické mRNA zabraňuje translaci této mRNA a tak se blokuje exprese proteinu kódovaného danou mRNA a dále dochází ke zvýšené degradaci této mRNA (Galderisi et al. 1999, Hunter et al. 2007, LaCasse et al. 2008). Další strategií je použití tzv. bifunkčních Smac mimetik, malých molekul navazujících se na BIR3 doménu XIAPu a cIAPů. Tím se blokuje jednak vazebné místo na BIR3 doméně XIAPu pro kaspasu-9 a jednak se indukuje ubikvitinylace IAPs molekul spojených molekulou bifunkčního Smac mimetika (LaCasse et al. 2008). Stejně jako zvýšená exprese Smac proteinu, tak i Smac mimetika inhibují anti-apoptotickou funkci různých IAPs (Dean et al. 2007, Li et al. 2004).

## ELISA

### Imunochemické metody

Imunochemické metody využívají interakce antigenu (Ag) se specifickou protilátkou (Ab) *in vitro* za tvorby imunokomplexu Ag•Ab. Stanovení tohoto imunokomplexu je možné po navázání vhodné značky na jednoho z imunoreaktantů. Různé typy imunoanalýz jsou popsány v Tabulce 2.

Tabulka 2. Rozdělení imunoanalytických metod dle použitého značení reaktantu

Imunoanalýza	Zkratka	Použité značení
Radioimunoanalýza	RIA	radioizotopem
Enzymová imunoanalýza	EIA	enzymem
Fluoroimunoanalýza	FIA	fluorochromem
ChemiLuminiscenční imunoanalýza	CLIA, LIA	chemiluminoforem

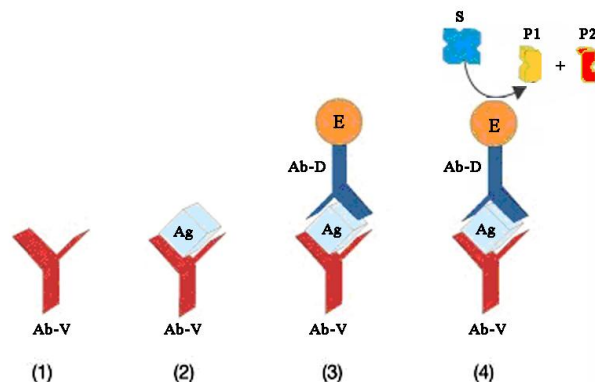
Nejlepší antigenní vlastnosti mají bílkoviny. Antigenem může být i protilátka. V laboratorní praxi se každá imunochemicky (tj. pomocí protilátek) stanovovaná molekula (analyt), např. různé endogenní a exogenní typy biopolymerů a organických sloučenin, většinou označuje jako antigen. Jednotlivé imunochemické analytické metody můžeme rozdělit na kompetivní (neznačený antigen soutěží o vazebná místa protilátek s přidaným značeným antigenem) a nekompetitivní (např. sendvičová imunoanalýza, v níž se antigen naváže mezi dvě specifické protilátky). Imunochemické analytické metody mohou být dále klasifikovány jako heterogenní (vyžadují separaci volné a vázané frakce antigenu) nebo homogenní (nevyžadují separaci volné a vázané frakce analytu) (Hage 1999).

## ELISA

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) patří do skupiny enzymových imunoanalýz (EIA) a je jednou z nejpoužívanějších a nejběžnějších imunoanalýz v biochemických a klinicko-biochemických laboratořích. Je to metoda poměrně rychlá, přesná, citlivá a reprodukovatelná a může detekovat antigeny v pikogramových ( $10^{-12}$  g)

koncentracích v biologických tekutinách (např. séru, plasmě, exsudátech) nebo v buněčných a tkáňových lysátech. ELISA využívá jako detekčního činidla protilátku s kovalentně navázaným enzymem (tj. konjugát protilátky s detekčním enzymem), jehož aktivita je měřena pomocí určitého chromogenního nebo fluorogenního substrátu.

ELISA patří mezi heterogenní analýzy a může se dále dělit na přímou (direct ELISA), nepřímou (indirect ELISA), kompetitivní (competitive ELISA) a nekompetitivní neboli sendvičovou (sandwich ELISA) (Hornbeck 1991). Pro účely našeho výzkumu jsme použili metodu ELISA sendvičového typu pro detekci rozpustného (cytosolového) antigenu (Obr. 8.).



Obr. 8. Sendvičová ELISA, schema jednotlivých kroků analýzy ([www.bendermedsystems.com/elisa](http://www.bendermedsystems.com/elisa))

### Popis jednotlivých kroků sendvičové ELISA metody

Krok 1) Potažení povrchu jamky mikrotitrační destičky vyvazovací protilátkou (Ab-V); promytí a zablokování (blokačním pufrem obsahujícím indiferentní protein) těch míst povrchu jamky, která nebyla potažena molekulami vyvazovací protilátky.

Krok 2) Přidání vzorku obsahujícího stanovovaný antigen (Ag), následné navázání antigenu na imobilizovanou vyvazovací protilátku; odmytí nenavázaného antigenu.

Krok 3) Navázání detekční protilátky (Ab-D), značené enzymem, na antigen, zachycený imobilizovanou vyvazovací protilátkou (detekční protilátka nesmí reagovat s imobilizovanou protilátkou bez přítomnosti antigenu); odmytí nenavázané detekční protilátky.

Krok 4) Štěpení přidaného substrátu (S) enzymem na detegovatelný a kvantifikovatelný produkt (signál) (např. P2). Výsledný signál je změřen v destičkovém fotometru nebo fluorimetru (absorbance nebo fluorescence) a je přímo úměrný koncentraci stanovovaného antigenu v analyzovaném vzorku.

## **Materiál a pracovní postup**

### **Odběr a typy použitých tkání**

Pacienti s karcinomem plic, kteří vstoupili do naší výzkumné studie, byli léčeni primárně chirurgicky (lobektomie nebo bilobektomie plíce nebo pneumonektomie s disekcí regionálních lymfatických uzlin). Z operačního resektátu byl vždy excidován vzorek primárního plicního nádoru (značeno **Tu**) a kontrolní vzorek nádorem nezasazeného plicního parenchymu (značeno **Lu**). Vzorek kontrolní plicní tkáně byl odebrán z místa, které bylo co možná nejvzdálenější od místa primárního nádoru. Vzorky měly čerstvou vlhkou hmotnost v rozmezí **190-240 mg**. Všechny vzorky byly vloženy v kryozkumavkách a ihned přeneseny do kontejneru s kapalným dusíkem, kde byly rychle zmazeny. Vzorky byly pak uchovávány při  $-78^{\circ}\text{C}$  v hlubokomrazících skříních do doby dalšího zpracování.

