

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Efekty vybraných lipofilních organických kontaminantů prostředí v plasmatické membráně jaterní epiteliální linie WB-F344

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Klára Harmanová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Miroslav Machala, CSc.
Termín odevzdání práce:	23.4.2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 23.4.2012

.....

Klára Harmanová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Miroslavu Machalovi, CSc. za umožnění vhodných podmínek pro vznik této práce, za odborné vedení a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Pěnčíkové a Mgr. Lence Pálkové za pomoc, trpělivost a věnovaný čas, jakožto i ostatním zaměstnancům a doktorským studentům oddělení chemie a toxikologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. V neposlední řadě patří poděkování za všestrannou podporu mé rodině a mému příteli Janu Bartošovi.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Klára Harmanová
Název práce	Efekty vybraných lipofilních organických kontaminantů prostředí v plasmatické membráně jaterní epitelální linie WB-F34
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i
Vedoucí práce	RNDr. Miroslav Machala, CSc.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Tato práce byla zaměřena na popis efektů α-, β- a γ-HBCD <i>in vitro</i> v plasmatické membráně v potkaní jaterní epitelální linii WB-F344. Cílem teoretické části bylo shrnout dosavadní poznatky o HBCD, jejich vlastnostech a toxicitě. Samostatné kapitoly jsou také věnovány struktuře a funkci mezerových a adherentních spojů, regulaci buněčného cyklu a apoptóze. V experimentální části bylo úkolem sledovat působení jednotlivých isomerů HBCD na buňky linie WB-F344. Stanovenými parametry byly cytotoxicita, apoptóza, buněčný cyklus a inhibice komunikace zprostředkovaná mezerovými spoji (GJIC). Byly také detekovány hladiny proteinů konexinu 43, základní stavební jednotky mezerových spojů, a MAP kinázy ERK1/2, která hyperfosforyluje konexin 43, což vede k jeho degradaci. Dále byly měřeny hladiny proteinů E-kadherin a β-kateninu, které jsou klíčovými proteiny adherentních spojů. Na úrovni mRNA byla zjišťována změna exprese genu Axin2, jenž je cílovým genem Wnt/β-kateninové dráhy. Isomery HBCD v různé míře inhibují GJIC a suprimují Wnt/ β-katenin-dependentní genovou expresi; mohou tedy <i>in vivo</i> působit vývojovou toxicitu a nádorovou promoci.</p>
Klíčová slova	HBCD, WB-F344, buněčný cyklus, apoptóza, cytotoxicita, mezerové spoje, E-kadherin, β -katenin, konexin 43, pERK 1/2
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Klára Harmanová
Title	Bc.
Type of thesis	master
Department	Veterinary research institute
Supervisor	RNDr. Miroslav Machala, CSc.
The year of presentation	2012
Abstrakt	<p>This work was focused on description of effects α-, β- a γ-HBCD <i>in vitro</i> on cell plasma membrane in rat liver epithelial WB-F344 cell line. Theoretical part summarises recent information on HBCD isomers, their properties and toxicity. Additionally, structure and function of gap junctions, adherent junctions, cell cycle and apoptosis were characterized. In the experimental part, toxic effects of isomers HBCD in WB-F344 cells were characterized. The parameters under study included induction of cytotoxicity and apoptosis, regulation of cell cycle and inhibition of gap junction intercellular communication (GJIC). Modulation of levels and phosphorylation status of connexin 43, which forms gap junction, and MAP kinase ERK1/2, which hyperphosphorylated Cx43 and started its degradation. The levels of E-cadherin and β-catenin, the proteins constituting adherent junctions, were also examined. Expression of Axin2 mRNA, a target gene of Wnt/ β-catenin signaling pathway, was determined as well. HBCD isomers inhibited GJIC and suppressed Wnt/ β-catenin-dependent gene expression; these effects may be involved in developmental toxicity and tumor promoting activity of HBCD <i>in vivo</i>.</p>
Keywords	HBCD, WB-F344, cell cycle, apoptosis, cytotoxicity, gap junction, E-cadherin, β -catenin, connexin 43, pERK 1/2
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Cíle práce	8
2. Teoretická část	9
2. 1 Úvod.....	9
2. 2 HBCD v životním prostředí	10
2. 3 Toxické účinky HBCD na zdraví.....	11
2. 4 Mezibuněčná komunikace.....	12
2. 4. 1 Adherentní spoje	13
2. 4. 1. 1 E-kadherin.....	14
2. 4. 1. 2 β -katenin.....	14
2. 4. 2 Mezerové spoje (Gap junctions)	15
2. 4. 2. 1 Struktura mezerového spoje.....	16
2. 4. 2. 2 Konexin 43	17
2. 5 Buněčný cyklus	18
2. 5. 1 Regulace buněčného cyklu.....	19
2. 6 Buněčná smrt.....	21
3. Materiál a metody	23
3. 1 Testované látky	23
3. 2 Buněčná linie WB-F344.....	23
3. 3 Rozmrazování a zamrazování buněčných linií	24
3. 4 Kultivace buněčné linie WB-F344.....	24
3. 4. 1 Složení média DMEM s fenolovou červení.....	24
3. 4. 2 Příprava sterilního fosfátového pufru (PBS).....	25
3. 4. 3 Pasážování buněk	25
3. 4. 4 Příprava vzorků buněk pro testování <i>in vitro</i>	25
3. 5 Testy cytotoxicity.....	26
3. 5. 1 MTT test.....	26
3. 5. 2 Test cytotoxicity pomocí neutrální červeně (NRU).....	26
3. 6 Měření modulace GJIC (gap junctional intercellular communication).....	27
3. 7 Detekce apoptózy a měření fází buněčného cyklu.....	27
3. 7. 1 Sklizení buněk pro průtokovou cytometrii a barvení DAPI.....	27
3. 7. 2 Detekce apoptózy fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos.....	28
3. 7. 3 Detekce apoptotické fragmentace jader	28
3. 7. 4 Měření fází buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru.....	29
3. 8 Imunocytochemie – detekce konexinu 43.....	30
3. 9 Detekce proteinů metodou Western Blotting.....	31
3. 9. 1 Příprava buněčného lyzátu	31
3. 9. 2 Stanovení koncentrace bílkovin bicinchoninovou kyselinou.....	32
3. 9. 3 SDS-PAGE elektroforéza.....	32
3. 9. 4 Western Blotting	34
3. 9. 5 Detekce proteinů pomocí protilátek	34
3. 10 Real time RT-PCR	36
4. Výsledky	37
4. 1 Efekty isomerů HBCD na buněčné populace	37
4. 1. 1 Cytotoxicita.....	37
4. 1. 2 Detekce apoptózy	38
4. 1. 3 Měření fází buněčného cyklu	39

4. 2	Efekty v plasmatické membráně buněk WB-F344	41
4. 2. 1	Inhibice GJIC HBCD	41
4. 2. 3	Imunocytochemická lokalizace Cx43	47
4. 2. 4	Hladiny membránově-vázaných proteinů GJ a AJ.....	50
4. 2. 5	Vliv HBCD na genovou expresi závislou na Wnt/ β -kateninové signální dráze	54
5.	Diskuze.....	56
6.	Závěr	60
7.	Literatura	62
8.	Seznam použitých zkratk.....	69

1. Cíle práce

Porovnání efektů isomerů HBCD v buněčné jaterní epitelální linii potkana WB-F344:

1. Literární rešerše
2. Toxicita HBCD na buněčné úrovni (cytotoxicita, apoptóza, modulace buněčného cyklu)
3. Toxické efekty HBCD na plasmatickou membránu (inhibice GJIC, superse AJ a Wnt signální dráhy)

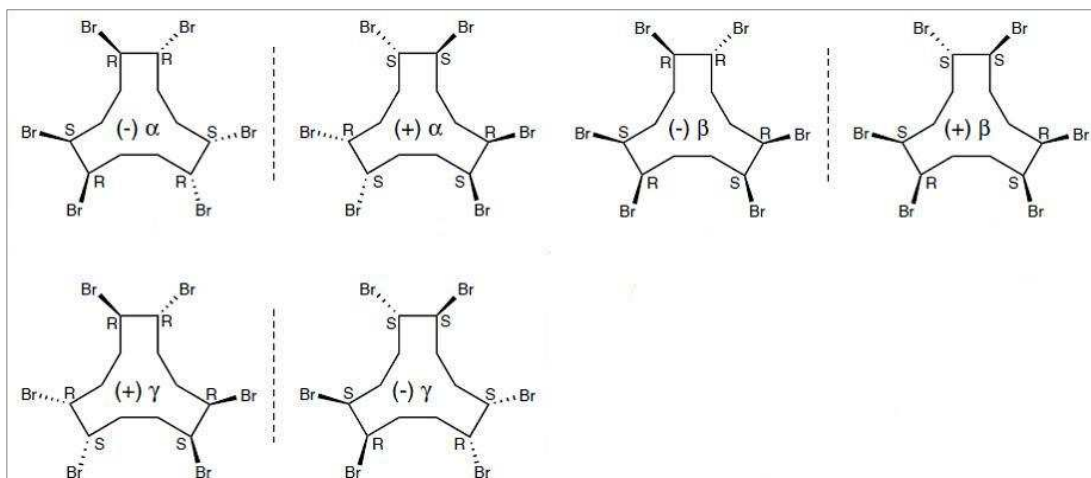
2. Teoretická část

2.1 Úvod

Hexabromocyklododekany (HBCD, $C_{12}H_{18}Br_6$) jsou nearomatické cykloalkany, které jsou vyráběny ve velkých objemech a široce používány jako bromované zpomalovače hoření (brominated flame retardants = BFRs). Průmyslově jsou HBCD vyráběny bromací 1, 5, 9 – cyklododekatrienů, čímž vzniká směs stereoisomerů. Ačkoli jsou tyto látky celosvětově široce používány, stereochemie jednotlivých HBCD není přesně známa. Z tohoto důvodu nebyly až donedávna studovány jako individuální sloučeniny s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Teoreticky je možných 16 různých enantiomerů, přičemž nejvýznamnějšími isomery jsou α -, β - a γ -HBCD, jejichž jednotlivý obsah v technických směsích je zastoupen 1 – 13% α -HBCD, 1 – 12% β -HBCD a 75 – 90% γ -HBCD (obr. č. 1) (Heeb et al., 2005).

Nejvíce se HBCD uplatňují ve stavebnictví, neboť jsou součástí pěnového polystyrenu (EPS), extrudovaného polystyrenu (XPS) a houževnatého polystyrenu (HIPS), který se používá v elektrotechnice (Weil, Levchik, 2009). Jsou také používány jako zpomalovače hoření v potahových textiliích, v metrovém textilu a matracích (Morose, 2006). Maximální koncentrace HBCD používaná v textiliích, pryži a plastických hmotách se pohybuje od 1 do 30% (US EPA, 2006).

Z důvodu omezení používání technických směsí polybromovaných difenyletherů (PBDE), vzrostla na počátku tohoto desetiletí produkce HBCD a v současné době jsou vyráběny v množství nad 20 000 t/rok (Sellström et al., 2003, Heeb et al., 2007). HBCD tvořily už v roce 2001 ze všech používaných BFR 8%, čímž se staly třetím nejvíce používaným zpomalovačem hoření, hned po tetrabromobisfenolu A (přibližně 59%) a dekabromodifenyletheru (26%) (Morose, 2006).



Obr. č. 1 Struktura α -, β -, γ -HBCD enantiomerů (Heeb et al.; 2007)

2. 2 HBCD v životním prostředí

HBCD nejsou v polystyrenu kovalentně vázány a tudíž mohou být uvolněny do životního prostředí, a to jak prostřednictvím emise během výrobního procesu, tak průmyslové aplikace a rovněž z produktů během a po jejich použití. Díky své persistenci byly HBCD detekovány a distribuovány po celé severní polokouli, včetně arktické oblasti (Haukas et al., 2009). Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti neumožňují transport vzduchem na dlouhé vzdálenosti, avšak jsou-li navázány na prachové částice nebo rozpuštěné v mořské vodě, mohou být distribuovány na velké vzdálenosti (Haukas et al., 2009). Zatímco v sedimentech bývá přítomen především γ -HBCD (> 90%), biota obsahuje vysoké koncentrace α -HBCD. β -isomer vždy zaujímá nejmenší procentuální podíl (DeBoer et al., 2002). Akumulace HBCD v životním prostředí a v živých organismech činí tyto látky možnými persistentními organickými polutanty (POPs).

2. 3 Toxické účinky HBCD na zdraví

HBCD jsou vysoce lipofilní a bioakumulativní látky. V potravinovém řetězci se zvyšuje jejich hladina a populační studie v Evropě, Japonsku, Rusku a USA zaznamenaly měřitelné koncentrace HBCD v plazmě a mateřském mléce (Covaci et al., 2006). HBCD nevykazují téměř žádnou nebo jen nízkou akutní toxicitu, dráždivost, mutagenitu nebo karcenogenitu, avšak opakované dávky poškozují játra, ovlivňují hormony štítné žlázy a způsobují poruchy plodnosti. Byly také *in vitro* zaznamenány neurotoxické efekty (Cantón et al., 2008; Lilienthal et al., 2008; van der Ven et al., 2009).

Hlavními expozičními cestami HBCD jsou: příjem potravy (akumulace HBCD v tukové tkáni u potravin živočišného původu) a inhalace („indoor exposition“) (Roosens et al., 2009). Vyloučení HBCD z tukové tkáně je výrazně pomalejší než z ostatních tkání, poločas eliminace trvá několik týdnů až měsíců. Tkáně obsahují vysoké koncentrace α -HBCD, což je pravděpodobně způsobeno biotransformací β - a γ -isomeru (Roosens et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno, HBCD mají negativní vliv na nervovou soustavu. Doposud byl pozorován nepříznivý vliv na učení a chování u myší (1,4 $\mu\text{mol/kg}$ tělesné hmotnosti) (Eriksson et al., 2006) a oxidační stres v nervových mozkových buňkách ryb (28 denní expozice, 500 $\mu\text{g/l}$) (Zhang et al., 2008). Mechanistické *in vitro* studie o neurotoxicitě HBCD jsou omezené. Zatím byla zaznamenána pouze inhibice uvolňování dopaminu v synapsích a synaptických váčcích a nekróza granulocytů v mozku po 24hodinové expozici (Mariussen, Fonnum, 2003; Reistad et al., 2006). Rovněž vliv HBCD na imunitní systém nebyl dosud příliš prozkoumán, nicméně bylo zjištěno, že HBCD snižují lytickou funkci a hladinu ATP v lidských lymfocytech (naturall killer cells) (Hinkson, Whalen, 2009).

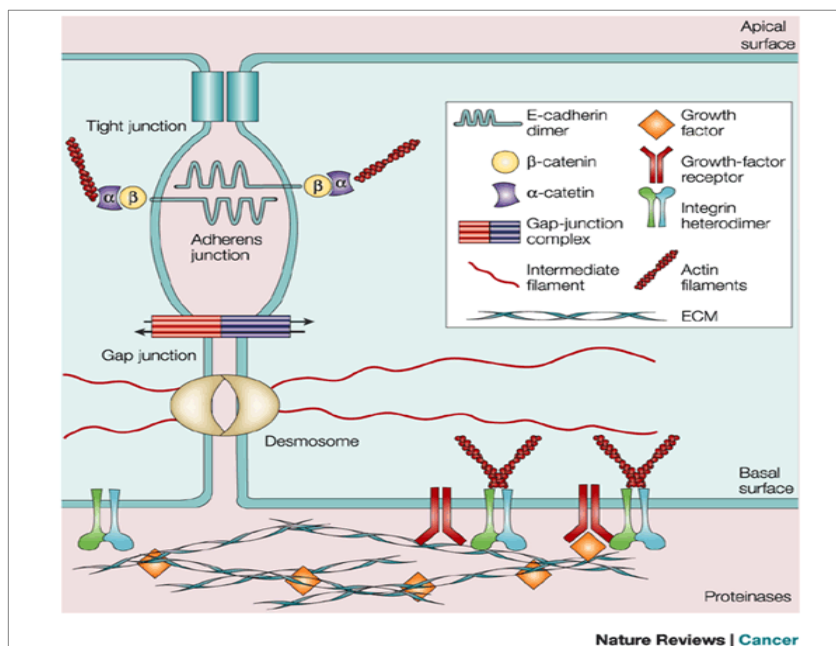
HBCD mají také vliv na hormony štítné žlázy: snižují hladinu tyroxinu a zvyšují hladinu tyrotropinu (Chengelis, 2001). *In vitro* studie prokázaly antiandrogenní aktivitu HBCD, rovněž byla pozorována interakce s receptory steroidních hormonů a inhibice aromatázy (Hamers et al., 2006). Je tedy pravděpodobná role HBCD jako endokrinního disruptoru (van der Ven et al., 2009).

Opakovanou expozicí HBCD u potkanů dochází ke zvýšení hmotnosti jater a aktivitě jaterních enzymů (Chengelis, 2001). HBCD v játrech rovněž indukují

metabolické biotransformační enzymy jako je cytochrom P450 (CYP) (Germer et al., 2006) a také mohou vyvolat rakovinu nemutagenním mechanismem. Bohužel se většina současných studií zkoumajících toxicitu HBCD nezaměřuje na jednotlivé isomery HBCD, ale zkoumá tyto látky ve směsi (Zhang et al., 2008). Existuje velmi málo studií těchto látek na úrovni jednotlivých stereoisomerů, avšak jednotlivé enantiomery již byly pomocí HPLC úspěšně separovány (Heeb et al., 2005). Pro zjištění ekologického rizika je tedy nutné stanovit potenciální toxicitu jednotlivých isomerů (Zhang et al., 2008). Především možné negenotoxické mechanismy související s nádorovou promócí nebyly u HBCD vůbec studovány.

