

### Analýza mechanismu působení léčiv na proteiny spojené s apoptózou

Standardní léčba akutní myeloidní leukémie (AML) vysokými dávkami cytarabinu v kombinaci s antracykliny 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), idarubicin, 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, suberoylanilidu kyseliny hydroxamové (SAHA, Vorinostat). Testujeme také vliv specifických inhibitorů ovlivňujících jaderný export (selinexor, eltanexor) nebo interakci mezi nádorovým supresorem p53 a jeho regulátorem mdm2 (Nutlin3A, RITA).

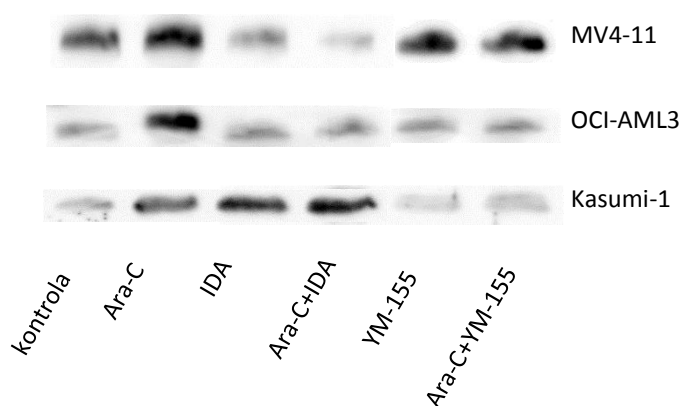
Ve většině nádorů je vlivem mutací a dalších faktorů deregulována programovaná buněčná smrt (apoptóza). Účinkem chemoterapie dochází k obnovení procesu apoptózy a následně k zániku nádorových buněk. Do jisté míry jsou postiženy i zdravé buňky. Je tedy žádoucí kombinovat léčiva tak, aby složením jejich 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, jeho cílových proteinů (p21, Puma a Noxa), proapoptotických i antiapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 a skupiny inhibitorů apoptózy (IAP).

Publikovali jsme 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  $\mu$ 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  $\mu$ M) [1] a k zániku buněk přispívá rovněž tvorba kyslíkových radikálů (ROS) vyvolaná kombinací decitabinu a SAHA [2].
- 2) Kombinace nízkých koncentrací decitabinu (1 $\mu$ M) a SAHA (1 $\mu$ 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 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 [4].

Studium vlivu cytarabinu (Ara-C) na leukemické buněčné linie potvrdilo, že Ara-C v jednotlivé dávce způsobí zástavu buněčného cyklu v S-fázi, která je po cca 24 hodinách působení překonána a nemá téměř žádný vliv na viabilitu buněk. Zatímco u buněk linie CML-T1 pro spuštění procesu apoptózy stačí 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.

Naše nedávné výsledky [5] ukázaly, že jedním z mechanismů, kterými se buňka brání apoptóze indukované cytarabinem, je zvýšení exprese Survivinu v interfázních buňkách. Tento jev byl detekován ve všech testovaných leukemických buněčných liniích, bez ohledu na přítomnost mutací typických pro AML, jako jsou NPM1, FLT3-ITD, DNMT3A, nebo TP53 mutace. Dále bylo zjištěno, že u většiny buněčných linií je cytarabinem indukovaná overexprese Survivinu inhibována současným ošetřením idarubicinem (obr.1). Alternativou pro linie, ve kterých idarubicin snížení Survivinu neindukuje, je použití specifického inhibitoru YM-155, který v některých liniích kromě Survivinu inhibuje rovněž expresi antiapoptotického proteinu XIAP. Na rozdíl od působení cytarabinu jsou účinky idarubicinu i inhibitoru YM-155 v souboru leukemických linií heterogenní a odrážejí tak pravděpodobně různorodost onemocnění AML.



Obr. 1: Exprese Survivinu v různých leukemických liniích po ošetření 5 $\mu$ M cytarabinem (Ara-C), 100 nM idarubicinem (IDA), 200 nM YM-155 nebo jejich kombinacemi.

#### Publikace k tématu:

- [1] Brodská B, Otevřelová P, Holoubek A (2011) 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. *Mol.Cell.Biochem.* 350(1-2):71-80
- [2] Brodská B and Holoubek A (2011) Generation of reactive oxygen species during apoptosis induced by DNA-damaging agents and/or histone deacetylase inhibitors. *Oxid Med.Cell.Longev* 2011:253529
- [3] Brodská B, Holoubek A, Otevřelová P, Kuželová K (2013) Combined treatment with low concentrations of decitabine and SAHA causes cell death in leukemic cell lines but not in normal peripheral blood lymphocytes. *Biomed.Res.Int.* 2013:659254
- [4] Brodská B, Otevřelová P, Holoubek A (2014) Decitabine and SAHA-induced apoptosis is accompanied by survivin downregulation and potentiated by ATRA in p53-deficient cells. *Oxid Med.Cell.Longev* 2014:165303
- [5] Otevřelová P and Brodská B (2021) Chemotherapy-Induced Survivin Regulation in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Applied Sciences* 11(1):460