Histopatologická klasifikace plicních nádorů byla provedena dle kritérií Světové zdravotnické organizace (WHO) (Travis et al. 2004). Do naší studie byly zařazeny tyto typy nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC, non-small cell lung carcinoma; n = 88): dlaždicobuněčný karcinom plic (SQCLC, squamous cell lung carcinoma; n = 39), adenokarcinom plic (LAC, lung adenocarcinoma; n = 38), smíšený karcinom plic typu SQCLC+LAC (n = 3), velkobuněčný karcinom plic (LCLC, large cell lung carcinoma; n = 2), sarkomatoidní karcinom plic (SLC, sarcomatoid lung carcinoma; n = 3) a nediferencovaný karcinom plic (UNDIF, undifferentiated lung carcinoma; n = 3). Stádium nemalobuněčného karcinomu plic bylo určeno dle mezinárodního pTNM systému (Mountain 1997).

Pacienti před operací neprodělali radioterapii ani chemoterapii a každý podepsal písemný informovaný souhlas se vstupem do výzkumné studie. Provedení výzkumné studie bylo schváleno Etickou komisí při Fakultní nemocnici Na Bulovce, Praha.

### **Příprava bílkovinných extraktů**

Pro imunometrickou kvantifikaci XIAPu sendvičovou ELISA metodou jsme připravily ze vzorků NSCLC a plic **extrakty typu I**. Pro imunometrickou kvantifikaci survivinu sendvičovou ELISA metodou jsme připravily ze vzorků NSCLC a plic **extrakty typu S**.



## Roztoky a reagentie

Pufry a zásobní roztoky:

- **PBS pufr:** 137 mM NaCl ( $M_r = 58,44$ ; ICN 194848), 2,7 mM KCl ( $M_r = 74,55$ ; ICN 194844), 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $M_r = 141,96$ ; Sigma S-3264), 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M_r = 136,09$ ; Fluka 60218); vše rozpustit v deionizované vodě na 1 litr roztoku, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2  $\mu\text{m}$  filtr, skladovat při 4 °C
- **100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$**  ( $M_r = 372,2$ ; Sigma E-5134) v PBS (tj. 18 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  rozpustit v 483,6  $\mu\text{l}$  PBS)
- **1 mM E-64** ( $M_r = 357,4$ ; Sigma E-3132) v PBS (tj. 1,0 mg E-64 rozpustit v 2,78 ml PBS)
- **200 mM AEBSF·HCl** (Pefabloc;  $M_r = 239,7$ ; Fluka 76307) v deionizované vodě (tj. 12 mg AEBSF·HCl rozpustit v 250,3  $\mu\text{l}$  deionizované vody)
- **10 mM pepstatin** ( $M_r = 685,9$ ; Calbiochem 516481) v DMSO ( $M_r = 78,1$ ; Serva 20385) (tj. 1 mg pepstatinu rozpustit v 145,8 DMSO)
- **0.5% Tween 20** (Sigma P-7949) v PBS pufru (tj. 25  $\mu\text{l}$  Tweenu 20 rozpustit v 4,975 ml PBS)
- **20% Triton X-100** (Fluka 93426) v PBS pufru (tj. 200  $\mu\text{l}$  Tritonu X-100 rozpustit v 800  $\mu\text{l}$  PBS)

Pokud se zásobní roztoky ihned nepoužijí nebo nespotebují, zkumavky zaparafilmovat a zamrazit na -25 °C. PBS se uchovává v lednici při 4 °C.

Lyzační pufry:

### ▪ Lyzační pufr #2I pro přípravu bílkovinných extraktů typu I:

1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,005% Tween 20, 0,5% Triton X-100, pH 7,2-7,4, s koktejlem proteinasových inhibitorů: 50  $\mu\text{M}$  E-64, 200  $\mu\text{M}$  AEBSF·HCl a 25  $\mu\text{M}$  pepstatin. Připravit ze zásobních roztoků v PBS pufru, uchovávat při -25 °C

*Příprava 25 ml roztoku:* do 25-ml odměrky napipetovat  $\approx 21,5$  ml PBS, přidat 250  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v PBS, 250  $\mu\text{l}$  0,5% Tween 20 v PBS, 625  $\mu\text{l}$  20% Triton X-100 v PBS (pístovou pipetou), 1250  $\mu\text{l}$  1 mM E-64 v PBS, 25  $\mu\text{l}$  200 mM AEBSF·HCl v deionizované vodě, 62,5  $\mu\text{l}$  10 mM pepstatin v DMSO, promíchat a doplnit PBS na 25 ml roztoku. Rozdělit na dva alikvoty po 12,5 ml do 15-ml zkumavek.

• **Lyzační pufr #2S pro přípravu bílkovinných extraktů typu S:**

1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,005% Tween 20, 0,5% Triton X-100, **6 M urea v PBS**, pH 7,2-7,4, s koktejlem proteinasových inhibitorů: 50 μM E-64, 200 μM AEBSF·HCl a 25 μM pepstatin. Připravit ze zásobních roztoků v PBS pufru, uchovávat při -25°C.

*Příprava 25 ml roztoku:* do 25-ml odměrky navážit 9,009 g urey (M<sub>r</sub> = 60,06; Fluka 51456), rozpustit v PBS asi na ≈ 21,5 ml roztoku, přidat 250 μl 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O v PBS, 250 μl 0,5% Tween 20 v PBS, 625 μl 20% Triton X-100 v PBS (pístovou pipetou), 1250 μl 1 mM E-64 v PBS, 25 μl 200 mM AEBSF·HCl v deionizované vodě, 62,5 μl 10 mM pepstatin v DMSO (vystřelovací pipetou Hamilton), promíchat a doplnit PBS na 25 ml roztoku. Rozdělit na dva alikvoty po 12,5 ml do 15-ml zkumavek.

Příprava bílkovinných extraktů typu I a S

Vzorky nádorů (**Tu**) a plicní tkáň (**Lu**) (≈ 200 mg), dosud uložené v kryozkumavkách při -78°C, přenést do granulovaného pevného CO<sub>2</sub> (suchý led), uvolnit vzorek tkáň od stěny zkumavky (poklepem o desku stolu) a přidat **800 μl lyzačního pufru #2I** (při přípravě extraktů I) nebo **lyzačního pufru #2S** (při přípravě extraktů S). Lyzační pufr musí být předem vychlazen. Ihned homogenizovat na **Ultra-Turraxu T25** se sondou S25N-8G při **24000 rpm**, celkem **10 x 5 sekund** s krátkými přestávkami. Homogenizaci provádět za současného chlazení zkumavky v **ledu**. Homogenát přepipetovat do připravené popsané 1,5-ml centrifugační zkumavky (Beckman 356090) a ponechat 5 minut v ledu. Zkumavky s ≈ 20%-ním homogenátem vyvážit a zcentrifugovat na centrifuze Beckman **Avanti 25I** v rotoru Beckman JA-18.1 (adaptery nastavené na 45°) při **40000xg (17600 obr./min)**, **po dobu 34 minut a při 4°C**. Výsledné **supernatanty** opatrně přepipetovat do vyautoklávovaných popsaných 1,5-ml zkumavek (Costar 3620), promíchat pipetováním touže špičkou, ponechat v ledu a **aliquotovat** do vyautoklávovaných popsaných 0,6-ml zkumavek (Costar 3208) **po 100 μl** + zbytek ponechat v původní 1,5-ml zkumavce. Zkumavky s alikvoty popsat, zaparafilmovat a uskladnit v hlubokomrazící skříni při -78°C.