2. 4 Mezibuněčná komunikace

Mezibuněčná komunikace je klíčová pro existenci mnohobuněčných organismů, neboť umožňuje koordinaci všech základních pochodů jako je růst, vývoj, dělení a organizace buněk do tkání. Základními typy mezibuněčné komunikace jsou: buněčná spojení, neurální, endokrinní, parakrinní a autokrinní komunikace (Alberts et al., 2008). Buněčné spoje lze rozdělit do tří funkčních skupin: těsné spoje (tight junction, TJ), ukotvující spoje (anchoring junction), mezi které patří adherentní spoje (adherent junction, AJ) a komunikační (mezerové) spoje (obr. č. 2) (Hartsock, Nelson, 2008; Alberts et al., 2008).



Obr. č. 2 Typy mezibuněčné komunikace (Bissell, Radisky, 2001)

2. 4. 1 Adherentní spoje

Hlavní funkcí adherentních spojů je umožnění vzájemné adheze mezi sousedními buňkami; podílejí se ale také na regulaci intracelulární signalizace a transkripční regulaci (Hartsock, Nelson, 2008). Adherentní spoj je tvořen interakcí Ca^{2+} závislých transmembránových proteinů rodiny kadherinů (E-kadherin) a kateninů (p120, α - , β -katenin). Cytoplasmatická doména kadherinů váže submembránový plak proteinů β -kateninů nebo plakoglobinů (γ -katenin), který je spojen k cytoskeletárnímu aktinu pomocí α -kateninu (Nagafuchi, 2001; Hartsock, Nelson, 2008). Maligní transformace často doprovází zásadní změny v organizaci cytoskeletu, snížení adheze a intracelulární signalizace, ve které se uplatňuje především volný β -katenin. Narušení normální buněčné adheze v transformovaných buňkách přispívá k zvýšené migraci a proliferaci nádorových buněk, což vede k jejich invazivitě a metastázování (Conacci-Sorrell et al., 2002).

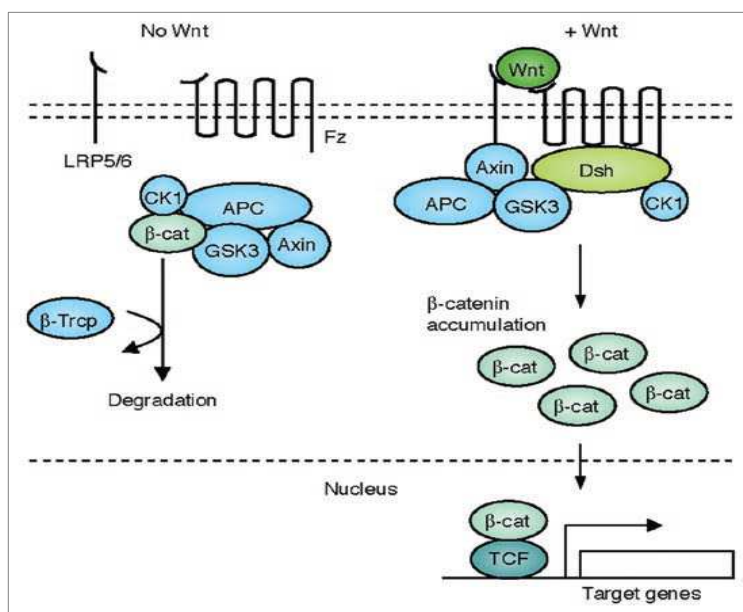
2. 4. 1. 1 E-kadherin

E-kadherin je hlavním proteinem rodiny kadherinů exprimovaným v epiteliálních buňkách. Jedná se o transmembránový Ca^{2+} -závislý glykoprotein; obsahuje pět charakteristických extracelulárních repetitivních domén, které tvoří trans – kadherinové interakce mezi sousedními buňkami a iniciují buněčnou adhezi a vznik adherentních spojů (Halbleib, Nelson, 2006). Pro správnou konformaci extracelulární kadherinové domény je nezbytná vazba Ca^{2+} . V cytoplasmatické doméně jsou dvě poměrně přesně definované katenin-vazebné domény (CBD), obsahující 94 aminokyselinových juxtamembránových domén, které váží p120-katenin a C-koncem váží β -katenin (Hartsock, Nelson, 2008). Kadherinem zprostředkovaná mezibuněčná adheze je vysoce dynamická a umožňuje reorganizaci rozptýlených buněk při normálním vývoji a při karcinogenezi. V nádorech ztráta buněčné adheze koreluje se supresí E-kadherinu a zvýšením proliferace a invazivity tumoru (Batlle et al., 2000).

2. 4. 1. 2 β -katenin

β -katenin obsahuje 13 repetitivních domén, které jsou tvořeny 42 aminokyselinami, které vytvářejí trojitou šroubovici. β -katenin se váže na C-konec cytoplasmatické domény E-kadherinu a je regulován fosforylací (Hartsock, Nelson, 2008). Hladina cytosolického β -kateninu je v buňce za normálních okolností nízká, neboť β -katenin vázaný v AJ je stabilní, zatímco volný β -katenin je fosforylován glykogensyntáza-kinázou 3β (GSK- 3β) a asociován v komplexu s proteiny axinem a APC (adenomatosis polyposis coli) a následně degradován ubiquitin-proteasomální cestou (Cavallaro, Christofori, 2004). Dojde-li ovšem k potlačení některého z mechanismů regulace tohoto proteinu, dochází k aktivaci Wnt dráhy (viz obr. č. 3); volný β -katenin je koaktivátor této dráhy. Klasická Wnt dráha je aktivována po navázání Wnt ligandu na receptor Fz (Frizzled) a koreceptor LRP5/6 (Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein). Na receptor Fz se naváže protein Dvl (Dishevelled) a vzniklý komplex Fz/Dvl fosforyluje LRP5/6. Fosorylovaný LRP5/6 umožní navázání Axinu k LRP. Vazbou Axinu na Dvl je destrukční komplex zablokován, neboť nedochází k přenosu fosfátové skupiny na β -katenin a tedy ani k jeho degradaci proteazomem (Komiya, Habas, 2008). β -katenin se akumuluje v cytoplasmě a

po dosažení určité koncentrace dochází k jeho translokaci do jádra, kde se naváže na transkripční faktor LEF/ TCF (lymphoid enhancer factor/ T – cell factor), čímž je indukována transkripce axinu2, cyklinu D1, c-myc a dalších genů (Hartsock, Nelson, 2008). Wnt dráha je klíčová během embryonálního vývoje, avšak její aktivace způsobená deregulací β -kateninu byla potvrzena v mnoha typech lidských nádorů (Conacci-Sorrell et al., 2002).



Obr. č. 3 Klasická Wnt signalizace bez přítomnosti Wnt ligandu a po navázání Wnt ligandu (Komiya, Habas, 2008)

2. 4. 2 Mezerové spoje (Gap junctions)

Gap junctions (GJs) jsou jedinými známými buněčnými strukturami, které umožňují přímý transport signálních molekul z buňky do buňky pomocí transmembránových hydrofilních kanálů. Hlavní funkcí GJ je zprostředkování mezibuněčné komunikace (GJIC), která je klíčová pro udržení homeostázy, nezbytná pro správnou regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy a hraje důležitou roli při tkáňové odpovědi na hormony; dále slouží jako elektrická synapse u neuronů, buněk hladkého svalstva, srdečních myocytů a podílí se na regulaci embryonálního vývoje (Segretain, Falk, 2004; Alberts et al., 2008). Kromě toho bylo zjištěno, že konexiny (stavební proteiny GJ, viz dále) mají jedinečné a specifické funkce; mohou hrát

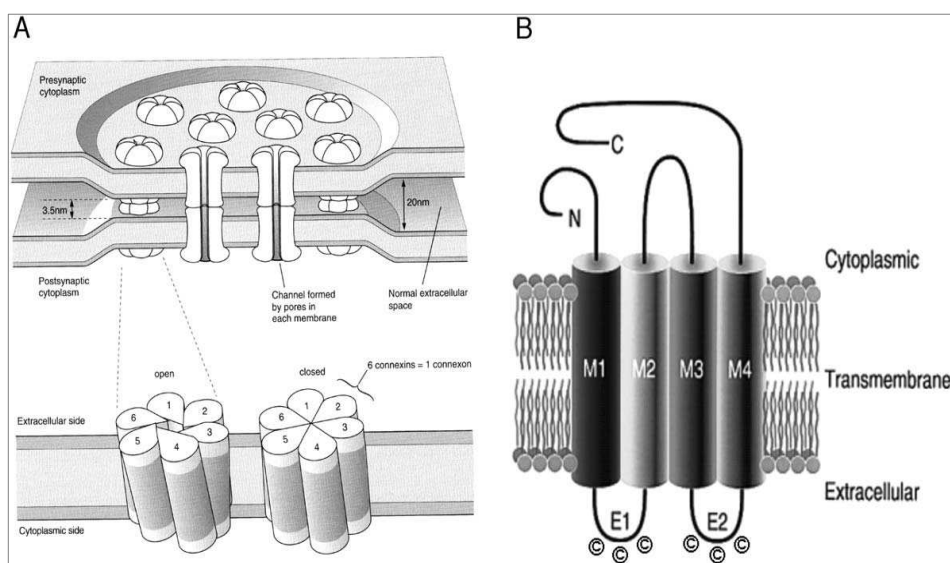
významnou roli při tvorbě nestabilních transičních mezibuněčných kontaktů (Segretain, Falk, 2004). Jsou-li mezerové spoje narušeny, dochází k inhibici mezibuněčné komunikace. Poškozená mezibuněčná komunikace je typická u nádorových buněk. Schopnost chemických látek inhibovat mezibuněčnou komunikaci mezerovými spoji je typickým markerem nádorových promotorů (Rosenkrantz et al., 2000; Machala et al., 2003; Šimečková et al., 2009a).

2. 4. 2. 1 Struktura mezerového spoje

Mezibuněčné spoje mají velmi krátký poločas života, pouze několik hodin, poté se spoj rozpadá a následuje ubiquitinace nebo lysozomální degradace (Mese et al., 2007, Berthouda et al., 2004). Mezerový spoj vzniká napojením dvou párových transmembránových proteinových komplexů, konexonů. Samotný konexon je složen z šesti homomerních nebo heteromerních podjednotek patřících do proteinové rodiny konexinů. Mezi konexiny je prázdný prostor, jímž mohou procházet malé molekuly (< 1,5 kDa) (Perkins et al., 1997).

Konexin obsahuje čtyři transmembránové domény, které tvoří stěnu kanálu. Tyto domény jsou spojeny dvěma extracelulárními smyčkami, které jsou významné pro mezibuněčné rozpoznání. Smyčka obsahuje tři konzervativní cysteinová rezidua, která vytvářejí intrakonexinové disulfidické můstky (viz obr. č. 4). Cytosolový N-konec konexinu je vysoce konzervativní, zatímco C-konec má velmi variabilní sekvenci a délku (Mese et al., 2007). Jednotlivé konexiny se liší molekulovou hmotností, proto jsou jednotlivé konexiny označeny číslicí, která je rovna jejich molekulové hmotnosti, např. Cx43 má 43 kDa (Sohl, Willecke, 2004).

Kanálky se mohou otevírat/uzavírat na základě změny terciální struktury konexinů indukované např. fosforylací. Uzavírání mezerových spojů je navozeno apoptickými a stres-indukujícími signály, ale má také ochrannou funkci, například před šířením toxinů.



Obr. č. 4 Schéma mezerového spoje (Sohl, Willecke, 2004)

Tmavší odstín označuje část konexonu zanořenou do membrány, válce představují transmembránové domény (M1-M4). Smyčky mezi prvním a druhým a mezi třetím a čtvrtým válcem představují extracelulární (E1 a E2) transmembránové domény, na nichž jsou navázána tři cysteinová rezidua.

2. 4. 2. 2 Konexin 43

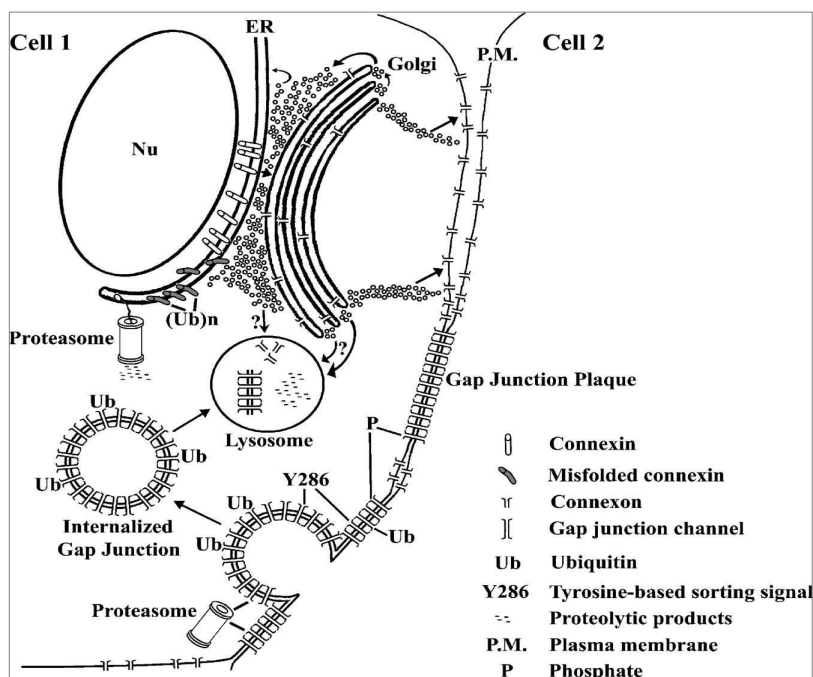
Konexin 43 (Cx43) je nejvíce exprimovaným a široce studovaným proteinem rodiny konexinů. Životní cyklus Cx43 je komplexní, vysoce regulovaný a velmi dynamický proces (Berthoud et al., 2004).

Konexin 43 je syntetizován v endoplasmatickém retikulu (ER), v post – ER/Golgiho aparátu je oligomerizován do struktury konexonu a pak dopravován pomocí Golgiho aparátu do plasmatické membrány. Špatně složený nebo nevhodně oligomerizovaný Cx43 je vrácen zpět do ER a štěpen proteasomální (polyubikvitinovou) nebo lyzozomální cestou (viz obr. 5). Některé konexiny/konexony putují ihned po sekreci do membrány do lyzozomů, ostatní vytvoří mezerový spoj. Konexin v mezerovém spoji je na konci životního cyklu fosforylován (existuje několik fosforylačních míst – tyrosinových a serinových) a poté ubikvitinován (Berthoud et al., 2004).

Tyto modifikace/signály jsou rozpoznány a indukují endocytosu. Například, EGF (epidermal growth factor) inhibuje GJIC aktivací MAP (mitogen activated protein)

kináz ERK1/2, které hyperfosforylují Cx43, což vede k jeho degradaci a rozpadu konexonu (Cameron et al., 2003).

Nejvíce studovaný klasický inhibitor mezibuněčné komunikace a tumorový promotor 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát (TPA) aktivuje proteinkinázu C, která pak hyperfosforyluje Cx43, který je následně ubikvitinován, v důsledku čehož dochází k inhibici mezibuněčné komunikace (Leithe, Rivedal, 2004).



Obr. č. 5 Degradací cesty konexinu (Berthoud et al., 2004)

2. 5 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je vysoce řízený proces, při kterém dochází k rozdělení mateřské buňky na dvě dceřinné. Je rozdělen do interfáze a M-fáze (zahrnující mitosu a cytokinesi).

V interfázi se buňka nachází mezi dvěma buněčnými děleními a je přípravnou fází pro dělení buňky. Dochází zde k syntéze molekul a kontrole správnosti procesů nutných pro vznik nové buňky. Zahrnuje postmitotickou G1- (gap 1) fází, která se vyznačuje metabolickou aktivitou buňky, je v ní syntetizována RNA a probíhá proteosyntéza, nikoli však replikace DNA. Buněčný cyklus je v této fázi ovlivňován

negativními a pozitivními růstovými signály. Projde-li buňka bodem restrikce, což je první kontrolní bod buněčné proliferace, vstupuje do S- (syntetické) fáze. V S-fázi je replikována DNA a syntetizovány histony. Po S-fázi následuje G2- (gap 2, premitotická) fáze, ve které jsou syntetizovány proteiny nutné pro vstup do M-fáze a dochází k dalšímu zvětšování buňky. V G2-fázi se nachází druhý kontrolní bod, který je řízen komplexem MPF (Mitosis Promoting Factor), jež řídí vstup buňky do mitosy (Alberts et al., 2008). U diferencovaných buněk je možná ještě G0-fáze, klidový stav buňky. Do G0-fáze buňka vstupuje, nemá-li příznivé podmínky pro dělení.

