

Mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK) v modelu diferenciacie leukemických buněk HL-60.

Procházková J.^{1,2}, Hofmanová J.^{1,2}, Netíková J.¹, Souček K.¹, Kozubík A.^{1,2}

1) Laboratoř cytogenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR v. v. i., Brno

2) Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Leukemické onemocnění vzniká následkem genetické chyby, která vede k předčasnému ukončení hematopoietického diferenciačního programu. V případě akutní myeloidní anémie je možné tuto blokaci překonat pomocí látek indukujících maturaci nezralých buněk, jako je kyselina retinová nebo vitamín D3, což je základem diferenciační terapie (např. Chou et al. 2005, Jing 2004). Vedlejším efektem tohoto postupu je však selekce rezistentních klonů. Tuto rezistenci může překonat jen kombinace různých diferenciačních a cytotoxických drog nebo látek remodelujících DNA (Freemantle et al. 2003). Studium signálních drah, které posilují diferenciaci, pak může vést k nalezení potenciálních cílů budoucích antileukemických léčiv.

V našich předchozích studiích byl prokázán diferenciační efekt kombinace cytokinů s inhibitory metabolismu kyseliny arachidonové (AA), zvláště cytokinu TNF-alfa s MK-886. MK-886 bývá primárně používán jako inhibitor vazby proteinu FLAP na 5-lipoxygenázu, čímž zabrání její aktivaci (Kozubík 1997 et al., Hofmanová et al. 1998, Štika et al. 2005). Ve snaze o další posílení diferenciačního efektu jsme k stávající účinné směsi přidali TGF-beta1. O tomto cytokinu je totiž známo, že má schopnost mírně zvyšovat diferenciaci buněk leukemického původu a jeho účinek obecně značně vzrůstá při společném působení s jinými diferenciačními látkami (Trinchieri et al. 1986, Okabe-Kado et al. 1991, Falk 1991, Cao et al. 2003, de Benedetti et al. 1990). Oproti předpokladu však po přidání TGF-beta1 došlo spíše k intenzivní aktivaci drah vedoucích k buněčné smrti a frekvence výskytu diferencovaných buněk klesla na úroveň podobnou neovlivněným buňkám. Takovéto efekty bývají obvykle spojeny se změnami aktivace MAPK, proto jsme se v této studii zabývali právě těmito signálními drahami, které zprostředkovávají expresi tzv. genů rychlé odpovědi (early response genes) na různé stresové podněty.

Buněčným modelem této studie byla myeloidní linie HL-60 derivovaná z buněk akutní promyelocytární leukémie, která byla kultivována v RPMI 1640 médiu se sníženým obsahem séra. Buňky byly předem ovlivněny inhibitory metabolismu AA (5 μ M MK-886) a po jedné hodině byly k této suspenzi přidány cytokiny (1 ng/ml TNF-alfa, 100 pM TGF-beta1) a to jednotlivě nebo v kombinaci. Úroveň exprese studovaných proteinů byla stanovena denzitometrickou kvantifikací Western blotů. Ke studiu aktivace těchto drah jsme využili fosfospecifické protilátky, neboť k aktivaci těchto kináz dochází pomocí fosforylační modifikace. Výskyt povrchových diferenciačních markerů CD11b a CD14 byl stanoven pomocí průtokové cytometrie. Přítomnost buněk zaniklých apoptotickou formou buněčné smrti byla hodnocena morfologicky (barvení DAPI), průtokovou cytometrií (TUNEL) nebo pomocí detekce štěpení kaspázového substrátu PARP Western blottingem.

První ze studovaných MAPK byla c-Jun N-terminální kináza (JNK), která bývá obvykle spojována s pro-apoptotickými efekty (Manna et al. 2000, Kajiguchi et al. 2003, Stadheim et al. 2002, Su et al. 2005). V buněčné linii HL-60 je konstitutivně aktivní JNK1, kdežto JNK2 je ve srovnání s JNK1 aktivována i exprimována jen velmi slabě a na tomto stavu paradoxně nic nemění ani působení žádné z našich látek.