### Stanovení celkové bílkoviny v extraktech I a S (BCA metoda stanovení)

Metoda BCA (bicinchoninic acid) využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové, která tvoří komplexy s měďnými ionty  $\text{Cu}^+$ , které se tvoří při reakci peptidové vazby s měďnatými ionty  $\text{Cu}^{2+}$ . Tento barevný komplex je spektrofotometricky měřen a míra zabarvení je přímo úměrná koncentraci celkové bílkoviny ve vzorku (Stoscheck 1990, Smith et al 1985).

Zásobní roztoky:

- 0,012% albumin bovinního séra (**BSA**; Sigma A-7030) v deionizované vodě, připravit 25 ml roztoku
  - (**R1**) **8%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$**  ( $M_r = 105,99$ ; MP 191437), **1,6% vinan sodný** ( $M_r = 230,10$ ; Lachema), **0,8% NaOH** ( $M_r = 40,00$ ; ICN 153495) v deionizované vodě, připravit 100 ml roztoku a upravit na pH 11,25 pomocí pevného  $\text{NaHCO}_3$  ( $M_r = 84,01$ ; ICN 194847)
  - **4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$**  ( $M_r = 249,69$ ; Sigma C8027) v deionizované vodě, připravit 25 ml roztoku
  - **4% BCA** (bicinchoninová kyselina; 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline) ( $M_r = 344,3$ ; Sigma D8409) v deionizované vodě, připravit 100 ml roztoku, upravit na pH 11,25 pomocí 10%-ního roztoku NaOH, výsledný roztok musí být čirý.
- Roztoky uchovávat při pokojové teplotě, roztok 0,012% BSA připravit vždy čerstvý.

Příprava **pracovního činidla** ze zásobních roztoků: připravit 12 ml činidla smísením 6 ml roztoku R1, 5,76 ml 4% BCA a 0,24 ml 4%  $\text{CuSO}_4$

Pracovní postup:

Extrakty I nebo S pomalu rozmrazit na ledu (použít zůstatkové extrakty v původních 1,5-ml zkumavkách, viz výše), promíchat a použít pro stanovení celkové bílkoviny.

Ředění extraktů I a S:

nejprve připravit ředění 100x (tj. 10  $\mu\text{l}$  extraktu I nebo S + 990  $\mu\text{l}$  deionizované vody), a pak připravit ředění:

- **1000x** (tj. 40  $\mu\text{l}$  100x ředěného vzorku + 360  $\mu\text{l}$  deionizované vody), a
- **2000x** (tj. 20  $\mu\text{l}$  100x ředěného vzorku + 380  $\mu\text{l}$  deionizované vody).

Naředěné extrakty napipetovat do 0,6-ml zkumavek vhodně uspořádaných pro pipetování multikanálovou pipetou.

Příprava standardů BSA:

zásobní roztok 0,012% BSA (120 µg/ml) ředit deionizovanou vodou na serii několika různých pracovních koncentrací BSA:

30 µg/ml (St 7), 20 µg/ml (St 6), 15 µg/ml (St 5), 10 µg/ml (St 4), 7,5 µg/ml (St 3), 5 µg/ml (St 2) a 2,5 µg/ml (St 1). Jako slepý roztok (blank) použít deionizovanou vodu.

Roztok blanku a roztoky standardů BSA napipetovat do 0,6-ml zkumavek vhodně uspořádaných pro pipetování multikanálovou pipetou.

Analytická procedura:

Do jamek 96-ti jamkové mikrotitrační průhledné destičky (P-Lab K002620) napipetovat **blank, standardy a naředěné extrakty I** nebo **S**, vše v tripletech (tj. pro tři paralelní měření), a to **100 µl/jamka** a do příslušných jamek, jak je na příkladu uvedeno v Tabulce 3. K pipetování použít 8-kanálovou pipetu Gilson. Dbát na udržení čistoty dna mikrotitrační destičky.

Tabulka 3. Vzorové uspořádání vzorků v 96-ti jamkové mikrotitrační desce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	BL	VZ1A	VZ1A	VZ1A	VZ5A	VZ5A	VZ5A			
B	ST1	ST1	ST1	VZ1B	VZ1B	VZ1B	VZ5B	VZ5B	VZ5B			
C	ST2	ST2	ST2	VZ2A	VZ2A	VZ2A	VZ6A	VZ6A	VZ6A			
D	ST3	ST3	ST3	VZ2B	VZ2B	VZ2B	VZ6B	VZ6B	VZ6B			
E	ST4	ST4	ST4	VZ3A	VZ3A	VZ3A	VZ7A	VZ7A	VZ7A			
F	ST5	ST5	ST5	VZ3B	VZ3B	VZ3B	VZ7B	VZ7B	VZ7B			
G	ST6	ST6	ST6	VZ4A	VZ4A	VZ4A						
H	ST7	ST7	ST7	VZ4B	VZ4B	VZ4B						

Blank (BL), sedm různých standardů BSA (ST) a sedm různých vzorků ve dvojitým ředění (VZA = ředění 1000x a VZB = ředění 2000x), vše pipetováno v tripletu

K napipetovanému blanku, standardům a naředěným vzorkům pak 8-kanálovou pipetou přidat **100 µl/jamka pracovního činidla**, mikrotitrační destičku přelepit průhlednou fólií a inkubovat ji 1 hodinu při 40°C v termostatu. Poté mikrotitrační destičku položit 5 minut na Saran folii na ledovou drť za účelem zastavení reakce.

Měření absorbance reakčního produktu:

absorbance výsledného barevného roztoku je změřena na destičkovém fotofluorimetru SpectraFluor (TECAN G.m.b.H., Austria), v němž je do dráhy světelného paprsku zařazen s optický filtrem 570 nm (filter slide ABS-E 570 nm). Přístroj je řízen programem Biolise (version 2.0). Tento program rovněž zpracuje a vyhodnotí změřená data dle zadaných parametrů. Výsledkem je stanovená koncentrace celkové bílkoviny v analyzovaném vzorku, která je vyjádřena v jednotkách  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### **Chromogenní ELISA XIAPu a survivinu ve vzorcích Tu a Lu**

Pro imunometrickou kvantifikaci XIAPu a survivinu sendvičovou ELISA metodou jsme použili soupravy reagensů (viz níže), které obsahovaly potřebné základní komponenty pro imunochemické stanovení proteinů XIAP a survivin v bílkovinných extraktech typu I a S. Princip metody byl popsán výše v teoretické části této práce.