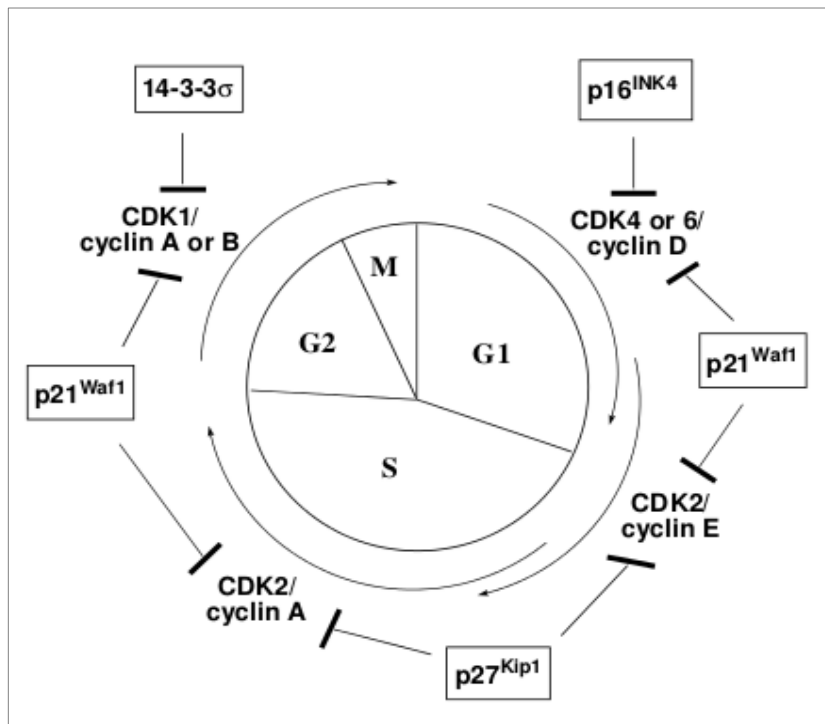
Výrazně kratší oproti interfázi, avšak velmi dynamická je M-fáze. Zahrnuje mitosu (dělení jádra), odpovídá za rozdělení dceřiných chromosomů a je završena cytokinesí.

Mimo hlavní kontrolní body G1/S a G2/M existují ještě další dva: první se nachází v S-fázi a zastavuje buněčný cyklus, není-li DNA úplně zreplikovaná. Druhý kontrolní bod zastavuje dělení buňky v M-fázi, pokud není správně vytvořeno dělicí vřetenko (Garret, 2001).

2. 5. 1 Regulace buněčného cyklu

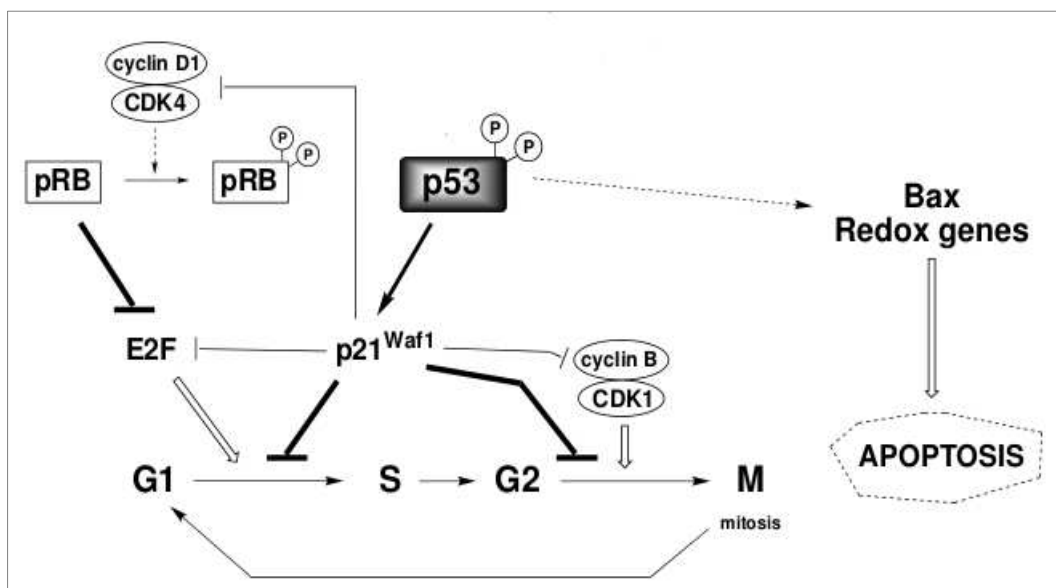
Přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu je řízen cykliny, které s cyklin-dependentními kinázami (CDKs) vytvářejí aktivní komplexy (viz obr. č. 6). CDKs mají v buňce klíčovou úlohu, neboť jejich aktivace cykliny nebo inaktivace CDK inhibitory (CKI) tvoří molekulární podstatu regulace buněčného cyklu (Malumbres, Barbacid, 2009).

Jak již bylo zmíněno, přechod z G1 do S-fáze je ovlivněn přítomností růstových faktorů. Jejich přítomnost je nezbytná pro syntézu cyklinu D, které vytvářejí s CDK2, CDK4 a CDK6 aktivní komplex, který fosforyluje Rb (retinoblastoma) protein. Fosforylace způsobí uvolnění Rb proteinu z vazby na transkripční faktor E2F, čímž je spuštěna transkripce genů pro S-fázi (viz obr. č. 7) (Israel, Israel, 2000). Na začátku S-fáze dochází k expresi cyklinu A a následnému vzniku komplexu cyklin A/Cdk2, který fosforyluje protein Cdc6, který spouští replikaci DNA. Ke konci S-fáze se komplex cyklin A/Cdk2 rozpadá, cyklin A vytváří vazbu s Cdk1 a buňka přechází do G2-fáze. V G2-fázi je exprimován cyklin B; ten se váže na Cdk1 a tak vzniká MPF komplex a buňka vstupuje do mitosy.



Obr. č. 6 Schematický průběh buněčného cyklu (Luch, 2002)

β -katenin/TCF signální dráha zvyšuje expresi cyklinu D1 a snižuje expresi inhibitoru cyklin-dependentních kináz, proteinu p21^{WAF}. Je-li narušen regulační degrační mechanismus β -kateninu, může dojít k nežádoucí aktivaci Wnt dráhy a chybné regulaci cyklinu D1, což může přispívat ke ztrátě regulace růstu, která je typická pro nádorové buňky (Quasnichka et al., 2006, Israel, Israel, 2000). Protein p21 hraje klíčovou roli v obou hlavních kontrolních bodech buněčného cyklu. Dojde-li z nějakého důvodu k poškození buňky (např. genotoxické poškození cizorodou látkou), jsou jako odpověď exprimovány tumor-supresorové proteiny p53 a p21, které po své aktivaci zpomalují nebo dokonce zastavují buněčný cyklus a navozují reparační mechanismy (Luch, 2002). Protein p53 má dvě důležité funkce: umožňuje reparaci DNA a navozuje apoptózu. p53-indukovaná zástava buněčného cyklu v přechodu z G1 do S-fáze a/nebo z G2 do M-fáze je zprostředkována proteinem p21^{WAF} (Binková et al., 2000).



Obr. č. 7 Regulace postupu buněčného cyklu kontrolními body v G1/S a G2/M fázi (upraveno podle Luch, 2002)

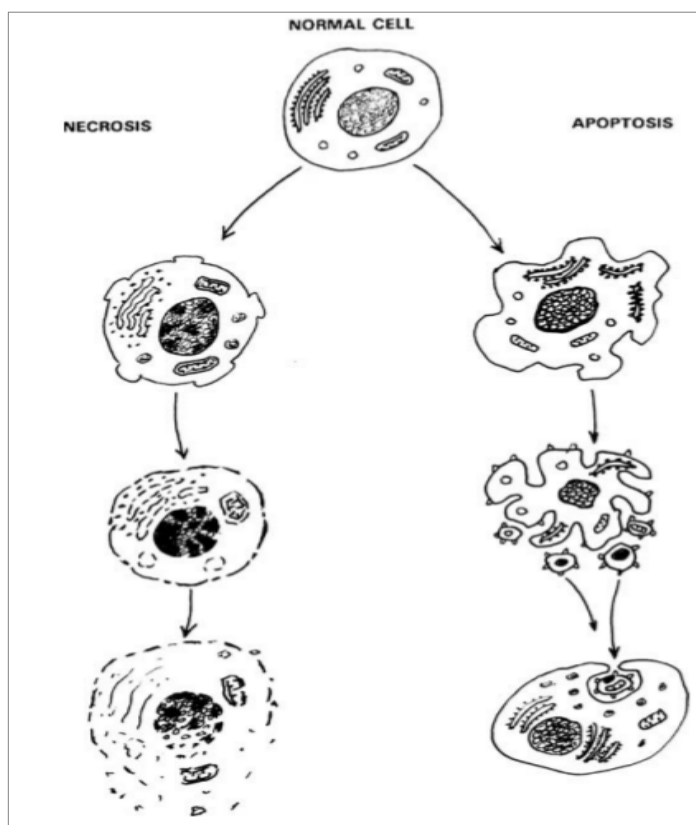
2. 6 Buněčná smrt

Buněčná smrt je souhrn procesů vedoucích k zániku buňky. Buněčnou smrt lze rozdělit podle toho, zda se buňka na svém zániku aktivně podílí (programovaná buněčná smrt) nebo jde-li o pasívní zánik (nekróza) (viz obr. č. 8).

Nejčastějším typem programované buněčné smrti je apoptóza. Jedná se o normální fyziologický zánik buňky, důležitý pro udržení životaschopnosti tkání, v embryonálním vývoji a zajišťuje rovnováhu buněčné proliferace (Sládek, Ryšánek, 1999). Proces apoptózy může být také navozen u buněk napadených virem nebo s chemicky poškozenou DNA. Během apoptózy je v jádře i cytoplasmě navozena celá řada změn. Jádro se rozpadá na fragmenty a buňka se smršťuje. Nedochozí však, na rozdíl od nekrózy, k narušení integrity plasmatické membrány. Apoptotické buňky se rozpadají na vesikuly obklopené membránou, tzv. apoptotická tělíska. Tato mají na povrchu membrány fosfatidylserin, který spouští uvolnění protizánětlivých cytokinů. Apoptotická tělíska jsou z tkáně odstraněna makrofágy nebo jsou fagocytována sousedními buňkami (Taylor et al., 2008). Apoptózu lze podle průběhu rozdělit na dvě kaskády, vnitřní a vnější. Obě cesty jsou závislé na kaspázách (cysteinyl aspartate

proteasy), které aktivují kaskádu vedoucí k tvorbě apoptotických tělísek, fragmentaci DNA a štěpení proteinů (Johansson et al., 2010).

Oproti apoptóze, nekróza je obvykle považována za pasívní způsob buněčné smrti. Nekróza je výsledkem bioenergetického zhroucení vyplývajícího ze spotřebování ATP až na hladinu neslučitelnou s přežitím buňky a obvykle nastává při fyzickém poškození buňky nebo intoxikací či jiných vnějších zásazích (Edinger, Thompson, 2004). Morfologicky je charakterizována vakuolizací a porušením cytoplasmatické membrány a indukci zánětu. Dochází ke změnám v jaderné morfologii, nikoli však ke kondenzaci a fragmentaci jako u apoptózy. Zatímco apoptóza je buňkou řízený proces, u nekrózy se jedná o proces neregulovaný.



Obr. č. 8 Nekróza a apoptóza (van der Meer et al., 2010)

3. Materiál a metody

3. 1 Testované látky

Testovanými látkami byly α -, β - a γ -isomery hexabromocyklododekanu (HBCD). Purifikované α -, β -isomery byly laskavě poskytnuty prof. Ake Bergmanem (Stockholm University, Sweden), γ -isomer byl komerčně zakoupen jako technická směs (Sigma, ČR). Byla provedena LC/MS/MS analýza a stanoven 98,77% podíl γ -isomeru v této technické směsi (viz tab. č. 1). Modelovými indukčními látkami byl 2,2',4,4',5,5'-hexachlorbifenyl (PCB 153, Promochem, Germany) a 12-O-tetradekanoylforbol 13-acetát (TPA, Sigma, ČR) a Dibenzo[a,l]pyren (DBaP, AccuStandard, Inc., USA). Jako inhibitor proteozomální degradace byl použit MG132 (N-(benzyloxykarbonyl) leucinylleucinylleucinal, Sigma, ČR) a jako inhibitor ERK1/2 U0126 (4-diamino-2,3-dikyano-1,4-bis (2-aminofenylthio) butadien, Cell Signaling, USA). Pozitivní kontrolou pro inhibici mezibuněčné komunikace byl fluoranthen (Sigma, ČR), dimethylsulfoxid (DMSO) byl použit jako rozpouštědlo a negativní kontrola.

Tab. č. 1 LC/MS/MS analýza technické směsi HBCD

Analyt	RT [min]	Area	Area%
α -HBCD	10,430	40	0,41
β -HBCD	10,644	80	0,82
γ -HBCD	10,854	9812	98,77

3. 2 Buněčná linie WB-F344

Buněčná linie WB-F344 je progenitorová nenádorová populace buněk, izolovaná z jater dospělého potkaního samce Fischer-344 (Tsao et al., 1984). Tato linie byla laskavě poskytnuta profesorem Jamesem E. Trosko (East Lansing, USA). Práce s buněčnými liniemi probíhala sterilně v laminárním flow boxu za použití sterilních roztoků a nástrojů.

3. 3 Rozmrazování a zamrazování buněčných linií

Při rozmrazování buněčné linie byla zkumavka přenesena do sterilního boxu a do kultivační láhve (25cm²) bylo pipetováno 7 ml příslušného kultivačního média. Rozmrazování bylo urychleno opakovaným přidáváním média sterilní pasterovou pipetou a poté byly buňky přeneseny do kultivační lahve a umístěny do termostatu se stabilními podmínkami (teplota 37°C, 5% CO₂, vlhkost 95 %). Při zamrazování byla pasáží získaná buněčná suspenze naředěna a pipetována do zamrazovacích zkumavek po 1,2 ml, poté bylo přidáno 150 µl sterilního fetálního bovinního séra (FBS) a 150 µl dimetylsulfoxidu (DMSO). Suspenze byla promíchána a zkumavky uloženy do zamrazovací krabičky (NALGENE, Sigma C1562) naplněné isopropanolem, která byla umístěna do mrazicího boxu, kde probíhalo gradientové zmrazování a poté byly buňky uchovávány v kapalném dusíku (-80°C).

3. 4 Kultivace buněčné linie WB-F344

Buněčná linie WB-F344 byla sterilně kultivována v termostatu při 37°C v kultivačních nádobách a v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, UK) s fenolovou červení, obohaceném o 5% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma, ČR), NaHCO₃ (20 mM, Lachner, ČR), HEPES (10 mM, Sigma, ČR) a antibiotikum gentamicin (10 mg/ml, Sigma, ČR)

3. 4. 1 Složení média DMEM s fenolovou červení

Reagencie byly rozpuštěny v 1l deionizované miliQ vody a pH upraveno na 7,1 – 7,15. Po přidání antibiotika gentamycinu bylo médium sterilně přefiltrováno.

Práškové medium DMEM.....	10,00 g/l
NaHCO ₃	2,00 g/l
HEPES	2,39 g/l
Gentamycin.....	4,00 ml (10 mg/ml)
FBS.....	5 % v/v

3. 4. 2 Příprava sterilního fosfátového pufru (PBS)

PBS je užíván k oplachu buněk. Uvedené navážky chemikálií byly rozpuštěny v 1 l miliQ vody a pH upraveno na 7,2. Roztok byl sterilizován v autoklávu 20 minut při 115°C.

NaCl.....	8,00 g/l
KCl.....	0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	2,89 g/l
KH ₂ PO ₄	0,20 g/l

Jinou možností je příprava PBS z tablet dle návodu výrobce (Oxoid, England). I v tomto případě probíhá sterilizace v autoklávu 20 minut při 115°C.

3. 4. 3 Pasážování buněk

Ze 75 cm² kultivační lahve bylo odstraněno médium buňky opláchnuty 2x 5 ml sterilního PBS a přidán 1 ml 0,05% trypsinu – EDTA. Poté byly buňky inkubovány 3 – 5 min v termostatu a po jejich uvolnění ze dna byly setřepány do spodní části lahve. Přídavkem 3 ml kultivačního média zahřátého na 37°C došlo k inhibici trypsinu a následným rozsuspendováním bylo zabráněno shlukování buněk. V láhvi po pasáži byla ponechána cca 1/10 buněčné suspenze a přidáno 10 – 11 ml média. Láhev byla uložena do termostatu a zbylá buněčná suspenze použita k dalšímu experimentu.

3. 4. 4 Příprava vzorků buněk pro testování *in vitro*

Část zbylé buněčné suspenze byla použita pro sazení *in vitro*. Část buněk byla odebrána a naředěna PBS v poměru 1:9 a pomocí Bürknerovy komůrky byl stanoven počet buněk/ml. Dle designu experimentu byly buňky nasazeny do mikrodisek, popř. misek a přemístěny do termostatu na 37°C. Po dosažení konfluency byly buňky exponovány testovanými látkami.

3. 5 Testy cytotoxicity

Pro měření cytotoxicity byly sterilně nasazeny buňky do 96jamkové desky v koncentraci 100 000 buněk na 1 ml média, růst 48 hodin. Cytotoxicita byla měřena po 24hodinové expozici jednotlivých koncentrací testovaných látek. Cytotoxicita byla měřena dvěma metodami: pomocí MTT a neutrální červeně. Výsledky byly měřeny pomocí přístroje iEMS reader MF (Labsystems) a vyhodnoceny programem Gen5 při absorbanzi 540 nm.

3. 5. 1 MTT test

Principem této metody je enzymatická přeměna žluté tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bifenyltetrazolium bromid, Sigma, ČR) na, ve vodě nerozpustný, modrý formazan. Používá se pro stanovení dehydrogenasové aktivity ve tkáních nebo tělních tekutinách. Změnou absorbanze (mrtvé buňky formazan neprodukuje) lze zjistit cytotoxicitu exponovaných látek.

Po odsání média bylo do každé jamky napipetováno 25 μ l MTT (37 °C; 2,5 mg/ml PBS) a 2 – 3 hodiny probíhala inkubace v termostatu. Enzymová reakce byla ukončena přidáním 100 μ l 10% SDS (pH 7,4) a test vyhodnocen (viz výše).

