

Analýza mechanismu působení epigenetických léčiv na proteiny spojené s apoptózou

Standardní léčba akutní myeloidní leukémie (AML) vysokými dávkami cytarabinu v kombinaci s anthracykliny není dostatečně účinná pro všechny typy onemocnění, zvláště pro typy AML s nepříznivou prognózou. Hledání nových přístupů k léčbě zahrnuje kromě jiného možnost použití epigenetických léčiv, která působí změny metylačního a acetylačního profilu nukleových kyselin a proteinů. Na našem oddělení se věnujeme studiu mechanismu působení jak standardních chemoterapeutik jako je cytarabin (ara-C), actinomycin D nebo kyselina all-trans retinová (ATRA), tak i epigenetických léčiv, zejména inhibitoru metyltransferáz 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, DAC) a inhibitoru histonových deacetyláz, suberoylanilid kyseliny hydroxamové (SAHA, Vorinostat).

Ve většině nádorů je vlivem mutací a dalších faktorů deregulována programovaná buněčná smrt (apoptóza). Účinkem chemoterapie dochází k obnovení procesu apoptózy a následně zániku nádorových buněk. Do jisté míry jsou postiženy i normální buňky. Je tedy žádoucí kombinovat léčiva tak, aby složením jejich účinků byly maximálně zasaženy nádorové buňky a zároveň aby výsledný efekt jen nejnižším možným způsobem poškozoval buňky normální. Náš výzkum je soustředěn na studium proteinů úzce souvisejících s apoptózou, zejména tumor supresoru p53, proapoptotických i antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 a skupiny inhibitorů apoptózy (IAP).

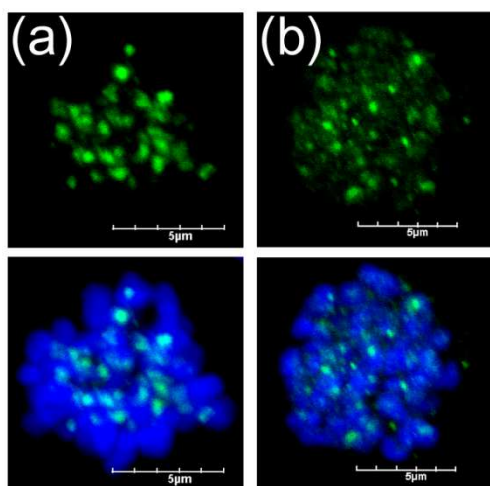
V posledních letech jsme publikovali několik prací zabývajících se účinkem decitabinu a SAHA, případně jejich kombinace s ATRA, na průběh apoptózy v buňkách leukemických linií a v normálních mononukleárních buňkách. V publikacích jsou prezentována následující zjištění:

1) Vysoká koncentrace decitabinu (8 μ M) způsobuje apoptózu závislou na stabilizaci nádorového supresoru p53 v buňkách leukemické linie CML-T1, ale i v normálních mononukleárních buňkách. Míra apoptózy je dále zvýšena současným účinkem vysoké koncentrace SAHA (4 μ M) [1] a k zániku buněk přispívá rovněž tvorba kyslíkových radikálů (ROS) vyvolaná kombinací decitabinu a SAHA [2].

2) Kombinace nízkých koncentrací decitabinu (1 μ M) a SAHA (1 μ M), které nezpůsobují podstatné změny v normálních mononukleárních buňkách:

- spouští v buňkách linie CML-T1 p53-dependentní apoptózu
- v p53-deficientních buňkách (linie HL-60 odvozená od AML) indukuje apoptózu tvorbou kyslíkových radikálů (ROS), mírně sníženou expresí antiapoptotického proteinu Bcl-2 a aktivací proteinu BAX [3].

3) K mechanismu působení decitabinu v buňkách nesoucích mutaci v p53 přispívá zástava buněčné proliferace v důsledku neúplné lokalizace Survivinu (obr. 1) v centromerách v průběhu mitózy. Survivin je protein z rodiny inhibitorů apoptózy a jednou z jeho funkcí je rovněž kontrola buněčné proliferace díky regulaci vazby vláken mitotického vřeténka do kinetochor. Chybná lokalizace je tedy náznakem toho, že obě tyto role spolu souvisejí a apoptóza může být v tomto případě důsledkem chybné regulace buněčného cyklu. V kombinaci se SAHA a ATRA je v p53-deficientních buňkách dále zvýšena tvorba kyslíkových radikálů a podstatně snížena exprese Bcl-2 [4], což přispívá k posílení procesu apoptózy.



Obr. 1: Distribuce Survivinu (AlexaFluor488, zelená) v mitotické fázi v normálních buňkách linie HL-60 (a) a v buňkách ošetřených 1 μ M decitabinem (b). Kondenzované chromozomy jsou označeny barvivem Hoechst 33342 (modrá), které vstupuje do dvouřetězcové DNA.

Studium vlivu cytarabinu (Ara-C) v nízkých koncentracích (50 nM) na leukemické buněčné linie potvrdilo, že cytarabine v jednotlivé dávce způsobí zástavu buněčného cyklu v S-fázi, která je po cca 12 hodinách působení překonána a nemá téměř žádný vliv na viabilitu buněk. Zatímco u buněk linie CML-T1 pro spuštění procesu apoptózy postačí zvýšení koncentrace cytarabinu, buňky linie HL60 je nutno ošetřit cytarabinem opakovaně a významného podílu apoptotických buněk je dosaženo přidáním decitabinu k druhé dávce cytarabinu, tedy v čase, kdy se většina buněk nachází v pozdní S-fázi buněčného cyklu. I v tomto procesu pravděpodobně významnou úlohu hraje tvorba kyslíkových radikálů, dochází rovněž ke zvýšení hladiny proapoptického proteinu Bax.

Významné snížení viability buněk bez ohledu na mutaci v p53 působí kombinace nízké koncentrace inhibitoru transkripce actinomycinu D a SAHA. Otázka, nakolik je toto snížení viability projevem apoptózy a z jaké části dochází k zániku buňky jiným typem buněčné smrti, je předmětem probíhajícího výzkumu.

[1] Barbora Brodská, Petra Otevřelová, and Aleš Holoubek: Decitabine-induced apoptosis is derived by Puma and Noxa induction in chronic myeloid leukemia cell line as well as in PBL and is potentiated by SAHA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2011 Apr;350(1-2):71-80

[2] Barbora Brodská, Aleš Holoubek: Generation of Reactive Oxygen Species during Apoptosis Induced by DNA-Damaging Agents and/or Histone Deacetylase Inhibitors. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2011 (2011): 253529

[3] Barbora Brodská, Aleš Holoubek, Petra Otevřelová, and Kateřina Kuželová: Combined Treatment with Low Concentrations of Decitabine and SAHA Causes Cell Death in Leukemic Cell Lines but Not in Normal Peripheral Blood Lymphocytes. *BioMed Research International*, Volume 2013 (2013): 659254

[4] Barbora Brodská, Petra Otevřelová, and Aleš Holoubek: Decitabine and SAHA-Induced Apoptosis Is Accompanied by Survivin Downregulation and Potentiated by ATRA in p53-Deficient Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014 (2014): 165303