Další z MAPK s potenciálně změněnou aktivitou je kináza p38, která bývá často také aktivována v souvislosti s iniciací apoptotického procesu (Ahn et al. 2005, Ikeda et al. 2006, Kondoh et al. 2005, Park et al. 2005, Xia et al. 2006). Již 15 minut po přidání TNF-alfa nebo kombinace TNF-alfa a TGF-beta1 k buňkám, které byly 1 hod předkultivovány s MK-886 došlo k indukci aktivace kinázy p38, ale tato aktivace je jen krátkodobá a po dalších 15 minutách již dochází k jejímu utlumení.

Signální dráha, ve které se nachází aktivní kináza p44/42 (ERK1/2) obvykle podporuje přežití buněk (Hetman and Kharebava 2006, Nyunoya et al. 2005, Ohguchi et al. 2005). Fosforylace kinázy p42 ERK2 u buněk HL-60 je konstitutivní, ale bývá posílena v prostředí, kdy jsou buňky vystaveny působení cytokinů, ale nedochází ještě k postižení viability buněčné populace. Fosforylace kinázy p44 ERK1 je velmi slabá, ale bývá zesílena v případech, kdy dochází k aktivaci ERK2. V našem modelu dochází k aktivaci této dráhy již po 15 min inkubace, ale tato aktivace je i nadále posilována v delších časových intervalech (až 120 min) u buněk diferencujících (MK-886 + TNF-alfa). K potlačení aktivace této dráhy však dochází po přidání TGF-beta1 k této kombinaci, což odpovídá zvýšení výskytu zanikajících buněk.

Jediný významný rozdíl mezi buňkami, které diferencují (ovlivněné MK-886 + TNF-alfa) a nediferencují (MK-886 + TNF-alfa + TGF-beta1) byl nalezen v signální dráze kináz p44/42 (ERK1/2), proto je možné, že cílové proteiny této kinázy aktivují nejen dráhy podporující přežití, ale také samotný diferenciační program.

Tento projekt byl podporován granty č. 524/06/P345 a 524/05/0595 agentury GAČR a AVOZ č. 50040507

Literatura

1. Ahn et al. (2005) Cancer Res, 65(11):4896-901;
2. Cao et al. (2003), Blood, 101 (2): 498-507;
3. de Benedetti et al. (1990), Blood, 75 (3): 626-32;
4. Falk (1991), Blood, 77 (6): 1248-55;
5. Freemantle et al. (2003), Oncogene, 22 (47): 7305-15;
6. Hetman and Kharebava (2006) Curr Top Med Chem., (8):787-99;
7. Hofmanová et al. (1998), Eur J Pharmacol, 350 (2-3): 273-84;
8. Chou et al. (2005), Curr Opin Hematol, 12 (1): 1-6;
9. Ikeda et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun., 342(1):280-5;
10. Jing (2004), Leuk Lymphoma, 45 (4): 639-48;
11. Kajiguchi et al. (2003) Leukemia, 17(11):2189-95;
12. Kondoh et al. (2005) Planta Med., 71(3):275-7;
13. Kozubik et al. (1997), J Leukoc Biol, 62 (2): 240-8;
14. Manna et al. (2000) J Interferon Cytokine Res., 20(8):725-35;
15. Nyunoya et al. (2005) J Biol Chem., 280(28):26295-302;
16. Ohguchi et al. (2005) Biosci Biotechnol Biochem., 69(2):353-6;
17. Okabe-Kado et al. (1991), Anticancer Res, 11 (1): 181-6;
18. Park et al. (2005) Br J Pharmacol., 146(4):506-13;
19. Stadheim et al. (2002), Leuk Res., 26(1):55-65;
20. Su et al. (2005), Carcinogenesis, 26(1):1-10;
21. Štika et al. (2005), 237(2):263-71;
22. Trinchieri et al. (1986), Blood, 69 (4): 1218-24;
23. Xia et al. (2006) J Asian Nat Prod Res., 8(4):335-43.