3. 5. 2 Test cytotoxicity pomocí neutrální červeně (NRU)

Neutrální červeně (Sigma, ČR) je kationtové barvivo, které snadno penetruje přes buněčnou membránu a hromadí se v buněčných lysozomech, kde se v matrix váže na aniontová vazebná místa. Poškozené nebo mrtvé buňky ztrácí schopnost zadržovat NR, která se během promývací/ fixační procedury z takových buněk vymyje. Změnou absorbanze tak lze stanovit cytotoxicitu exponovaných látek.

Po odsání média bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l neutrální červeně (37 °C, 80 μ g/ml). Buňky byly s NR inkubovány 3 hodiny v termostatu a poté byl roztok odsát a do mikroděsky bylo pipetováno 100 μ l fixačního roztoku

(1g CaCl₂ ve 100 ml 0,5% formaldehydu) a následovala inkubace 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byly buňky opláchnuty 2x 100 µl PBS, do každé jamky přidáno 200 µl lyzačního roztoku (1% kyselina octová v 50% ethanolu) a mikrodiskou bylo po dobu lyzace (30 minut) třepáno na deskové třepačce. Po ukončení inkubační doby byly test vyhodnocen (viz výše).

3. 6 Měření modulace GJIC (gap junctional intercellular communication)

Měření GJIC se provádí metodou SL/DT. U této metody je sledována vzdálenost transportu fluorescenční sondy (luciferázová žlut^á) od místa provedení řezu v buněčné monovrstvě přes mezerové spoje v závislosti na působení sledované látky. Vzdálenost je odečtena pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Buňky byly sterilně nasazeny do 24jamkových desek v koncentraci 150 000 buněk na ml, růst 48 hodin. Po dosažení konfluence byly v daných časech exponovány příslušnými látkami a proveden test. Buňky byly opláchnuty 2x PBS a do každé jamky bylo pipetováno 250 µl 0,05% luciferázové žlut^á a provedeny 3 řezy. Mikrodiska byla ponechána 2 – 3 minuty ve tmě. Po ukončení inkubační doby byla luciferázová žlut^á odsáta a buňky 2x opláchnuty PBS a fixovány 4% formaldehydem. Vyhodnocení bylo provedeno fluorescenčním mikroskopem Nikon ECLIPSE TE200 v programu LUCIAG.

3. 7 Detekce apoptózy a měření fází buněčného cyklu

3. 7. 1 Sklizení buněk pro průtokovou cytometrii a barvení DAPI

Buňky byly sterilně nasazeny do 6jamkových desek v koncentraci 100 000 buněk na ml, růst 72 hodin. Konfluentní buňky byly po 24 hodin exponovány testovanými látkami a sklizeny. Médium i první oplach PBS byl odsát do označených zkumavek. Do každé jamky bylo přidáno 300 µl trypsinu a po uplynutí inkubační doby

(v termostatu 2 – 3 min) byl trypsin inhibován 10% roztokem FBS v PBS. Buňky byly rozsuspendovány a odsáty do označených zkumavek. Následně probíhala centrifugace (200 g/5 minut) a po ukončení centrifugace byl supernatant odstraněn.

Pro barvení DAPI a pro měření fází buněčného cyklu byly vzorky fixovány přidáním 2 ml vychlazeného 70% ethanolu a uloženy v chladničce. Fixace probíhala 24 hodin.

Pro detekci fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos byly použity živé buňky.

3. 7. 2 Detekce apoptózy fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos

Principem této metody je specifická vazba Annexinu-V na molekuly fosfatidylserinu, který se nachází na povrchu cytoplasmatické membrány. Během rané fáze apoptózy dochází k přemístění fosfatidylserinu z vnitřní strany cytoplasmatické membrány na vnější stranu. Annexin-V je označen fluorochromem a apoptotické buňky je tak možné detekovat pomocí průtokového cytometru. Součástí testu je také značení pomocí propidium jodidu (PI) který se váže na DNA. Označuje nekrotické buňky, jejichž membrána ztratila integritu a dovoluje tedy průnik PI do jádra.

Ke stočeným buňkám bylo přidáno 100 μ l inkubačního pufru (10mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7,4), 10 μ l 6x naředěného propidium jodidu (Alchimica, 2,5 mg/ml) a 10 μ l 10x naředěného annexin-V-Fluos (Roche). Poté probíhala 15 minut inkubace v termostatu. Těsně před měřením bylo do každé zkumavky přidáno dalších 100 μ l inkubačního pufru a poté byla měřena fluorescence na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) při emisní vlnové délce 515 nm (annexin) a 617 nm (propidium jodid). Procentuální zastoupení apoptotických a nekrotických buněk bylo hodnoceno v programu WinMDI 2.8 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3. 7. 3 Detekce apoptotické fragmentace jader

DAPI (4',6-diamino-2-fenylindoldihydrochlorid) (Roche Diagnostics, Germany) se váže do menšího závitů DNA na AT bohatá místa za vzniku modré fluorescence.

Takto označené buňky lze pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem a vizuálně odlišit fragmentované buňky.

Buňky fixované v ethanolu byly promíchány na Vortexu a po promíchání byl přidán DAPI (1 μ g/ml). Poté byla buněčná suspenze 3 – 5 minut barvena ve tmě při laboratorní teplotě a následně probíhala centrifugace 200g/5min. Supernatant byl odsát a suspenze byla promíchána v 10 μ l MOWIOLu (MOWIOL-DABCO Anti photobleaching Mounting Media, Calbiochem, Germany). Na podložní sklíčko bylo pipetováno 5 μ l suspenze a po překrytí krycím sklíčkem dále uchovávána v chladničce. Měření bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon ECLIPSE TE200 (Nikon Instruments Inc, USA). Z náhodně vybraného pole bylo pozorováno 300 buněk, přičemž byl vyjádřen procentuální podíl apoptických buněk.

3. 7. 4 Měření fází buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru

V jednotlivých fázích buněčného cyklu je obsah DNA různý a pomocí specifického barvení a užitím průtokového cytometru lze rozlišit na základě změny intenzity fluorescence G1 fázi (obsah diploidní DNA 2n), S fázi (obsah DNA 2n – 4n) a G2/M fázi (obsah DNA 4n). Výsledná data jsou zakreslena jako počet buněk versus intenzita fluorescence, která je úměrná obsahu DNA.

Buněčná suspenze, fixovaná v ethanolu, byla stočena při 200g/5 minut a odsát supernatant. Poté byly buňky centrifugovány s 4 ml studeného PBS, odsát supernatant a přidáno 200 μ l studeného Vindelova roztoku. Inkubace probíhala v termostatu 30 minut a následně byly výsledky vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) při emisní vlnové délce 617 nm. Jednotlivé fáze buněčného cyklu byly měřeny v programu ModFit LT 3.0 (Verity Software House, Topsham, ME, USA)

Vindelův roztok (20 ml)

1M TRIS (tris(hydroxymetyl)aminometan)....200,0 μ l
RNAsa (Sigma, ČR).....2,8 ml
Triton-X -100.....200,0 μ l

Propidium jodid (2,5g/ml, Sigma, ČR).....400,0 µl
 MiliQ voda.....16,4 ml

3. 8 Imunocytochemie – detekce konexinu 43

Imunocytochemická metoda je založena na použití protilátky k detekci antigenu v buňkách. Principem je fixace proteinu (antigenu) v buněčné monovrstvě a navázání specifické primární a sekundární protilátky. Sekundární protilátka je značená fluorescenčním barvivem a sledovaný protein je tak vizualizován přímo v buňce.

Buňky byly sterilně nasazeny na krycí sklíčka ve 4jamkových deskách v koncentraci 100 000 buněk na ml, růst 72 hodin. Po dosažení konfluence byly v daných časech exponovány testovanými látkami a sklizeny. Po expozici bylo z jamky odsáto médium, byly opláchnuty studeným PBS (4 °C) a fixovány přes noc v 250 µl směsi aceton: metanol (1:1). Sklíčka lze zamrazit k dalšímu použití nebo pokračovat v následujícím postupu.

Jamky byly promyty 3x 10 minut 0,5 ml promývacího roztoku (složení viz níže) a inkubovány 60 minut ve 200 µl 3% BSA. Poté byly buňky 2 hodiny inkubovány s primární protilátkou (tab. č. 2). Po odsátí primární protilátky byly jamky promyty 3x 10 minut 0,5ml promývacího pufru a následovala inkubace 1,5 hodiny ve tmě se sekundární protilátkou značenou fluorescenční sondou FITC. Po ukončení inkubační doby byla sekundární protilátka (tab. č. 2) odsáta a sklíčka opláchnuty 3x 10 minut 0,5 ml promývacího pufru. Sklíčka s buňkami byla vytažena a lícem dolů přiložena do 3 µl MOWIOLu nakápnutém na podložním skle. Vyhodnocení bylo provedeno na fluorescenční mikroskopu Nikon ECLIPSE TE200 v programu LUCIA G.

Tab. č. 2 Použitá primární a sekundární protilátka

Primární protilátka	Výrobce	Ředění	Sekundární protilátka	Výrobce	Ředění
Connexin 43	Sigma – Aldrich, ČR	400x promývací roztok	Fluorescein–labeled Antirabbit IgG	GE Healthcare, UK	50x promývací roztok

Promývací roztok (1 l)

4 M NaCl.....	25,0 ml
2M TRIS (pH= 7,4).....	10,0 ml
Tween20 (Sigma).....	0,5 ml

Uvedené množství látek bylo poté doplněno destilovanou vodou na objem 1 l.

3. 9 Detekce proteinů metodou Western Blotting

3. 9. 1 Příprava buněčného lyzátu

Buňky byly sterilně nasazeny do 6jamkových desek v koncentraci 100 000 buněk na ml, růst 72 hodin. Po dosažení konfluence bylo médium odsáto, buňky byly opláchnuty PBS (4°C) a přidáno 120 µl studeného lyzačního pufru (4°C). Lyzát byl sklizen pomocí buněčné škrabky, přepipetován do mikrozkušavek a pro další použití zamrazen na -80°C. Po rozmrazení byly buňky ozvučeny ultrazvukovou jehlou a poté byl stanoven obsah bílkovin pomocí bicinchoninové kyseliny.

Lyzační roztok (1 ml)

1 M NaF.....	1 µl
0,1M PMSF.....	10 µl
1 M Na ₃ VO ₄	1 µl
1 M TRIS (pH= 7,4).....	100 µl
10% SDS (dodecylsírán sodný).....	100 µl
Glycerol.....	100 µl

Uvedené množství látek bylo poté doplněno destilovanou vodou na objem 1 ml

3. 9. 2 Stanovení koncentrace bílkovin bicinchoninovou kyselinou

Metoda využívá kyseliny bicinchoninové ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Principem je alkalická redukce měďnatého iontu proteinem na měďný iont a následná chelatace vzniklého měďného iontu bicinchoninovou kyselinou za vzniku zabarvení.

Do 96jamkové desky bylo v triplikátech napipetováno 20 μ l proteinového standardu BSA (bovinní sérový albumin), čímž byla vytvořena kalibrační řada o koncentraci BSA 0 mg/ml (PBS), 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml.

V duplikátech byly pipetovány 3 x předřaděné vzorky a poté bylo jednotlivým vzorkům, standardům a jako blank přidáno 200 μ l roztoku kyseliny bicinchoninové a CuSO_4 (50:1). Inkubace v termostatu (37 °C) probíhala 30 minut a poté byla koncentrace bílkovin změřena na iEMS readeru MF (Labsystems) a vyhodnocena programem Gen5 při absorbanci 540 nm. Na základě zjištěných koncentrací byly vzorky vzorkovým redukujícím roztokem a lyzačním roztokem upraveny na stejnou koncentraci a povařeny 5 minut, rozděleny na alikvoty a zamrazeny na -80°C.

Redukující roztok

0,5M TRIS (pH= 6,8).....	2,6 ml
10% Glycerol.....	2,0 ml
10% SDS.....	4,0 ml
5% merkaptoethanol.....	1,0 ml
Bromfenolová modř.....	1,0 mg
Destilovaná voda.....	10,4 ml

3. 9. 3 SDS-PAGE elektroforéza

Tato technika je užívána k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti.

Příprava gelů

Do stojánku s vyčištěnými skly byla nalita směs pro separační gel a převrstvena isobutanolem nasyceným vodou. Po zpolymerizování gelu (cca 1 hodina) byl isobutanol odsát a gel převrstven ekvilibračním roztokem, který byl po 5 min rovněž odsát a na gel byla nalita směs na zaostřovací gel a vložen 10jamkový nebo 15jamkový hřebínek. Zaostřovací gel polymeroval asi 30 min.

10% separační gel (10 ml)

40% bis-akrylamid.....	2,50 ml
Separační pufr (1,5 mM Tris – HCl, pH 8,8).....	2,50 ml
10% SDS.....	0,10 ml
Destilovaná voda.....	4,45 ml
TEMED (tetramethylethylendiamin).....	15,00 μ l
10 % APS (persíran amonný).....	30,00 μ l

5% zaostřovací gel (10 ml)

40% bis-akrylamid.....	1,25 ml
Zaostřovací pufr (0,5 mM Tris – HCl, pH 6,8).....	2,50 ml
10% SDS.....	0,10 ml
Destilovaná voda.....	6,15 ml
TEMED.....	15,00 μ l
10% APS.....	30,00 μ l

Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl odstraněn hřebínek a vzniklé jamky byly opláchnuty destilovanou vodou. Skla s gelem byla uchycena do aparatury pro elektroforézu, mezi skla i vně byl nalit elektrodový pufr. Do první jamky byl pipetován proteinový standard (Fermentas, Thermo Scientific, USA), do ostatních jamek byly naneseny vzorky dle rozpisu. K aparatuře připojeny elektrody a zapnut zdroj stejnosměrného proudu s konstantním napětím 80 mV, které bylo po průchodu vzorků zaostřovacím gelem zvýšeno na 120 mV.

10x koncentrovaný elektrodový pufr (pH= 8,3)

0,25 M TRIS.....	30 g
Glycin.....	144 g
1% SDS.....	10 g
Destilovaná voda.....	1 l

3. 9. 4 Western Blotting

Western blotting je technika na bázi elektroforézy a enzymatické reakce, při které jsou za použití protilátek detekovány látky proteinové povahy. Rozlišují se dva způsoby provedení blottingu: tzv. „tankový (tank, wet)“ blotting a „polosuchý (semi – dry)“ blotting. Podstatou semi – dry blottingu je přenos vzorků z gelu na membránu pomocí blotovacího zařízení. Následná detekce byla provedena pomocí specifických protilátek. Western bloty byly densitometricky vyhodnoceny programem ImageJ.

PVDF (polyvinylidifluoridovou, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) membrána byla aktivována namočením na několik vteřin do methanolu, poté promyta 5 min v destilované vodě a přenesena na 10 min do 10x ředěného blotovacího pufru. Dále byla připravena blotovací aparatura: elektrody byly navlhčeny 10x ředěným blotovacím pufrem a na anodu bylo položeno 5 rovněž navlhčených filtračních papírů, PVDF membrány a na ně gely promyté v 10x ředěném blotovacím pufrem s odstraněným zaostřovacím gelem. Membrány s gely byly překryty navlhčenými filtračními papíry. Poté byl okruh uzavřen katodou a aparatura zapojena na 1 hod při 400 mA.

Blotovací pufr (na 1l)

25 mM Tris, 192 mM glycin, 15% methanol, pH 8,3

3. 9. 5 Detekce proteinů pomocí protilátek

Po ukončení blottingu byla membrána na 1 hodinu ponořena do blokovacího pufru (5% mléko v promývacím roztoku s 0,05% Tween20, pH 7,15), čímž došlo k

zablokování nespecifických vazebných míst. Membrány byly inkubovány přes noc při 4°C s primární protilátkou (tab. č. 3) a po ukončení inkubace byla membrána 5x po 5 minutách promývána promývacím roztokem, čímž byly odstraněny zbytky nenavázané primární protilátky. Následovala inkubace 1 hod sekundární protilátkou (tab. č. 3) konjugovanou s peroxidázou při laboratorní teplotě.

Tab. č. 3 Přehled primárních a sekundárních protilátek

Primární protilátka	Výrobce	Ředění	Sekundární protilátka	Výrobce	Ředění
Connexin 43 (vizualizace ECL)	Sigma – Aldrich, ČR	20 000x 5% mléko	Antirabbit IgG	GE – Healthcare, UK	20 000x 5% mléko
Connexin 43 (vizualizace DAB)	Sigma – Aldrich, ČR	2 000x 5% mléko	Antirabbit IgG	GE – Healthcare, UK	500x 5% mléko
E-Cadherin	BD Transduction Lab.	1 500x 2,5% mléko	Antimouse IgG	Sigma – Aldrich, ČR	4 000x 2,5% mléko
Beta-catenin	Cell Singnaling	7 000x 5% mléko	Antirabbit IgG	GE – Healthcare, UK	15 000x 5% mléko
pERK 1/2	Cell Singnaling	3 000x 5% mléko	Antirabbit IgG	GE – Healthcare, UK	6 000x 5% mléko
Beta aktin,	Sigma – Aldrich, ČR	30 000x 5% mléko	Antimouse IgG	Sigma – Aldrich, ČR	30 000x 5% mléko

Po ukončení inkubační doby byly membrány opět promyty 5x 5 min v promývacím roztoku a provedena detekce proteinů pomocí ECL kitu (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) na film (Medical X-ray Film Blue, Alfa Healthcare NV, Belgium). Connexin 43 byl vizualizován také 10 ml (4 µg/ ml) DAB (3', 3' diaminobenzidintetrahydrochlorid) reakcí s 10 µl H₂O₂.

3. 10 Real time RT-PCR

Real-time RT-PCR je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané mRNA sekvence ve vzorku. Na rozdíl od běžné PCR je při real-time PCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase. Detekce narůstajícího množství ampliconů je založena na nárůstu fluorescence.