#### Roztoky a reagenty

Pufry a další roztoky

- **PBS pufr:** 137 mM NaCl ( $M_r = 58,44$ ; ICN 194848), 2,7 mM KCl ( $M_r = 74,55$ ; ICN 194844), 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $M_r = 141,96$ ; Sigma S-3264), 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M_r = 136,09$ ; Fluka 60218); vše rozpustit v deionizované vodě na 1 litr roztoku, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2  $\mu\text{m}$  filtr, skladovat při 4 °C
- **Promývací pufr:** 0,05 % Tween 20 v PBS, pH 7,2-7,4, připravit  $\approx 550$  ml (pro plnou 96-ti jamkovou mikrotitrační destičku)
- **Blokační pufr:** 1% BSA, 5% sacharosa (Sigma S-0389), 0,05%  $\text{NaN}_3$  (Fluka 71289) v PBS, pH 7,2-7,4, připravit 30 ml (pro plnou 96-ti jamkovou mikrotitrační destičku)
- **Ředící roztok #1 (ICD1) (XIAP):** 1,0% BSA v PBS, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2  $\mu\text{m}$  filtr, připravit  $\approx 25$  ml (plná mikrotitrační destička)
- **Ředící roztok #4 (ICD4) (XIAP):** 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,005% Tween 20, 0,5% Triton X-100 v PBS (použít zásobní roztoky jako pro přípravu lyzačních pufřů I nebo S), pH 7,2-7,4, připravit  $\approx 12$  ml (plná mikrotitrační destička)
- **Ředící roztok #1a (ICD1a) (survivin):** 1,2% BSA v PBS, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2  $\mu\text{m}$  filtr, připravit  $\approx 1$  ml

- **Ředící roztok #1b (ICD1b) (survivin):** 1,0% BSA v PBS, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2 µm filtr, připravit ≈ 25 ml (plná mikrotitrační destička)
- **Ředící roztok #2 (ICD2) (survivin):** 1% BSA, 1 M urea v PBS, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2 µm filtr, připravit ≈ 14 ml (plná mikrotitrační destička)
- **Ředící roztok #5 (ICD5) (survivin):** 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 6 M urea v PBS, pH 7,2-7,4, připravit ≈ 500 µl (ředění 1 vialky standardu survivinu)
- **Ředící roztok #6 (ICD6) (survivin):** 1,265% BSA v PBS, pH 7,2-7,4, přefiltrovat přes 0,2 µm filtr, připravit ≈ 4 ml (plná mikrotitrační destička)

Ředící roztoky, PBS a promývací pufr je možno připravit den před analýzou a uchovat je v lednici při 4°C. Před použitím je však nutno roztoky vytemperovat na teplotu laboratoře. Blokační pufr je nutné připravit čerstvý v den analýzy.

- **Kolorimetrický substrát:** směs 1:1 Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a Color Reagent B (tetrametylbendidin), které jsou komponentami Substrate Reagent Pack (Cat # DY999; R&D Systems), se připraví čerstvá těsně před použitím, její spotřeba na plnou desku je 9,6 ml

- **Zastavovací roztok:** vodný 1 M (2 N) roztok H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se připraví se zředěním 95-98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Aldrich 32,050-1). Spotřeba zastavovacího roztoku na plnou mikrotitrační destičku je 9,6 ml.

### ELISA soupravy

**Human Total XIAP ELISA DuoSet<sup>®</sup> IC, R&D Systems DYC822-5 (5 plates)**

**Human Total Survivin ELISA DuoSet<sup>®</sup> IC, R&D Systems DYC647-5 (5 plates)**

Komponenty souprav:

- Vyvazovací protilátky:

**XIAP Capture Antibody** (Part 840758, 2 vials) – myší protilátka proti lidskému XIAPu (1 vialka), rozpustit ve 200 µl PBS na koncentraci **360 µg/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C po dobu 30 dní nebo při -70°C po dobu 3 měsíce

**Survivin Capture Antibody** (Part 840471, 2 vials) – králičí protilátka proti lidskému survivinu (1 vialka), rozpustit ve 200 µl PBS na koncentraci **72 µg/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C po dobu 30 dní nebo při -70°C po dobu 3 měsíce

▪ Detekční protilátky:

**XIAP Detection Antibody** (Part 840759, 2 vials) – myší biotinylovaná protilátka proti lidskému XIAPu (1 vialka), rozpustit v 1 ml ředícího roztoku **#1 (ICD1)** na koncentraci **18 µg/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C po dobu 30 dní nebo při -70°C po dobu 3 měsíce

**Survivin Detection Antibody** (Part 840472, 2 vials) – králičí biotinylovaná protilátka proti lidskému survivinu (1 vialka), rozpustit v 1 ml ředícího roztoku **#1b (ICD1b)** na koncentraci **7,2 µg/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C po dobu 30 dní nebo při -70°C po dobu 3 měsíce

▪ Standardy (ST):

**XIAP Standard** (Part 840760, 2 vials) – rekombinantní lidský XIAP (1 vialka), rozpustit v 500 µl ředícího roztoku **#4 (ICD4)** na koncentraci **120 ng/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C po dobu 30 dní nebo při -70°C po dobu 3 měsíce; před měřením připravit **7 pracovních standardů XIAPu** o následujících koncentracích: **16 ng/ml (ST7)**, **8 ng/ml (ST6)**, **4 ng/ml (ST5)**, **2 ng/ml (ST4)**, **1 ng/ml (ST3)**, **0,5 ng/ml (ST2)** a **0,25 ng/ml (ST1)** v ředícím roztoku **#4 (ICD4)**

**Survivin Standard** (Part 840473, 4 vials) – rekombinantní lidský survivin (1 vialka), rozpustit v 500 µl ředícího roztoku **#5 (ICD5)** na koncentraci **180 ng/ml**, po rozpuštění skladovat při 2-8°C nebo při -70°C po dobu 1 měsíce; další ředění se provede v ředícím roztoku **#1a (ICD1a)** na koncentraci **30 ng/ml**, následně se provede ještě jedno ředění v ředícím roztoku **#2 (ICD2)** na koncentraci **1600 pg/ml**; před měřením připravit **7 pracovních standardů survivinu** o následujících koncentracích: **1600 pg/ml (ST7)**, **800 pg/ml (ST6)**, **400 pg/ml (ST5)**, **200 pg/ml (ST4)**, **100 pg/ml (ST3)**, **50 pg/ml (ST2)** a **25 pg/ml (ST1)** v ředícím roztoku **#2 (ICD2)**

▪ **Streptavidin-HRP** (Part 890803, 1 vial) – 1 ml roztoku streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou (horseradish-peroxidase), skladovat při 4°C, nesmí zmrznout! Tento roztok se dále rovněž ředí, a to dle instrukcí uvedených na etiketě vialky.