Pro stanovení hladiny exprese genů Axin2 a PBGD byla použita metoda real-time RT-PCR. Buňky byly sterilně nasazeny do 6jamkových desek v koncentraci 100 000 buněk na ml, růst 72 hodin. Po dosažení konfluence bylo médium bylo vylito, buňky byly opláchnuty 2x 500 μ l PBS a přidáno 350 μ l lyzačního pufru, který je součástí izolačního kitu NucleoSpin[®] RNAII, Macherey-Nagel, Düren, Germany) a 3,5 μ l β -merkapt ethanolu (Sigma, ČR). Lyzát byl sklizen pomocí buněčné škrabky, přepipetován do mikrozkušavek a pro další použití zamrazen na -20°C.

Reverzní transkripce i vlastní PCR reakce proběhla jedнокrokově v téže reakční směsi. Pro detekci genu Axin2 a housekeeping genu PBGD byly použity TaqMan primery a próby (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové). Amplifikace proběhla ve 20 μ l reakční směsi. TaqMan próby byly značeny na 3' konci fluorescenčním zhasičem Black Hole 1 a na 5' konci reportérovým fluoroforem 6 – karboxyfluoresceinem (FAM). Reverzní transkripce a amplifikace byla provedena v přístroji LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) v následujícím nastavení: reverzní transkripce 20 min při 50 °C, aktivace HotStarTaq DNA polymerázy a počáteční denaturace DNA 15 min při 20 °C. Pro amplifikaci 30 – 40 cyklů: 15 s při 95°C a 60 s při 60°C. Výsledná relativní exprese genů byla vypočítána na základě komparativní metody vztahem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Reakční směs

QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix.....	10,0 μ l
QuantiTect RT Mix.....	10,2 μ l
Roztok primerů a próby.....	2,0 μ l
Vzorek.....	2,0 μ l
Voda.....	5,8 μ l

4. Výsledky

4. 1 Efekty isomerů HBCD na buněčné populace

4. 1. 1 Cytotoxicita

Cytotoxicita byla měřena v buněčné linii WB-F344 dvěma metodami: pomocí MTT a neutrální červeně (Neutral Red Uptake, NRU). Expozice byla provedena v čase 24 hodin v koncentracích 5, 10, 25, 40 μM α -HBCD a 5, 10, 25 μM β - a γ -HBCD. Výsledky byly měřeny pomocí přístroje iEMS reader MF (Labsystems) a vyhodnoceny programem Gen5 při absorbanzi 540 nm.

Výsledky obou metod dobře vzájemně korelovaly. Pro jednotlivé isomery byly stanoveny cytotoxické koncentrace (počet buněk < 90% kontroly): β -HBCD působil cytotoxicky už od 10 μM , pro γ - HBCD byla stanovena 25 μM koncentrace a 40 μM pro α -HBCD (viz tab. č. 4). Na základě výsledků měření cytotoxicity byla pro 24hodinové expozice vybrána jako nejvyšší netoxická 10 μM koncentrace.

Tab č. 4 Stanovení cytotoxicity NRU (A) a MTT – testem (B)

A

Neutral Red Uptake test			
exp.	HBCD	μM	% kontroly průměr
24 h		40	83
24 h	alfa	25	100
24 h		10	100
24 h		5	112
24 h	beta	25	42
24 h		10	72
24 h		5	90
24 h	gama	25	69
24 h		10	97
24 h		5	103

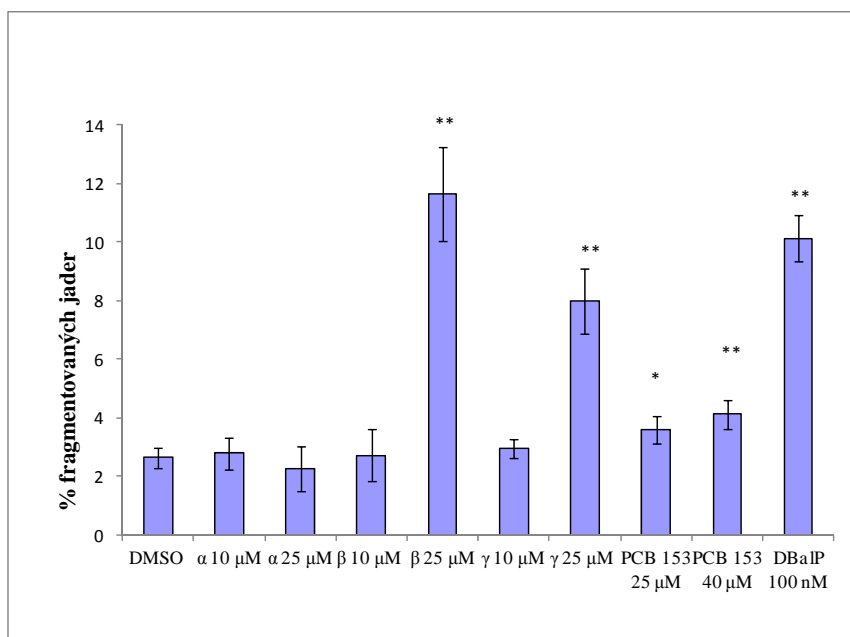
B

MTT test			
exp.	HBCD	μM	% kontroly průměr
24 h		40	86
24 h	alfa	25	96
24 h		10	94
24 h		5	98
24 h	beta	25	67
24 h		10	87
24 h		5	101
24 h	gama	25	74
24 h		10	91
24 h		5	104

4. 1. 2 Detekce apoptózy

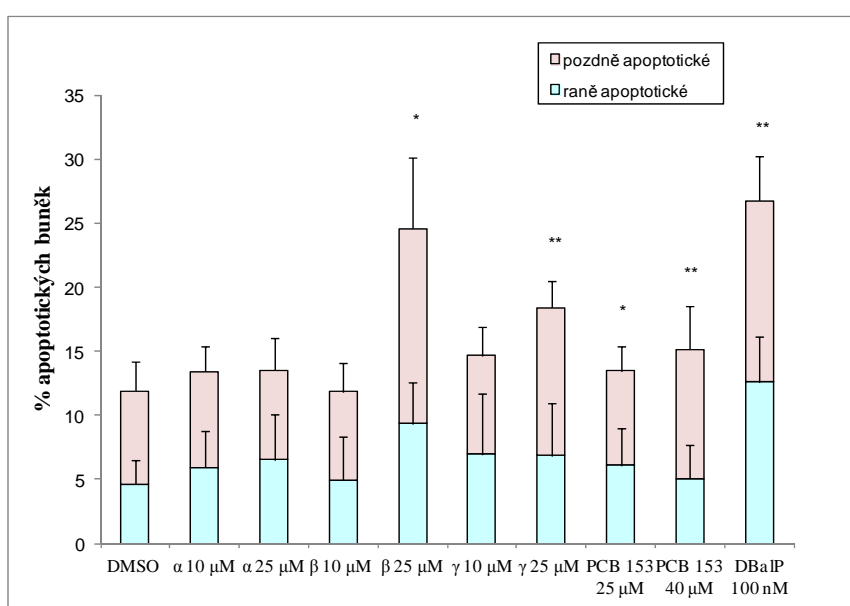
Hladina apoptózy byla stanovena v buňkách WB-F344 exponovaných jednotlivými isomery HBCD. Byly použity 10 μM a 25 μM koncentrace α -, β -, γ -HBCD a 25 μM a 40 μM PCB 153. Jako negativní kontrola bylo použito 0,25% DMSO (dimetylsulfoxid), jako pozitivní kontrola 100 nM dibenzo[a,l]pyren (DBaIP). Expozice byly provedeny po dobu 24 hod. Apoptóza byla stanovena dvěma metodami: mikroskopická detekce apoptotické fragmentace jader barvením DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol-dihydrochlorid) a detekce apoptózy fluorescenčními sondami Annexin-V-Fluos a propidium jodidem (PI) v průtokovém cytometru.

Buňky byly obarveny fluorescenčním barvivem DAPI a stanovení počtu fragmentovaných jader bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon ECLIPSE TE200. Indukce apoptózy byla zaznamenána při 25 μM koncentraci u β -HBCD a γ HBCD, přičemž β -HBCD vykazoval vyšší počet fragmentovaných jader (obr. č. 9). Mírné zvýšení počtu fragmentovaných jader bylo také zaznamenáno při 25 μM a 40 μM koncentraci PCB 153. Ostatní isomery vykazovaly pouze nízkou hladinu apoptózy.



Obr. č. 9 Detekce apoptotické fragmentace jader barvením DAPI. Experiment byl proveden v 5 opakováních (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Tato data korelují s detekcí apoptózy průtokovou cytometrií. Touto metodou byly fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos a PI detekovány raně apoptotické, pozdně apoptotické a nekrotické buňky. Fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) při emisní vlnové délce 515 nm (annexin) a 617 nm (propidium jodid). Procentuální zastoupení apoptotických a nekrotických buněk bylo hodnoceno v programu WinMDI 2.8 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). 25 μ M koncentrace β - a γ -HBCD indukovala vyšší procento pozdně apoptotických buněk, u 25 μ M β -HBCD pak také mírně vyšší, ale statisticky nevýznamný počet raně apoptotických buněk (viz obr. č. 10).



Obr. č. 10 Detekce apoptózy fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos. Experiment byl proveden v 5ti opakováních

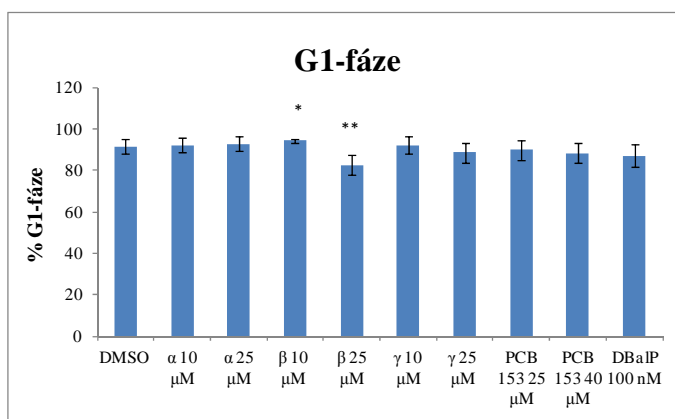
4. 1. 3 Měření fází buněčného cyklu

Buněčný cyklus byl měřen na buňkách linie WB-F344. Pro expozice byly použity 10 μ M a 25 μ M α -, β -, γ -HBCD a 25 μ M a 40 μ M PCB 153. Jako negativní kontrola bylo použito 0,25% DMSO, jako pozitivní kontrola 100 nm DBaIP. Expozice byly provedeny po dobu 24 hod. Po obarvení propidium jodidem byly na základě různého obsahu DNA rozlišeny jednotlivé fáze. Měření bylo provedeno na průtokovém

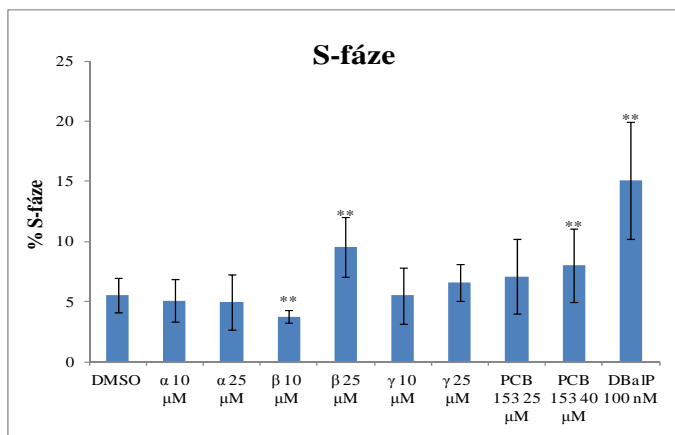
cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) při emisní vlnové délce 617 nm a naměřená data byla vyhodnocena v programu ModFit LT3.0.

Pozitivní kontrola (100 nM DBaIP) působí genotoxicky a výrazně snižoval G2/M-fázi a zvyšoval S-fázi, což vedlo k zástavě buněčného cyklu a apoptóze (viz kap. Detekce apoptózy). U 25 μM β -HBCD bylo zjištěno mírné snížení G1-fáze a výrazné zvýšení buněk v G2/M a S-fázi, oproti tomu 10 μM β -HBCD vykazuje opačnou tendenci: G1-fáze byla velmi mírně zvýšena, G2/M-fáze nebyla ovlivněna a mírné snížení bylo zaznamenáno v S-fázi. Z těchto dat, se zřetelem na výsledky zjištěné v kap. Detekce apoptózy, lze odlišné chování 10 μM a 25 μM β -HBCD vysvětlit tak, že ke zvýšení G1 a S-fáze dochází v důsledku proliferace buněk v uvolněných místech po apoptóze. Expozice 40 μM PCB 153 vykazuje rovněž zvýšenou S-fázi, avšak méně než u 25 μM β -HBCD. U ostatních isomerů nebyl vliv na buněčný cyklus zaznamenán.

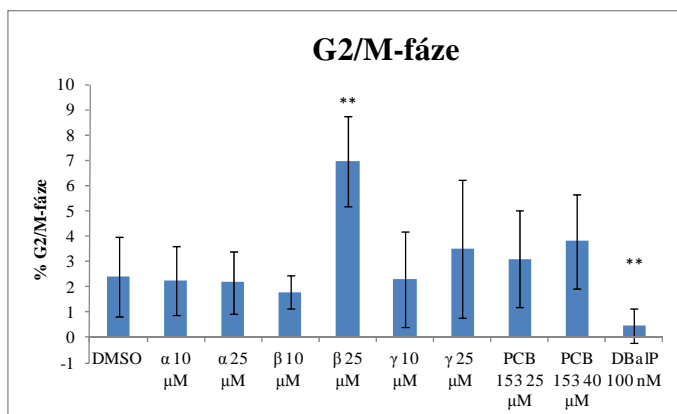
A



B



C



Obr. č. 11 Flow-cytometrické měření jednotlivých fází buněčného cyklu po expozici isomery HBCD, PCB 153 nebo DBaIP. Experiment byl proveden v 5 opakováních

4. 2 Efekty v plasmatické membráně buněk WB-F344

4. 2. 1 Inhibice GJIC HBCD

Měření GJIC se provádí metodou SL/DT (scrape loading / dye transfer). Míra inhibice mezibuněčné komunikace byla stanovena na základě měření vzdálenosti transportu fluorescenční sondy (luciferázová žluť) od místa provedení řezu v buněčné monovrstvě přes mezerové spoje v závislosti na působení sledované látky. Vzdálenost byla odečtena pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon ECLIPSE TE200 v programu LUCIA G. Naměřené hodnoty (μm) jsou procentuálně vztaženy k negativní kontrole, DMSO, na jejímž základě je vypočtena hodnota IC50 (koncentrace způsobující 50% inhibici GJIC proti negativní kontrole) a IC25 (koncentrace způsobující 25% inhibici GJIC proti negativní kontrole).

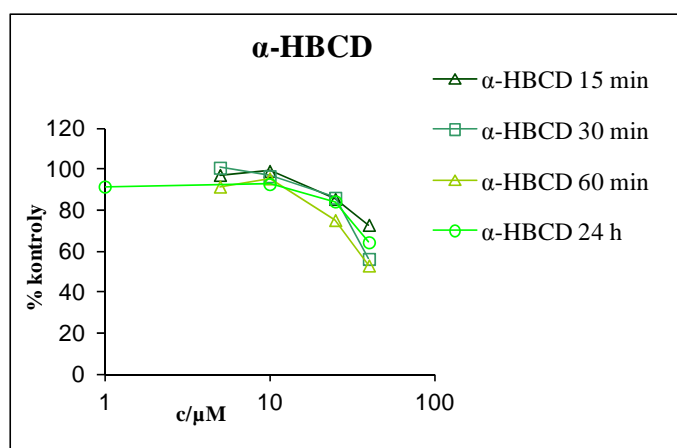
Byla použita 1, 5, 10, 25 a 40 μM koncentrace α -HBCD a 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25 a 40 μM koncentrace β - a γ -isomeru HBCD a 25 μM a 40 μM PCB 153. Jako negativní kontrola bylo použito 0,25% DMSO, jako pozitivní kontrola 100 μM Fla (fluoranthen). Expozice byly provedeny v časech 15, 30, 60 min a 24 hod. Dále byla provedena expozice 10 μM inhibitorem proteasomální degradace MG132 a 10 μM inhibitorem MAPK U0126 v časech 1 a 6 hodin.

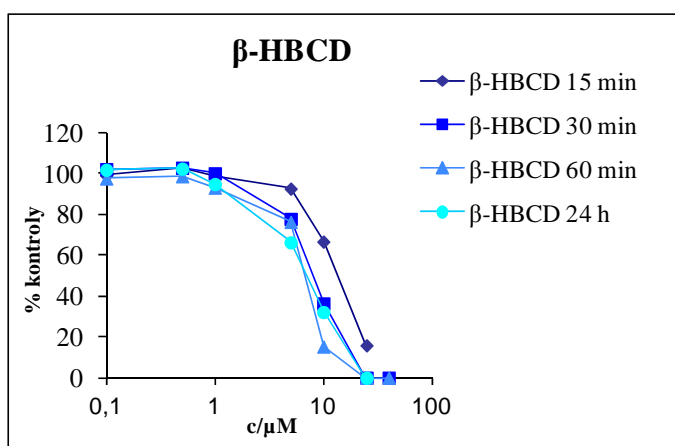
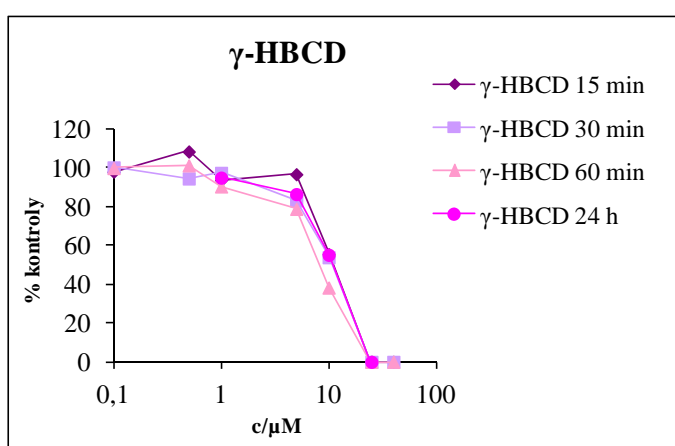
Nejsilnějším inhibitorem GJIC v buněčné linii WB-F344 byl γ -isomer; β -HBCD vykazoval velmi podobné inhibiční aktivity. Isomer α -HBCD inhiboval GJIC pouze částečně a při 40 μM koncentraci jeho inhibiční efekt nedosahoval IC50 (viz tab. č. 5). Inhibice GJIC nebyla reversibilní, trvala i po 24hodinové expozici (v případě β -HBCD už při koncentraci 10 μM a u γ -isomeru po expozici 25 μM). V tab. č. 5 jsou shrnuty hodnoty IC25, IC50 a maximální dosažená inhibice HBCD. Obr. č. 12 ukazuje koncentrační závislost inhibice GJIC isomery HBCD ve všech expozičních časech.