Technické rady a omezení:

soupravy nepoužívat po datu expirace; zabránit mikrobiální kontaminaci reagentů a pufrů; pufrů obsahující proteiny připravovat sterilně a uchovávat je při 2-8°C nebo připravovat je těsně před použitím; po promytí jamek mikrotitrační destičky promývacím pufrům zbytky tohoto pufru důkladně odstranit (převrátit desku dnem

vzhůru a odblotovat pufr do několika vrstev buničiny); při pipetování používat v každém kroku vždy čisté špičky.

### Ředění bílkovinných extraktů I a S

#### Ředění **extraktů I:**

aliquoty extraktů I rozmrazit na ledu, promýchat, naředit s ředícím roztokem **#4 (ICD4)** na konečné koncentrace **celkového proteinu 10 µg/100 µl (A) a 5 µg/100 µl (B)**, celkový objem pracovních naředěných extraktů A i B = 350 µl.

#### Ředění **extraktů S:**

aliquoty extraktů S rozmrazit na ledu, promýchat, naředit s ředícím roztokem **#6 (ICD6;** 1. ředění 4.8x), následně ředit ředícím roztokem **#2 (ICD2)** na pracovní koncentrace celkového proteinu: **pro vzorky Tu 25 µg/100 µl (A) a 12,5 µg/100 µl (B)**, a **pro vzorky Lu 150 µg/100 µl (A) a 75 µg/100 µl (B)**, celkový objem pracovních naředěných extraktů A a B = 350 µl.

### Pracovní protokol pro chromogenní ELISU XIAPu a survivinu

#### **A) Příprava mikrotitrační destičky pro metodu ELISA**

- do jamek transparentní destičky (Nunc-Imuno Maxisorb Plate, Nunc 446612) napipetovat čerstvý pracovní roztok **vyvazovací protilátky v PBS**, konečná koncentrace vyvazovací protilátky je **2,0 µg/ml (XIAP) a 0,4 µg/ml (survivin)**, **100 µl/jamka** (pracovní roztok protilátek pipetovat z **teflonové vaničky** 8-kanálovou pipetou), destičku dobře uzavřít nalepovací fólií a **inkubovat 18 hodin** v temnu při teplotě laboratoře
- roztok vyvazovací protilátky z jamek odstranit následujícím způsobem: destičku rychle invertovat a roztok vytřepnutím, pak zbytek roztoku odblotovat do několika vrstev buničiny, následně jamky destičky **3x promýt s 350 µl promývacího pufru** (0,05 % Tween 20 v PBS) a odblotovat do buničiny



- do jamek destičky napipetovat **blokační pufr** (1% BSA, 5% sacharosa, 0,05%  $\text{NaN}_3$ ) **300  $\mu\text{l}$ /jamka**, jamky destičky dobře uzavřít nalepovací fólií a destičku **inkubovat 2 hodiny** v temnu při teplotě laboratoře
- roztok blokačního pufru z jamek odstranit způsobem uvedeným výše, jamky **3x promýt s 350  $\mu\text{l}$  promývacího pufru** (0,05 % Tween 20 v PBS) a odblotovat do buničiny

## **B) Imunochemická stanovovací procedura**

- navazuje na přípravu ELISA destičky

- do příslušných jamek destičky napipetovat: **blank (BL; ICD4 pro XIAP; ICD2 pro survivin)**, **pracovní roztoky standardů (ST1 - ST7)** a **vzorky naředěných bílkovinných extraktů I nebo S (VZA a VZB)**, vše pipetovat v **tripletech** (viz Tabulka 3), **100  $\mu\text{l}$ /jamka**, destičku dobře uzavřít nalepovací fólií a **inkubovat 2 hodiny** v temnu při teplotě laboratoře
- roztoky blanku, standardů a vzorků z jamek odstranit způsobem uvedeným výše, jamky **3x promýt s 350  $\mu\text{l}$  promývacího pufru** (0,05 % Tween 20 v PBS) a odblotovat do buničiny
- do jamek destičky napipetovat čerstvý pracovní roztok **detekční protilátky, 100  $\mu\text{l}$ /jamka**, přičemž pracovní koncentrace detekční protilátky je: **500 ng/ml** v pufru ICD1 pro **XIAP** a **200 ng/ml** v pufru ICD1b pro **survivin** (pracovní roztok detekční protilátky pipetovat z **teflonové vaničky** multikanálovou pipetou), destičku dobře uzavřít nalepovací fólií a **inkubovat 2 hodiny** v temnu při teplotě laboratoře
- roztok detekční protilátky z jamek destičky odstranit způsobem uvedeným výše, jamky **3x promýt s 350  $\mu\text{l}$  promývacího pufru** (0,05 % Tween 20 v PBS) a odblotovat do buničiny
- bezprostředně před použitím připravit čerstvý pracovní roztok **Streptavidin-HRP** v ředícím roztoku #1 (ICD1 pro XIAP) nebo v ředícím roztoku #1b (ICD1b pro survivin) dle návodu uvedeného na etiketě vialky (tj. 10,746 ml ICD1 nebo ICD1b + 54  $\mu\text{l}$  200x koncentrovaného Streptavidin-HRP pro 96 jamek), dobře promíchat, potřebný objem, tj. **100  $\mu\text{l}$ /jamka**, napipetovat do jamek destičky, destičku dobře uzavřít nalepovací fólií a **inkubovat 20 minut** v temnu při teplotě laboratoře
- roztok Streptavidin-HRP z jamek odstranit způsobem uvedeným výše, jamky **3x promýt s 350  $\mu\text{l}$  promývacího pufru** (0,05 % Tween 20 v PBS) a odblotovat do buničiny

- do jamek destičky napipetovat čerstvý pracovní roztok **kolorimetrického substrátu, 100 µl/jamka**, destičku dobře uzavřít nalepovací fólií a **inkubovat 20 minut** v temnu při teplotě laboratoře
- do jamek destičky přidat **zastavovací roztok** (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), **50 µl/jamka**
- **měření absorbance** výsledného reakčního produktu: na destičkovém fotofluorimetru SpectraFluor řízeného programem Biolise (version 2), po automatickém promíchání roztoku v jamkách destičky přístroj proměří absorbanci roztoku v jamkách destičky při **450 nm**, naměřená data jsou uložena a zálohována
- **sestrojení kalibračních křivek pro XIAP a survivin**: hodnoty A<sub>450nm</sub> měřených roztoků standardů jsou použity pro sestrojení **kalibrační křivky**; **A<sub>450nm</sub> versus koncentrace XIAPu (ng/ml) nebo A<sub>450nm</sub> versus koncentrace survivinu (pg/ml)**, kalibračními body je proložena regresní přímka (kalibračními body leží na regresní přímce)
- **určení koncentrace XIAPu a survivinu v tkáňových extraktech**: hodnoty A<sub>450nm</sub> měřených roztoků tkáňových extraktů jsou použity pro výpočet koncentrace XIAPu (ng/ml) a koncentrace survivinu (pg/ml) v tkáňových extraktech metodou odečtení z příslušné kalibrační křivky, po přepočtu na ředění extraktu a na koncentraci celkové bílkoviny v extraktu jsou vyjádřeny v jednotkách **ng/mg celkové bílkoviny**.

#### Statistické metody

Statistické výpočty byly provedeny programem SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA, USA) a Stat200 (Biosoft, Cambridge, UK). Hodnota statistického rozdílu ( $P$ ) < 0,05 je považována za statisticky významnou.

## Výsledky

Expresi XIAP proteinu v tkáních NSCLC a plicním parenchymu jsme studovali na souboru celkem 88 chirurgicky léčených pacientů. Výsledky tohoto výzkumu ukázaly, že exprese XIAP proteinu byla signifikantně vyšší v tkáních NSCLC a zejména v adenokarcinomech plic ve srovnání s plicním parenchymem (Tabulka 4). Zvýšenou expresi XIAP proteinu v tkáních NSCLC (tj. poměr tumor/plíce pro jeho expresi  $\geq 2$ ) jsme našli u 14 (16%) z 88 vyšetřených NSCLC pacientů. Pohlaví NSCLC pacientů, stupeň diferenciacie NSCLC a ani stádium NSCLC neměly statisticky významný vliv na hladinu exprese XIAP proteinu v těchto nádorech (Tabulka 5). V tkáních NSCLC nekuřáků byla signifikantně vyšší exprese XIAP proteinu oproti tkáním NSCLC kuřáků (Tabulka 5). Byly-li však vzaty do úvahy pouze NSCLC nádory stejného histologického typu ve skupině kuřáků a nekuřáků, což v našem případě bylo proveditelné pouze pro LAC, pak v LAC kuřáků a nekuřáků exprese XIAP proteinu statisticky významně rozdílná nebyla ( $P > 0,12$ ; Mann-Whitneyův test).

Expresi survivinového proteinu v tkáních NSCLC a plicním parenchymu jsme studovali u souboru celkem 88 chirurgicky léčených pacientů. Výsledky tohoto výzkumu ukázaly, že exprese tohoto IAPu byla vysoce významně zvýšena v různých histopatologických typech NSCLC (Tabulka 6), přičemž nadměrnou expresi survivinu v tkáních NSCLC (tj. poměr tumor/plíce pro jeho expresi  $\geq 10$ ) jsme našli u vysoké proporce studovaných pacientů, tj. u 72 (82%) z 88 vyšetřených NSCLC pacientů. V případě exprese survivinového proteinu v NSCLC jsme nezjistili statisticky významné rozdíly v nádorech mužů než žen, v nádorech kuřáků a nekuřáků, a v nádorech grade 1+2 (dobře diferencované) a grade 3 (málo diferencované) (Tabulka 7). Zajímavým nálezem však byla statisticky významně vyšší exprese survivinového proteinu ve tkáních NSCLC stádia IB i stadia II+III oproti stádiu IA (Tabulka 7).

**Tabulka 4. Imunometrická analýza exprese XIAPu v nemalobuněčném karcinomu plic a v plicích.**

Typ nádoru	n	Expresie XIAP (ng/mg celkového proteinu) <sup>b</sup>		Statistický rozdíl (P) v expresi XIAPu v Tu versus Lu <sup>c</sup>	Poměr Tu/Lu v expresi XIAPu <sup>b</sup>	Počet pacientů s poměrem Tu/Lu v expresi XIAPu ≥ 2 a ≤ 0,5
		Nádory (Tu)	Plice (Lu)			
NSCLC	88 <sup>a</sup>	34,01 (0,24 – 112,70)	29,93 (3,40 – 76,40)	0,017	1,3 (0,01 – 8,30)	14 (16%) and 12 (14%)
SGCLC	39	32,86 (0,24 – 86,27)	30,07 (3,40 – 69,46)	0,280	1,1 (0,01 – 8,10)	4 (10%) and 5 (13%)
LAC	38	41,47 (0,73 – 112,70)	27,73 (14,05 – 76,41)	0,004	1,4 (0,03 – 5,40)	8 (21%) and 4 (11%)

<sup>a</sup> Z celkového počtu 88 pacientů s NSCLC bylo: 39 pacientů s SGCLC, 38 pacientů s LAC, 3 pacienti s SQCLC+LAC, 2 pacienti s LCLC, 3 pacienti s SLC a 3 pacienti s UNIDIF.

<sup>b</sup> Údaje označují medián, rozsah uveden v závorkách.

<sup>c</sup> Statistický rozdíl (P) v expresi proteinu XIAP v Tu versus Lu byl vypočítán Mann-Whitney testem.

**Tabulka 5. Vliv pohlaví, kouření, stupně diferenciacie a stádia nádorové nemoci na expresi XIAPu ve tkáních NSCLC.**

Kategorie	n <sup>a</sup>	Expresie XIAPu (ng/mg celkového proteínu) <sup>b</sup>	Statistický rozdíl (P) <sup>c</sup>
Pohlaví			
Muži	58	32.85 (0.71 – 86.27)	0.263
Ženy	30	40.35 (0.24 – 112.70)	
Kouření			
Nekuřáci	13	49.68 (5.91 – 82.39)	0.009
Kuřáci	75	32.84 (0.24 – 112.70)	
Diferenciacie nádoru			
Grade 1+2	36	32.51 (0.71 – 74.53)	0.205
Grade 3	36	42.64 (0.25 – 86.27)	
Stádium nádorové nemoci			
Stádium IA	13	45.29 (5.91 – 112.70)	0.910
Stádium IB	32	34.01 (3.50 – 86.27)	
Stádium II+III	40	34.73 (0.24 – 74.53)	

<sup>a</sup> Z celkového počtu 88 pacientů s NSCLC je u jednotlivých kategorií uveden počet případů patřících do této kategorie.

<sup>b</sup> Údaje reprezentují medián, rozsah hodnot je uveden v závorkách.

<sup>c</sup> Statistický rozdíl v expresi XIAPu mezi NSCLC-tkáněmi patřícími do jednotlivých kategorií byl vypočítán Mann-Whitney testem. Hladiny exprese XIAPu ve stádiu IB a stádiu II+III byly srovnány se stádiem IA.

Tabuľka 6. Imunometrická analýza exprese survivínu v nemalobuněčném karcinomu pľic a v pľicích.