Tabulka č. 5 Vliv jednotlivých isomerů HBCD na inhibici mezibuněčné komunikace; počet stanovení 5

isomery	exp. čas	IC50 (μM)	IC25 (μM)	% kontroly	
				max. dosažené inhibice	koncentrace (μM)
α -HBCD	15 min	-	37	66	40
α -HBCD	30 min	-	28	61	40
α -HBCD	60 min	-	25	52	40
α -HBCD	24 hod	-	31	68	40
β -HBCD	15 min	15	8	12	25
β -HBCD	30 min	8	5	0	25
β -HBCD	60 min	7	3	0	25
β -HBCD	24 hod	7	4	36	10
γ -HBCD	15 min	13	7	0	25
γ -HBCD	30 min	12	6	0	25
γ -HBCD	60 min	11	5	0	25
γ -HBCD	24 hod	13	6	0	25

A



B**C**

Obr. č. 12 Závislost inhibice GJIC na koncentraci a délce expozice jednotlivých isomerů HBCD (% kontrolly = délka průniku (μm) luciferázové žluti u jednotlivých expozic, procentuálně vztahovaná k negativní kontrole, 0,25% DMSO)

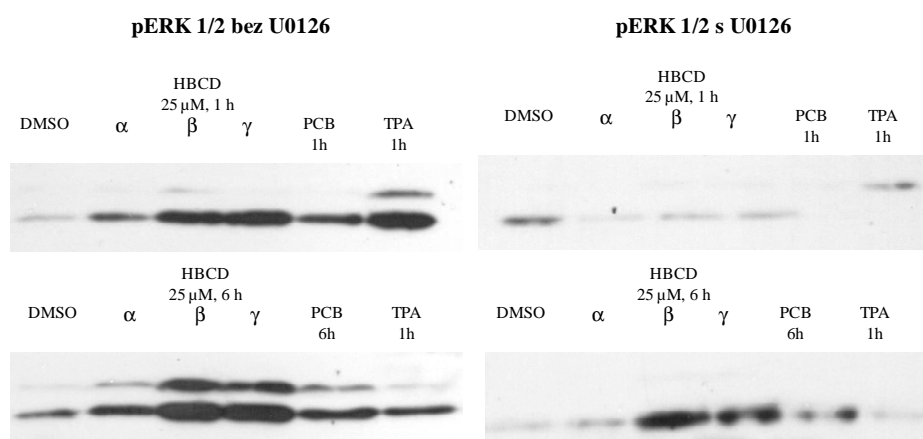
Dále byly stanoveny inhibice GJIC isomery HBCD za přítomnosti chemického inhibitoru kinázy MEK1, která fosforyluje MAP kinázovy ERK 1/2 – U0126 nebo inhibitoru proteasomální degradace – MG132. Cílem experimentu bylo ukázat, jestli aktivace ERK 1/2 nebo proteasomální degradace nejsou zapojeny do mechanismu inhibice GJIC po expozici isomery HBCD. Inhibitor U0126 neměl významný vliv na inhibiční potenci HBCD isomerů (tab. č. 6). Naopak 20 nM TPA-indukovaná inhibice GJIC byla po předchozí expozici 10 μM U0126 snížena, což potvrzuje, že inhibice GJIC navozená TPA je způsobená aktivací PKC a MAPK. Jako kontrola inhibičního efektu U0126 na ERK1/2 byl proveden Western blot, kde byla inhibice ERK1/2 po 1 a po 6 hodinové expozici 10 μM U0126 potvrzena (viz obr. č. 13). Výsledky zároveň ukazují,

že nejen TPA a PCB 153, ale také isomery HBCD aktivují ERK 1/2 dráhu, aktivace ERK 1/2 však není zapojena do mechanismu inhibice GJIC po expozici HBCD.

Tab. č. 6 Vliv koexpozice chemického inhibitoru MAPK-ERK 1/2 dráhy a isomerů HBCD na GJIC; expozice 1 h (A) a 6 h (B); průměr ze 3 nezávislých experimentů.

expoze 1 hodina		
	% kontroly	
	bez U0126	10 μ M U0126
DMSO	100	103
α -HBCD 25 μ M	104	88
β -HBCD 25 μ M	0	0
γ -HBCD 25 μ M	0	0
TPA 20 nM	0	54

expoze 6 hodin		
	% kontroly	
	bez U0126	10 μ M U0126
DMSO	100	92
α -HBCD 25 μ M	48	54
β -HBCD 25 μ M	0	0
γ -HBCD 25 μ M	0	0



Obr. č. 13 Stanovení ERK1/2 po 1 a 6 hodinové expozici 10 μ M U0126

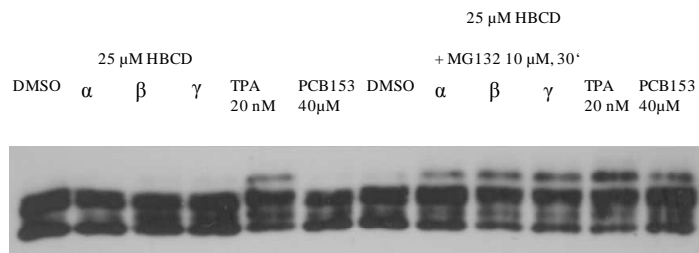
Expozice 10 μ M MG 132 snižovala mezibuněčnou komunikaci u kontroly (DMSO) a u 25 μ M α -HBCD po 1 i 6 hodinách (viz tab. č. 7 a 8). Zablokování proteasomální degradace tedy vede k zesílené inhibici GJIC.

Tab. č. 7 Vliv inhibitoru MG 132 na GJIC po 1 hodinové expozici. Chemický inhibitor proteasomální degradace, MG132, v koncentraci 10 μ M slabě snižoval mezibuněčnou komunikaci, nicméně blokování proteasomální degradace neovlivňoval.

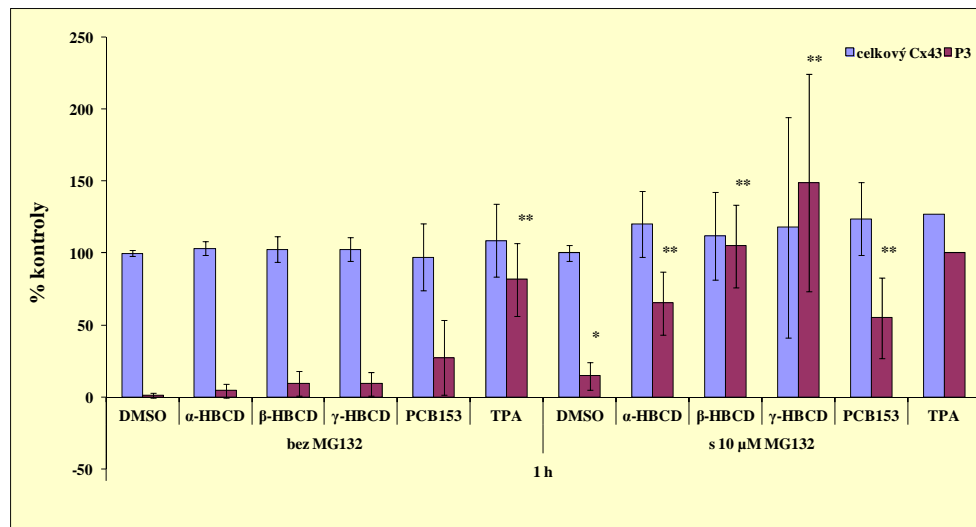
expozice 1 hodina		
	% kontroly	
	bez MG132	10 μM MG132
DMSO	100	91
α-HBCD 25 μM	89	27
β-HBCD 25 μM	0	0
γ-HBCD 25 μM	0	0
PCB153 40 μM	0	0

Stanovení hladin různě fosforylovaných forem Cx43 bylo provedeno separací v PAGE a detekováno pomocí Western blottingu. Expozice MG132, která blokuje proteasomální degradaci proteinů, vizualizovala hyperfosforylovanou formu Cx43 (obr. č. 14, 15).

A



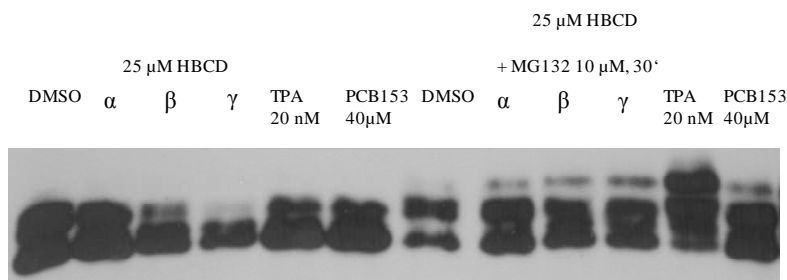
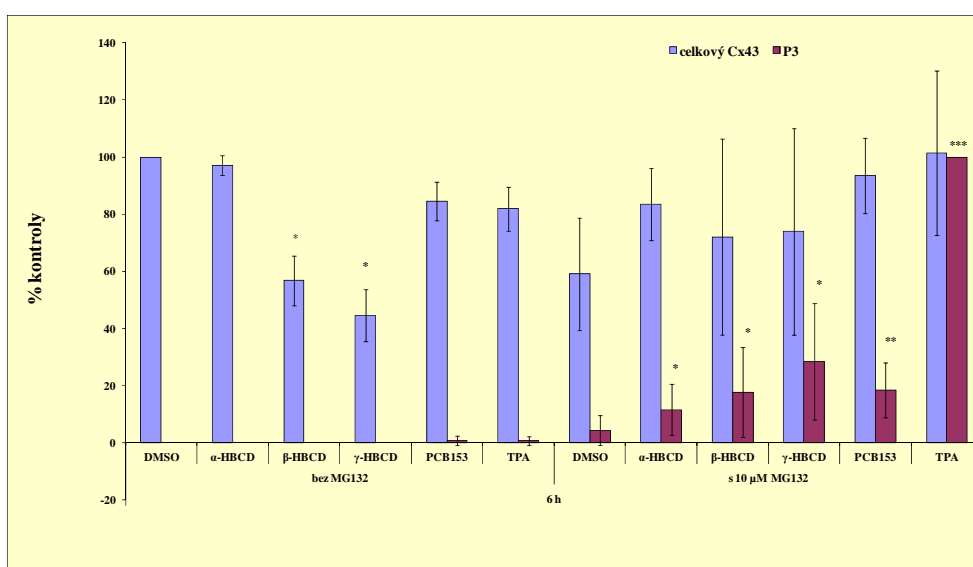
B



Obr. č. 14 Hyperfosforylovaná forma Cx43 pozorovatelná aktivací ERK 1/2 (A). ERK 1/2 jsou zapojeny do procesu proteasomální degradace. B: densitogram Western blotu (5 opakování)

Tab. č. 8 Vliv inhibitoru MG 132 na GJIC po 6 hodinové expozici. Po delším expozičním čase MG132 dochází k zesílení inhibice GJIC

expozice 6 hodin		
	% kontroly	
	bez MG132	10 μ M MG132
DMSO	100	72
α -HBCD 25 μ M	66	0
β -HBCD 25 μ M	0	0
γ -HBCD 25 μ M	0	0
PCB153 40 μ M	0	0

A**B**

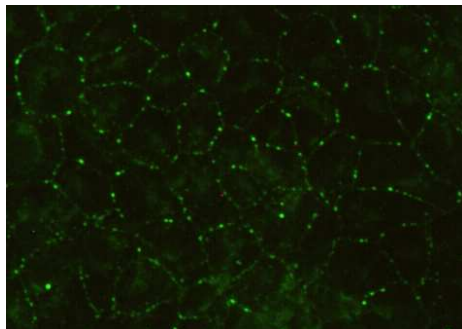
Obr. č. 15 Aktivace ERK 1/2 inhibicí proteasomální degradace vede k hyperfosforylaci Cx43. Delší expoziční doba MG132 koreluje s nárůstem hladiny hyperfosforylované formy Cx43 (A). B: densitogram Western blotu (5 opakování)

4. 2. 3 Imunocytochemická lokalizace Cx43

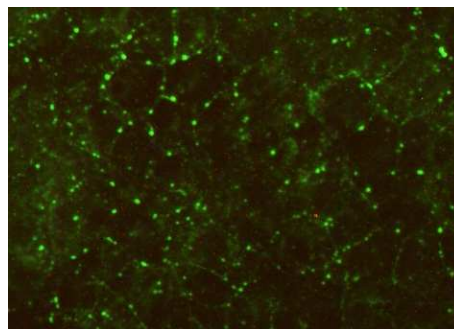
Pomocí této metody bylo v buňkách WB-F344 sledováno, jak změna lokalizace konexinu 43 koresponduje se změnou fosforylace tohoto proteinu po jednotlivých expozičních. Buňky byly exponovány 25 μ M α -, β -, a γ -HBCD v čase 1 hodina a 24 hodin. Pro srovnání byly použity buňky exponované negativní kontrolou, DMSO. Jako pozitivní kontrola bylo použito 20 nM TPA v čase 1 hodina a 40 μ M PCB 153 v čase 1 hodina a 24 hodin. Vyhodnocení bylo provedeno na fluorescenční mikroskopu Nikon ECLIPSE TE200 v programu LUCIA G.

Byla zjištěna změna lokalizace Cx43 u 25 μ M β - a γ -HBCD a 40 μ M PCB 153 po 24 hodinách (viz obr. č. 16), což koresponduje se změnou fosforylace tohoto proteinu (viz obr. 14) a sníženou GJIC.

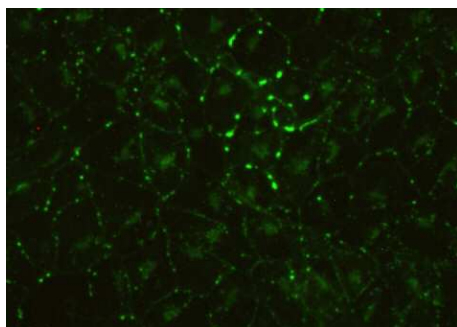
DMSO 1 hod



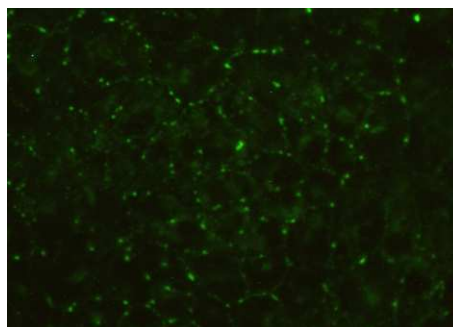
DMSO 24 hod



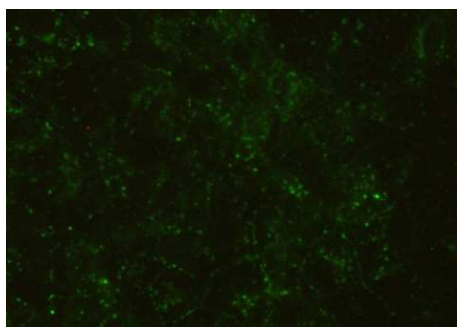
25 μ M α -HBCD 1 hod



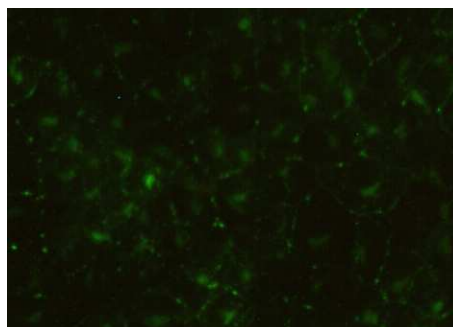
25 μ M α -HBCD 24 hod



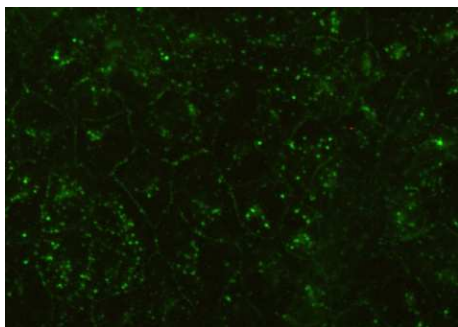
25 μ M β -HBCD 1 hod



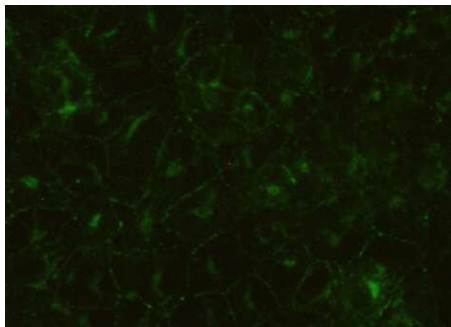
25 μ M β -HBCD 24 hod



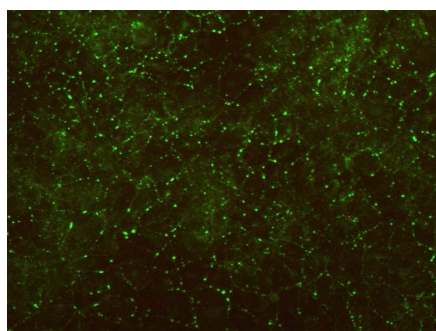
25 μM γ -HBCD 1 hod



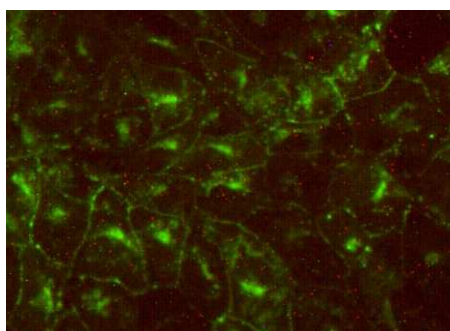
25 μM γ -HBCD 24 hod



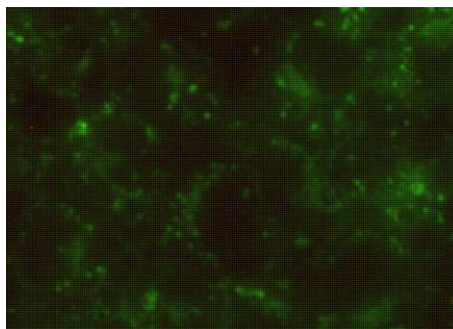
40 μM PCB 153 1 hod



40 μM PCB 153 24 hod



20 nM TPA 1 hod



Obr. č. 16 Internalizace Cx43 byla pozorována po 24 hodinové expozici 25 μM β - γ -HBCD a 40 μM PCB 153