Typ nádoru	n	Exprese survivínu (ng/mg celkového proteínu) <sup>b</sup>		Statistický rozdiľ (P) v expresi survivínu v Tu versus Lu <sup>c</sup>	Poměr Tu/Lu v expresi survivínu <sup>b</sup>	Počet pacientů s poměrem Tu/Lu v expresi survivínu ≥ 2 a ≤ 0,5
		Nádory (Tu)	Pľice (Lu)			
NSCLC	88 <sup>a</sup>	2,383 (0,107 – 15,901)	0,089 (0,010 – 0,501)	4,7 x 10 <sup>-28</sup>	23,5 (1,1 – 720,0)	85 (97%) a 0
SQCLC	39	2,148 (0,107 – 15,901)	0,083 (0,015 – 0,325)	3,2 x 10 <sup>-13</sup>	27,2 (1,1 – 166,2)	37 (95%) a 0
LAC	38	2,189 (0,224 – 11,365)	0,079 (0,014 – 0,469)	7,8 x 10 <sup>-14</sup>	24,0 (1,7 – 142,7)	37 (97%) a 0

<sup>a</sup> Z celkového počtu 88 pacientů s NSCLC bylo: 39 pacientů s SQCLC, 38 pacientů s LAC, 3 pacienti s SQCLC+LAC, 2 pacienti s LCLC, 3 pacienti s SLC a 3 pacienti s UNDEF.

<sup>b</sup> Údaje označují medián, rozsah uveden v závorkách.

<sup>c</sup> Statistický rozdiľ (P) v expresi proteínu survivínu v Tu versus Lu byl vypočítán Mann-Whitney testem.

**Tabulka 7. Vliv pohlaví, kouření, stupně diferenciace a stádia nádorové nemoci na expresi survivinu ve tkáních NSCLC.**

Kategorie	n <sup>a</sup>	Expresie survivinu (ng/mg celkového proteinu) <sup>b</sup>	Statistický rozdíl ( <i>P</i> ) <sup>c</sup>
<b>Pohlaví</b>			
Muži	58	2.549 (0.107 – 15.901)	0.529
Ženy	30	1.638 (0.224 – 11.365)	
<b>Kouření</b>			
Nekuřáci	13	1.276 (0.224 – 11.365)	0.371
Kuřáci	75	2.465 (0.107 – 15.901)	
<b>Diferenciace nádoru</b>			
Grade 1+2	33	2.333 (0.172 – 10.555)	0.298
Grade 3	42	2.701 (0.107 – 15.901)	
<b>Stádium nádoru</b>			
Stádium IA	13	1.011 (0.172 – 5.944)	0.049
Stádium IB	32	2.474 (0.107 – 11.365)	
Stádium II+III	40	2.099 (0.197 – 15.901)	

<sup>a</sup> Z celkového počtu 88 pacientů s NSCLC je u jednotlivých kategorií uveden počet případů patřících do této kategorie.

<sup>b</sup> Údaje reprezentují medián, rozsah hodnot je uveden v závorkách.

<sup>c</sup> Statistický rozdíl v expresi survivinu mezi NSCLC-tkáněmi patřícími do jednotlivých kategorií byl vypočítán Mann-Whitney testem. Hladiny exprese survivinu ve stádiu IB a stádiu II+III byly srovnány se stádiem IA.

## Reprodukovatelnost ELISA metody stanovení XIAPu a survivinu

Reprodukovatelnost vyjadřuje těsnost shody výsledků u opakovaně měřené veličiny. Reprodukovatelnost uvnitř stanovení (intraassay) a mezi stanoveními (interassay) při použití výše uvedených metod jsme hodnotili u vybraných bílkovinných extraktů typu I (n = 2) a S (n = 3) o různých koncentracích XIAPu a survivinu (ng/mg celkového proteinu) jak je uvedeno v Tabulkách 8 a 9. Výsledky jsme vyjádřily jako hodnoty variačního koeficientu v procentech (CV (%)); CV je definovaný jako podíl směrodatné odchylky (SD) a absolutní hodnoty aritmetického průměru (M) a udává variabilitu v procentech: tj.  $CV_{(\%)} = (SD/M) \times 100$ . Čím nižší je hodnota CV, tím větší je homogenita souboru. Z poměrně nízkých hodnot CV nalezených v našich měřeních soudíme, že použité imunometrické ELISA metody jsou dostatečně přesné.

Tabulka 8. Reprodukovatelnost výsledků imunometrického měření XIAPu metodou ELISA uvnitř stanovení a mezi stanoveními

XIAP (ng/mg celkového proteinu)						
		uvnitř stanovení			mezi stanoveními	
Vzorek číslo	n <sup>a</sup>	M ± SD	CV(%)	n <sup>a</sup>	M ± SD	CV(%)
1	6	23,51 ± 1,92	8,17	5	23,21 ± 1,67	7,20
2	6	29,90 ± 1,41	4,72	5	29,22 ± 3,65	12,49

<sup>a</sup> Počet opakování měření jednoho vzorku.

Tabulka 9. Reprodukovatelnost výsledků imunometrického měření survivinu metodou ELISA uvnitř stanovení a mezi stanoveními

Survivin (ng/mg celkového proteinu)						
		uvnitř stanovení			mezi stanoveními	
Vzorek číslo	n <sup>a</sup>	M ± SD	CV(%)	n <sup>a</sup>	M ± SD	CV(%)
1	10	2,41 ± 0,07	2,90	5	2,47 ± 0,23	9,31
2	10	4,29 ± 0,18	4,20	5	4,28 ± 0,26	6,07
3	10	7,30 ± 0,36	4,93	5	7,60 ± 0,88	11,58

<sup>a</sup> Počet opakování měření jednoho vzorku



## **Závěr**

Výsledky našeho výzkumu ověřily již dříve zveřejněné poznatky o zvýšené expresi IAPs v nádorových buňkách. Zvýšená hladina XIAP proteinu byla signifikantně vyšší ve tkáních NSCLC, zejména v adenokarcinomech, ve srovnání s plicním parenchymem jak bylo popsáno v práci Hofmanna et al. (2002) a také jsme neprokázali žádný statisticky významný vztah zvýšené exprese XIAPu ve tkáních NSCLC s ohledem na jejich histopatologický typ, stupeň diferenciaci a stádium nádoru, na pohlaví a kouření (Ferreira 2001a, Ferreira 2001b). U proteinu survivin jsme postupovali obdobným způsobem a prokázali jsme jeho významně zvýšenou hladinu v různých histopatologických typech NSCLC (Falleni et al. 2003). Nicméně se nám podařilo zjistit zvýšenou expresi proteinu survivin, která byla signifikantně vyšší ve stádiu nádoru IB a stádiu II+III ve srovnání se stádiem IA (Falleni et al. 2003), která naznačuje, že survivin může hrát významnou roli v tumorogenezi a růstu NSCLC. Výsledky také poukazují na možnost zrychlené degradace slabě exprimovaného survivinu v normální zdravé plicní tkáni (Jin et al. 2007).

Do budoucna je nutné nadále objasňovat další funkce IAPs v mnoha buněčných procesech, avšak suprese apoptózy jako jednoho z hlavních znaků tvorby nádoru dává možnost využití IAPs jako vynikajících terapeutických cílů při léčbě nádorů. V současné době probíhají na mnoha pracovištích intenzivní klinické zkoušky.

## Seznam použité literatury a zdrojů

Ambrosini G, Adida C, Altieri D (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921.