4. 2. 4 Hladiny membránově-vázaných proteinů GJ a AJ

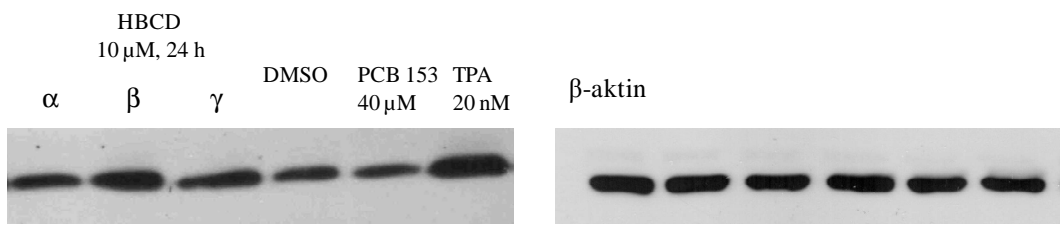
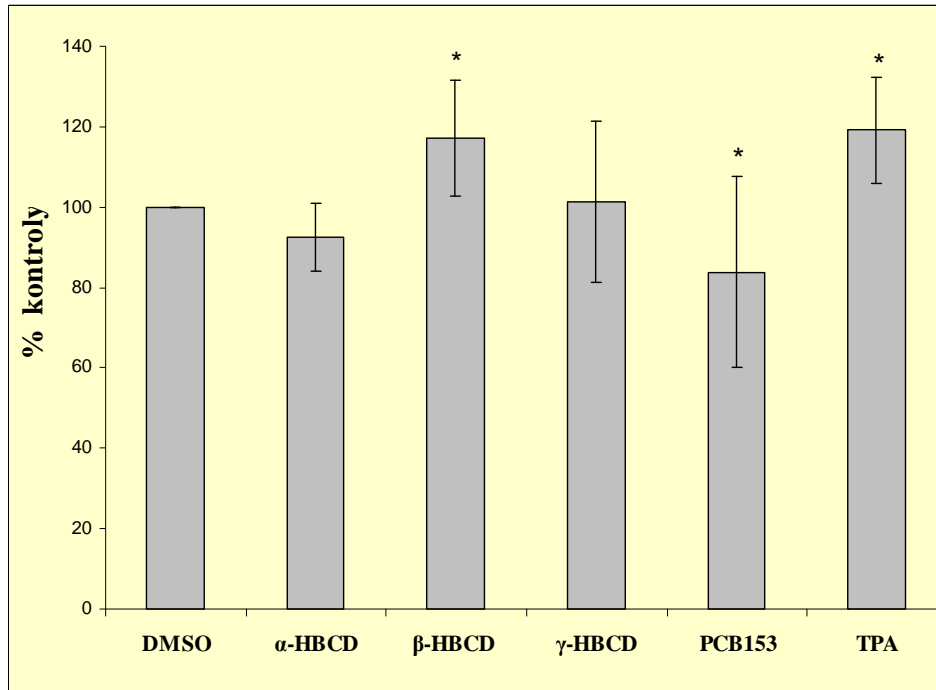
V lyzátech buněk WB-F344 byly stanoveny hladiny proteinů konexinu 43, β -kateninu, E-kadherinu a pERK 1/2 po expozici 10 a 25 μM α -, β - a γ -HBCD v čase 1 hodina a 10 μM α -, β - a γ -HBCD v čase 24 hodin. Jako pozitivní kontrola pro pokles fosforylace Cx43 a celkových hladin adherentních proteinů byl použit 40 μM PCB 153 v čase 24 hodin a jako kontrola pro hyperfosforylaci Cx43 20 nM TPA v čase 1 hodina. K příslušným expozičním časům byly použity buňky exponované negativní kontrolou, DMSO. Jako kontrola stejného množství proteinů byl u všech vzorků stanoven β -aktin. Reprezentativní výsledky jsou uvedeny na následujících obrázcích (obr. č. 17 – 21).

Po expozici 20 nM TPA a 10 μM β -HBCD byla hladina E-kadherinu mírně zvýšena, 40 μM PCB 153 naopak hladinu tohoto proteinu mírně snižuje.

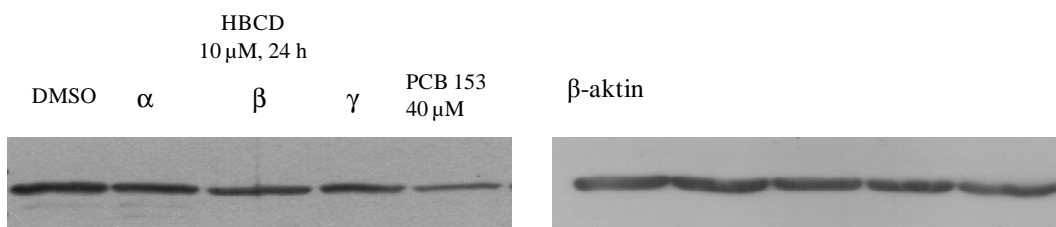
Ani jeden z isomerů HBCD neměnil hladinu β -kateninu, na rozdíl od 40 μM PCB 153, který hladinu tohoto proteinu mírně snižuje.

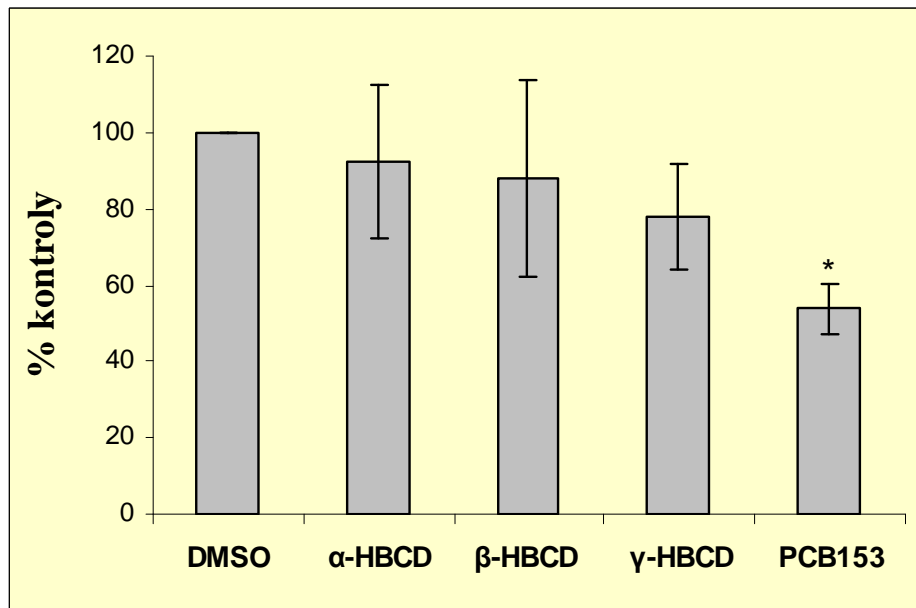
Celková hladina konexinu 43 se po 1 a 24 h expozici HBCD velmi mírně snížila pouze u 10 μM α -HBCD (24 h) a výrazněji po expozici 40 μM PCB 153 (24 h), avšak byly zaznamenány změny fosforylace Cx43. Po 1 h expozici 25 μM β - a γ -HBCD došlo k výrazné hyperfosforylaci konexinu 43, podobné hyperfosforylaci indukované 20 nM TPA, avšak po 24 h expozici 10 μM β - a γ -HBCD došlo naopak k hypofosforylaci Cx43 jako u 24 h expozice 40 μM PCB 153.

Tyto výsledky odpovídají zjištěným změnám v hladině ERK1/2, kdy po 1 h expozici 25 μM β - a γ -HBCD byla zaznamenána významně zvýšená hladina celkového ERK1/2. 25 μM α -HBCD (1 h) vykazoval rovněž vyšší hladinu ERK1/2, avšak méně než β - a γ -isomer a velmi mírně byla zvýšena hladina ERK1/2 po 1 h expozici 40 μM PCB 153. Protein ERK2 byl v buňkách exprimován ve větším množství než ERK1. Po 24 h expozici HBCD došlo k celkovému snížení ERK1/2, což koreluje se změnou fosforylace konexinu 43.

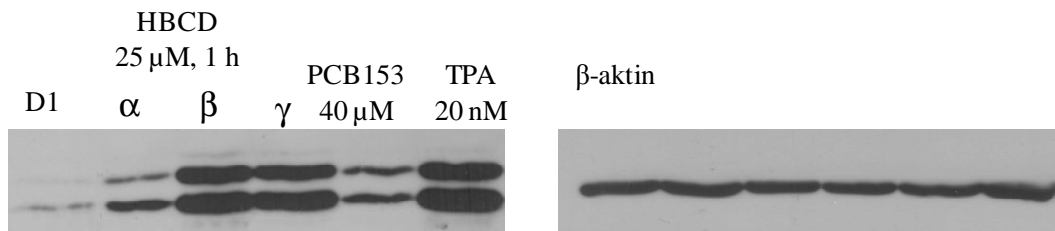
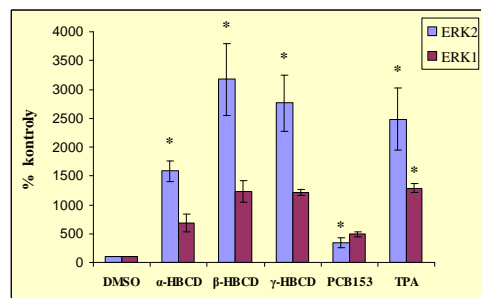
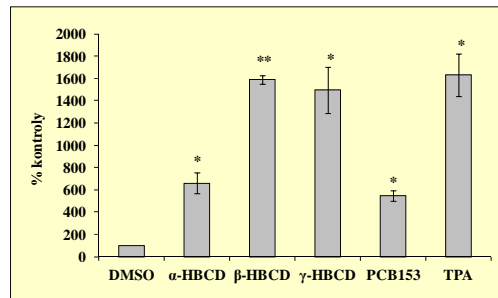
A**B**

Obr. č. 17 A: Hladina E-kadherinu po expozici 10 μM HBCD (24 h), 40 μM PCB 153 (24 h) a 20 nM TPA (1 h) B: densitogram Western blotu (3 opakování)

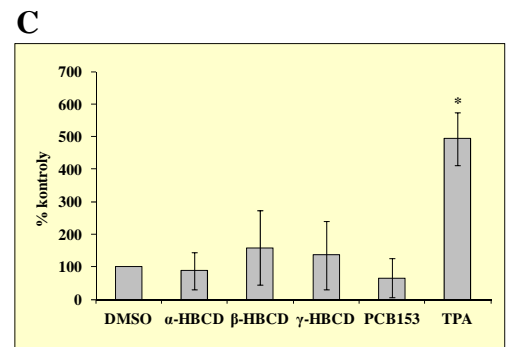
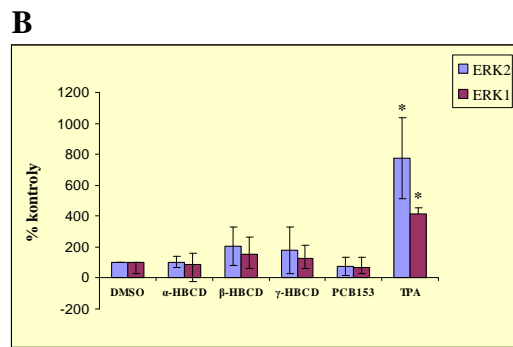
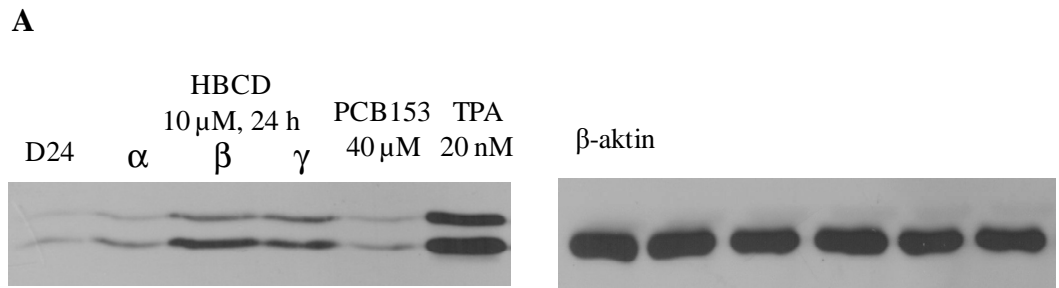
A

B

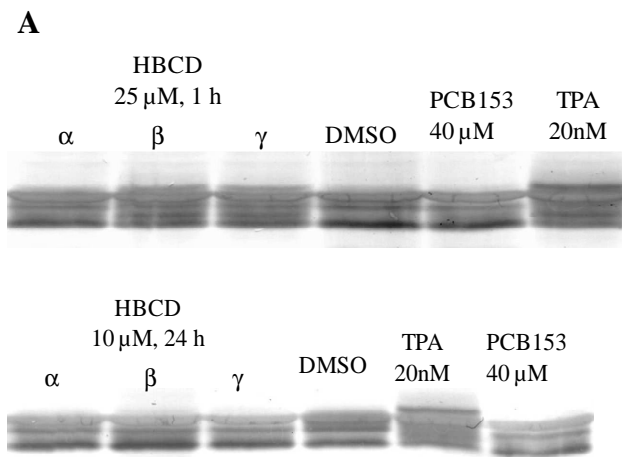
Obr. č. 18 A: Hladiny β -kateninu po 24 h expozici 10 μ M HBCD nebo 40 μ M PCB 153 B: densitogram Western blotu (3 opakování)

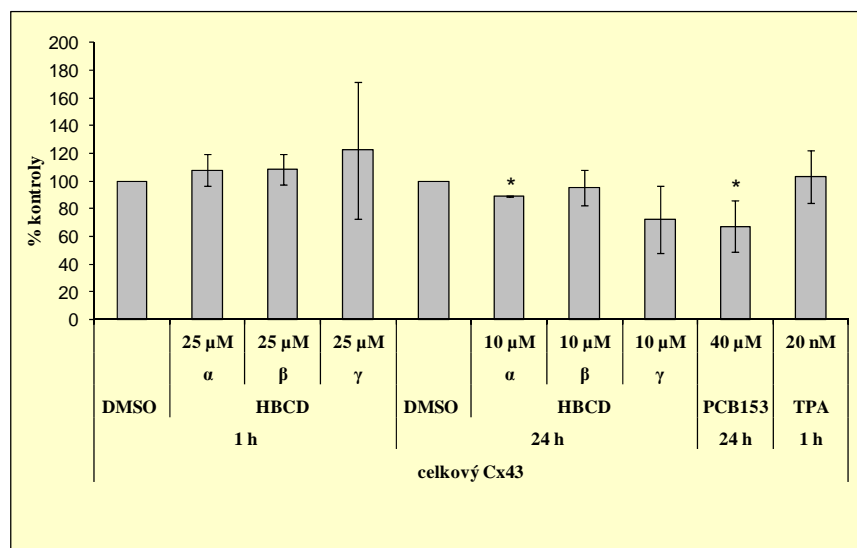
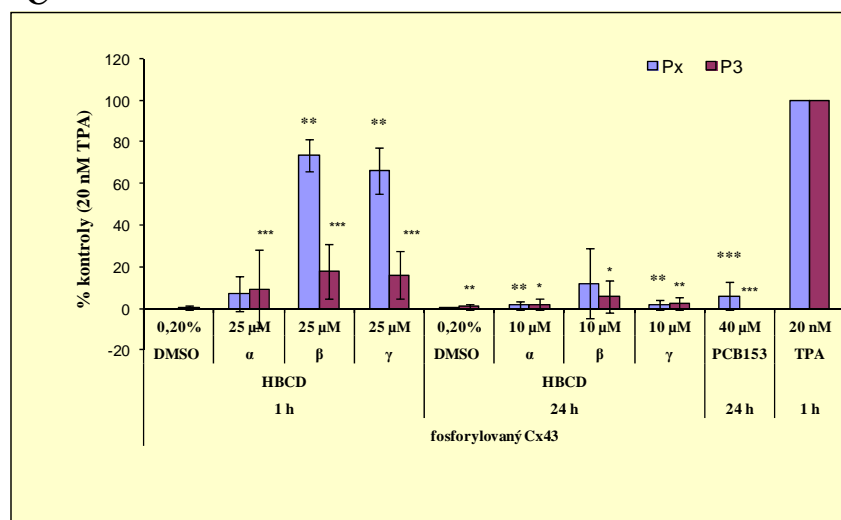
A**B****C**