Bender MedSystems, *ELISA Technology* [online] [cit. 20.8.2009]. Dostupné z: <<http://www.bendermedsystems.com/elisa--22>>.

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.

Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656.

Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67: 2168-2174.

Dean JE, Ranson M, Blackhall F, Holt SV (2007) Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptotic proteins from laboratory to clinic. *Cancer Treat Rev* 33: 203-212.

Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102: 4489-4500.

Deveraux QL et al. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18(19): 5242-5251.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004a) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 114: 1117-1127.

Dohi T, Okada K, Xia F et al. (2004b) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279: 34087-34090.

Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J (2008) IAPs, more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 7: 1036-1046.

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 7: 988-994.

Elmore S (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35: 495-516.

Faddel B, Orrenius S, Zhivotovsky B (1999) Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 266: 699-717.

Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. (2003) Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol* 200: 620-626.

Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, et al (2001a) Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 7: 2468-2474.

Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenaabeele P (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18: 7719-7730.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76-100.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Adgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2002) Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 115: 575-585.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem J* 384: 201-232.

Fulda S (2008) Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 8: 533-539.

Galderisi U, Cascino A, Giordano A (1999) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* 181: 251-257.

Hacker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 5-17.

Hage DS (1999): Immunoassays. *Anal Chem* 71: 294-304.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hess CJ, Berkhof J, Denkers F, Ossenkoppele GJ, Schouten JP, Oudejans JJ et al. (2007) Activated intrinsic apoptosis pathway is a key related prognosis parameter in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 25: 1209-1215.

Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B (2002) Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 554-560.

Hornbeck P (1991) Enzyme-linked immunosorbent assay. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 2; Unit 2.1

Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59: 1701-1706.

Hu S, Spinaz SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dittis VM (1998) Caspase-14 is novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273: 29648-29653.

Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in

vitro monoubiquitination of caspase 3 and 7. *J Biol Chem* 275: 26661-26664.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG (2007) The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12: 1543-1568.

Jin Q, Feng L, Behrens C, Bekele BN, Witsuba II, Hong WK, Lee HY (2007) Implication of AMP-activated protein kinase and Akt-regulated survivin in lung cancer chemopreventive activities of deguelin. *Cancer Res* 67:11630-11639.

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.

Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-474.

LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S and Korneluk RG (2008) IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.

Li F, Ambrosini G, Chu EY et al. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving. *Nature* 396: 580-584.

Li L, Thomas RM, Suzuki H et al. (2004) A small molecule Smac mimic potential TRAIL-and TNFalpha-mediated cell death. *Science* 305: 1471-1474.

Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22: 2729-2740.

May WS, Deng X (2006) Apoptosis. *Principles of Molecular Medicine*, 2nd ed. Humana Press, Inc., Totowa: 709-719.

[Molecular Cell Biology](#), American Society Cell Biology Web Seminars [online] [cit. 22.8.2009]. Dostupné z <[www.bio.miami.edu/.../255/255hist/255history.htm](http://www.bio.miami.edu/.../255/255hist/255history.htm)>

Mountain CF (1997) Revisions in the International system for staging lung cancer. *Chest* 11: 1710-1717.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192: 131-137.

Riedl S, Shi Y (2004) Molecular mechanism of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.

Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788.

Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ (2006) Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* 13: 179-188.

Shi Y (2002) A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ* 9: 93-95.

Shiozaki EN, Chain J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11: 791-800.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 7320-7326.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.

Srinivasula SM, Ashwell JD (2008) IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 30: 123-135.

Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. *Methods in enzymology* 182: 50-69.

Sun C, Cal M, Gunasekera A, Meadows R, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu M, Ng S, Fesik S (1999) NMR structure and maturation of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401: 818-821.

Timmer JC, Salvesen GS (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ* 14: 66-72.

Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735-747.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (eds) (2004): Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. *IARC Press*, Lyon.

Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T (1999) Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 10170-10175.

Vaux DL, Silke J (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 499-504.

Vaux DL, Silke J (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 287-297.

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their

relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2: 1-10.

Voet D, Voet J (2004) Apoptosis: Programmed cell Death. In: *Biochemistry* 3<sup>rd</sup> ed., chapter 34, Wiley, 1505-1514.

Widlak P, Garrard WT (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94: 1078-1087.

Widlak P, Garrard WT (2009) Roles of the major apoptotic nuclease – DNA fragmentation factor – in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* 66: 263-274.

*World Health Organization. Cancer: WHO cancer control programme 2006* [online] [cit. 15.8.2009]. Dostupné z : <<http://www.who.int/cancer/en>>.

Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288: 874-877

Zangemeister-Wittke U, Simon HU (2004) An IAP in action, the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* 3: 1121-1123

Zeiss CJ (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40: 481-495.

## Seznam použitých zkratk

Ab - protilátka  
Ag - antigen  
AIF - apoptosis inducing factor  
AML - akutní myeloidní leukémie  
Apaf-1 - apoptotic protease-activating factor 1  
AS ODNs - antisense oligodeoxynucleotides  
ASK1 - apoptotic signal-regulating kinase 1  
ATP - adenosintrifosfát  
BCA - bichinoninic acid  
BIR - baculovirus IAP repeat  
BL - blank  
BSA - albumin bovinního séra  
CARD - caspase activation recruiting domain  
CC - coiled coil  
cIAPs - cellular IAPs  
CNS - centrální nervový systém  
CTL - cytotoxický T-lymfocyt  
cyt-c - cytochrom c  
dADP - deoxyadenosindifosfát  
dATP - deoxyadenosintrifosfát  
DD - death domain  
DED - death effector domain  
DFF - DNA fragmentační faktor  
DFFA - podjednotka A DNA fragmentačního faktoru  
DFFB - podjednotka B DNA fragmentačního faktoru  
DISC - death inducing signaling complex  
DR - death receptor  
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay  
Endo-G - endonukleáza G  
FADD - Fas-associated protein with death domain  
HBXIP - hepatitis B X-interacting protein  
Htr2 - high temperature requirement protein 2  
IAPs - inhibitor of apoptosis proteins  
ICD - ředící roztok  
ICE - interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme  
ILP2 - IAP-like protein 2

IMB - IAP binding motif  
kpb - kilopárobáze  
LAC - lung adenocarcinoma  
LCLC - large cell lung carcinoma  
LRR - leucine rich repeat  
Lu - vzorek tkáně plic  
ML-IAP - melanoma IAP  
NAIP - neuronal apoptosis-inhibitory protein  
NF- $\kappa$ B - nuclear factor- $\kappa$ B  
NOD - nukleotide-binding oligomerisation domain  
NSCLC - non-small cell lung carcinoma  
PM - plazmatická membrána  
RING - really interesting new gene  
SLC - sarcomatoid lung carcinoma  
Smac - second mitochondria-derived activator of caspases  
SQCLC - squamous cell lung carcinoma  
ST - standard  
Tu - vzorek tkáně nádoru  
UNDIF - undifferentiated lung carcinoma  
VZ - vzorek  
XIAP - X-linked IAP