Obr.č. 19 Fosforylace ERK1/2 po 1 h expozici (A, B) a celková hladina ERK1/2 (C) B,C: densitogram Western blotu (3 opakování)



Obr.č. 20 Fosforylace ERK1/2 po 24 h expozici (A,B) a celková hladina ERK 1/2 (C). B, C: densitogram Western blotu (3 opakování)



B**C**

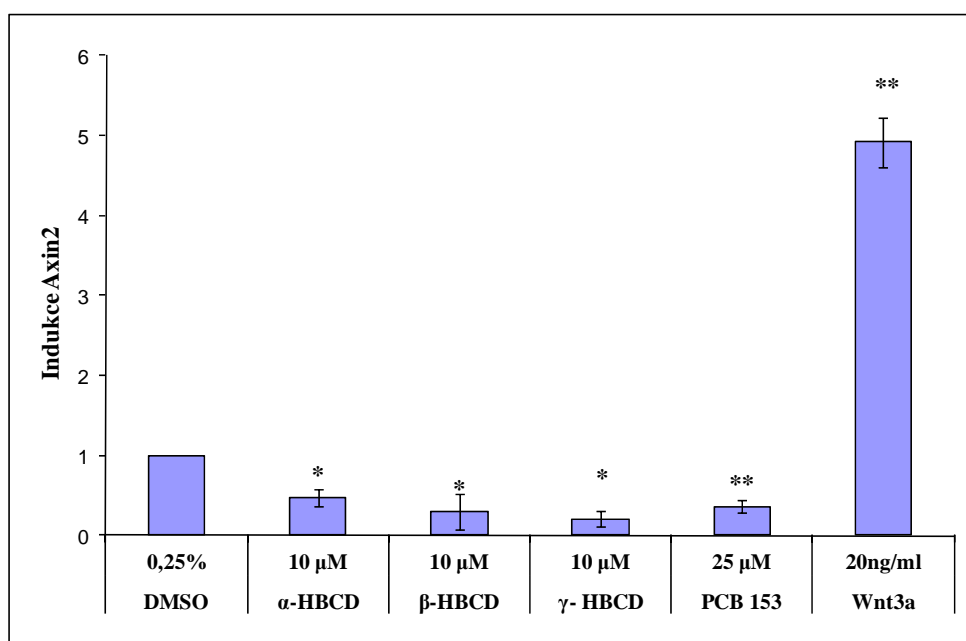
Obr.č. 21 Fosforylace ERK1/2 po 24 h expozici (A,B) a celková hladina ERK 1/2 (C). B, C: densitogram Western blotu (3 opakování)

4. 2. 5 Vliv HBCD na genovou expresi závislou na Wnt/ β -kateninové signální dráze

Hladina volného cytosolového β -kateninu reguluje Wnt signální dráhu. Ačkoliv hladina celkového β -kateninu byla po expozici HBCD nezměněna, v následujícím experimentu bylo zjištěno, zda HBCD neovlivňuje tuto signální dráhu.

Metodou real time RT-PCR byla stanovena hladina genu Axin2 v buněčné linii WB-F344. Jako referenční gen byl použit PBGD, jako pozitivní kontrola Wnt3A (20 ng/ml, 24 hod), jako negativní kontrola 0,25% DMSO. Expozice byly provedeny v čase 24 hodin 10 μ M α -, β - a γ -HBCD a 40 μ M PCB 153.

Po expozici všemi isomery lze pozorovat významný pokles hladiny genu Axin2, hladina genu byla také významně snížena po expozici 40 μ M PCB 153 (viz obr. č. 22). Tyto výsledky dokazují, že isomery HBCD suprimují Wnt/ β -kateninovou signální dráhu a genovou expresi.



Obr. č. 22 Detekce hladiny genu Axin2 metodou real time RT-PCR

5. Diskuze

HBCD představuje jeden z významných nových organických kontaminantů životního prostředí. Toxické efekty jsou intenzívně studovány teprve v posledních 10 letech a naše znalosti o mechanismech působení jsou neúplné. HBCD je přítomen v prostředí a organismech vždy jako směs isomerů; většina toxikologických studií byla provedena s použitím technických směsí HBCD. Dosud bylo provedeno pouze několik studií pro zjištění mechanismu toxicity HBCD na úrovni isomerů.

HBCD isomery jsou relativně málo toxické v experimentálních modelech *in vivo* a předpokládá se, že mají negenotoxické vlastnosti vedoucí k endokrinní disrupci, vývojové toxicitě a neurotoxicitě (viz kap. 1. 2 Toxické účinky HBCD na zdraví). Nádorově promoční vlastnosti HBCD dosud nebyly zkoumány. Cílem diplomové práce bylo provést pilotní studii možných toxických efektů HBCD. Bylo užito systému *in vitro* měření vybraných markerů, které byly prokázány jako indikátory tumor-promočních vlastností organických látek, např. TPA nebo PCB 153. Tyto dvě látky byly také vybrány jako kontrola měřených efektů, spolu se silně genotoxickým DBaP. Pomocí vybraných metod *in vitro* byly měřeny v jaterní buněčné linii WB-F344 po expozici jednotlivými isomery HBCD změny na úrovni buněčné populace a efekty na funkce plasmatické membrány a na membránově vázané proteinové komponenty mezibuněčných spojení.

1. Efekty na buněčnou populaci

Pomocí NRU a MTT testu byla pro α -, β - a γ -HBCD zjištěna jako nejnižší netoxická 10 μ M koncentrace, přičemž α -HBCD oproti β - a γ -isomeru vykazoval výrazně menší cytotoxický efekt. Zjištěný významnější cytotoxický efekt u β - a γ -HBCD koreluje s výsledky MTT testu v článku Zhang et al., 2008, kde byla cytotoxicita stanovena v jaterních HepG2 buňkách.

Výsledky testů cytotoxicity odpovídají naměřené hladině apoptózy; tato byla stanovena dvěmi metodami: detekcí apoptotické fragmentace jader barvením DAPI a detekcí apoptózy fluorescenční sondou Annexin-V-Fluos. Tato metodika byla použita v řadě studií o toxicitě polycyklických aromatických uhlovodíků (Švihálková-Šindlerová et al., 2007). U obou typů měření vykazoval indukci apoptózy po 24hodinové expozici při 25 μ M koncentraci β -isomer > γ -isomer, po expozici 25 μ M α -HBCD nebyla

apoptóza navozena. Jako pozitivní kontrola byly použity modelové látky 40 μM PCB 153 a genotoxický 100 nM DBaP, přičemž PCB 153 vykazoval nižší indukci apoptózy než β - a γ -HBCD. Isomery β - a γ -HBCD tedy vykazovaly nižší, ale signifikantní indukci apoptózy. Mechanismy apoptózy však dále nebyly sledovány. Lze předpokládat, že isomery HBCD v toxických koncentracích mohou v jaterních epiteliálních buňkách produkovat oxidativní stres a tím navozovat apoptózu, analogicky jako v hepatoma buňkách HepG2 (Zhang et al., 2008) a v modelech nervových buněk (Mariussen and Fonnum, 2003).

Dle výsledků testů cytotoxicity a měření hladiny apoptózy bylo očekáváno, že jednotlivé isomery budou mít také vliv na regulaci buněčného cyklu. Jako pozitivní kontrola pro toto měření byl použit 100 nM DBaP, který působí genotoxicky a zastavuje buněčný cyklus. α - a γ -HBCD nevykazovaly žádný vliv na regulaci buněčného cyklu, avšak zajímavá data byla naměřena po 24hodinové expozici 10 μM β -HBCD: G1-fáze byla velmi mírně zvýšena, G2/M-fáze nebyla ovlivněna a mírné snížení bylo zaznamenáno v S-fázi. Tyto výsledky potvrzují, že při 10 μM koncentraci β -HBCD dochází ke snížení buněčné proliferace, avšak po 24hodinové expozici 25 μM β -HBCD byla tendence opačná: došlo k mírnému snížení G1-fáze, avšak ke výraznému zvýšení G2/M a S-fáze, což ukazuje na zvýšenou proliferaci. Vzhledem k tomu, že 25 μM β -HBCD zároveň indukuje apoptózu, je pravděpodobné, že k proliferaci buněk dochází v důsledku vzniku uvolněných místech po apoptóze.

2. Efekty na plasmatickou membránu

Dále byl zjišťován vliv isomerů HBCD na mezibuněčnou komunikaci. Byly sledovány efekty na mezerové a adherentní spoje, neboť tyto jsou klíčovými pro regulaci růstu a neoplastickou transformaci buněk. Měření GJIC bylo provedenou SL/DT metodou. Nejsilnějším inhibitorem byl γ -isomer, který inhiboval GJIC již při 10 μM koncentraci, β -HBCD vykazoval velmi podobné inhibiční aktivity, avšak inhibice byla navozena až při 25 μM koncentraci. Isomer α -HBCD inhiboval GJIC pouze částečně. Inhibice mezerových spojů nebyla vratná jako u modelové látky TPA, trvala i po 24hodinové expozici stejně jako u modelové látky PCB 153 (Šimečková et al., 2009a). Mechanismus inhibice GJIC je závislý na změně konformace konexinu 43 různými post-translačními modifikacemi molekuly. Zatímco po expozici TPA dochází k hyperfosforylaci Cx43, PCB 153 tento protein naopak hypofosforyluje (Leithe, Rivedal,

2004; Šimečková et al., 2009a). Vzhledem k přetrvávající inhibici GJIC bylo předpokládáno, že HBCD mají podobný mechanismus účinku jako PCB 153, avšak měření hladiny konexinu 43 metodou Western blotting ukazuje, že jde o jiný, dosud neznámý mechanismus. Celková hladina Cx43 po 1 a 24hodinové expozici HBCD se, na rozdíl od 24hodinové expozice 40 μM PCB 153 nesnižovala. Navíc, po 1 hodinové expozici 25 μM β - a γ -HBCD byla zjištěna hyperfosforylace jako u 20 nM TPA. Po 24 hodinové expozici ale dochází k hypofosforylaci, stejně jako u 40 μM PCB 153. Tato měření korelovala s naměřenými hladinami ERK1/2. 25 μM α -, β - i γ -HBCD vykazují po 1hodinové expozici fosforylaci ERK1/2 stejně jako TPA, ale po 24 hodinové expozici již k aktivaci ERK1/2 nedochází.

Pro upřesnění dráhy indukující hyper- a následnou hypofosforylaci Cx43 byla provedena 1 a 6 hodinová expozice 10 μM inhibítorem proteasomální degradace MG132 a 10 μM inhibítorem ERK1/2, U0126. Inhibice GJIC po TPA je závislá na aktivaci PKC a ERK1/2 (Leithe, Rivedal, 2004). Dojde-li k inhibici ERK1/2, inhibice GJIC po expozici TPA je blokována a mezibuněčná komunikace opět navozena. HBCD také indukují aktivaci ERK1/2, ale expozice HBCD spolu s inhibítorem U0126 po 1 hodině však, překvapivě, vedla dalšímu snížení mezibuněčné komunikace; po 6 hodinové expozici nebyl zaznamenán žádný vliv. K hyperfosforylaci Cx43 tedy nedochází přes ERK1/2, ale jinou cestou. Aktivace MAPK ERK1/2, podobně jako po expozici PCB 153 (Šimečková et al., 2009a), může hrát roli v následné degradaci Cx43. 1 a 6hodinová expozice inhibítorem proteasomální degradace, MG132, vedla k dalšímu mírnému snížení mezibuněčné komunikace a indukcii hyperfosforylace všech isomerů HBCD i PCB 153. Zablokování proteasomální degradace tedy zviditelnilo hyperfosforylovanou formu Cx43, o které se předpokládá, že je prvním stupněm před vlastním procesem degradace.

Změna fosforylace konexinu byla také zkoumána imunocytochemicky: touto metodou bylo zjišťováno, zda po jednotlivých expozicích koresponduje změna lokalizace konexinu 43 se změnou fosforylace tohoto proteinu. Tyto změny odpovídaly již naměřeným výsledkům: u 25 μM β - a γ -HBCD a 40 μM PCB 153 po 24 hodinách byla zjištěna internalizace Cx43, což koresponduje se změnou fosforylace tohoto proteinu.

Vznik a funkce adherentních spojů je závislá na proteinech E-kadherinu a β -kateninu. Snížená hladina těchto proteinů vede k dysfunkci adherentních spojů a jejich rozpadu. Jak již bylo dříve publikováno, 40 μM PCB 153 po 24 hodinové expozici

indukuje degradaci proteinů E-kadherinu a β -kateninu (Šimečková et al., 2009b). Hladina β -kateninu po 24 hodinové expozici 10 μ M HBCD nebyla změněna, ale hladina E-kadherinu po expozici 20 nM TPA a 10 μ M β -HBCD byla mírně zvýšena. Expozice 40 μ M PCB 153 (pozitivní kontrola experimentu) naopak hladinu obou proteinů mírně snížila.

Adherentní protein β -katenin má však také další funkci – je pozitivním regulátorem Wnt signální dráhy, která je zapojena jak ve vývoji tkání, tak také v karcinogenezi (Thompson, Monga, 2007). Ačkoli po expozici HBCD isomerů nedošlo ke změně v hladině β -kateninu, na úrovni mRNA byl zjištěn významný pokles hladiny genu Axin2, což je cílový gen Wnt/ β -kateninové signální dráhy a genové exprese. Hladina tohoto genu byla také významně snížena po expozici 40 μ M PCB 153. Výsledky naznačují, že expozice HBCD vede k supresi Wnt/ β -katenin-dependentní genové exprese. Tato dráha má velký význam v řadě typů rakovin; většinou je β -katenin zmutován, tato varianta proteinu není degradována a je tak zesílena Wnt/ β -kateninová genová exprese (Thompson, Monga, 2007). V případě HBCD však opačný efekt (snížení Wnt signalizace) může vést k selektivnímu tlaku – zvýhodnění buněk s mutantní variantou β -kateninu, jak je to předpokládáno po expozici jiné persistentní látky – PCB 153 (Šimečková et al., 2009b). Existuje škála možností, jak může být Wnt dráha deregulována po expozici HBCD, např. modulováním glykogensyntázykinázy 3 β , která v normální tkáni reguluje degradaci (hladinu) β -kateninu. Hledání mechanismů vedoucích k supresi Wnt dráhy bude předmětem dalších studií.

6. Závěr

Pomocí vybraných *in vitro* metod jsme charakterizovali účinky α -, β - a γ -HBCD v potkaní jaterní buněčné linii WB-F344, které mohou souviset s cytotoxicitou a nádorovou promocí. Pro jednotlivé isomery byly stanoveny nejvyšší netoxické koncentrace a měřena hladina apoptózy v čase 24 hodin. α -HBCD oproti β - a γ -isomeru vykazoval výrazně menší cytotoxický efekt, indukce apoptózy u toho isomeru nebyla detekována. β -HBCD vykazoval nejvyšší cytotoxicitu a indukci apoptózy, srovnatelně působil γ -HBCD. Expozice α - a γ -HBCD v čase 24 hodin neprokázala vliv na buněčný cyklus, pouze při 10 μ M koncentraci β -HBCD dochází ke snížení buněčné proliferace, zároveň ale vysoká 25 μ M β -HBCD vykazuje opačnou tendenci, avšak proto, že tato koncentrace zároveň indukuje apoptózu, je pravděpodobné, že k proliferaci buněk dochází v důsledku vzniku uvolněných místech po apoptóze. Rovněž byla měřena akutní a 24hodinová inhibice GJIC. Nejsilnějším inhibítorem byl γ -isomer, srovnatelně působil β -HBCD. α -HBCD inhiboval GJIC pouze částečně. Inhibice nebyla vratná a persistovala i po 24 hodinách. Metodou Western blotting byly měřeny změny ve fosforylaci konexinu 43. Zatímco po 1hodinové expozici 25 μ M β - a γ - HBCD byl konexin 43 hyperfosforylován, stejně jako po expozici modelového nádorového promoteru 20 nM TPA, po 24 h expozici 10 μ M β - a γ - HBCD došlo naopak k jeho hypofosforylaci, podobně jako po 24 h expozici 40 μ M PCB 153. Změny ve fosforylaci Cx43 odpovídají zjištěné aktivaci ERK1/2. Dále byla měřena inhibice GJIC po koexpozici isomery HBCD a inhibítorem ERK1/2, U0126. Metodou Western blotting byla sice potvrzena aktivace ERK 1/2 dráhy, tato však není zapojena do mechanismu akutní inhibice GJIC. Rovněž bylo pomocí chemického inhibitoru proteasomální degradace, MG132, zjištěno, že zablokování proteasomální degradace vede k zesílené inhibici GJIC. Se změnou fosforylace Cx43 a sníženou GJIC po 24h expozici 25 μ M β - a γ -HBCD a 40 μ M PCB 153 koresponduje změna lokalizace tohoto proteinu, která byla zjišťována imunocytochemickým barvením.

Buněčná linie WB-F344 byla dále charakterizována na úrovni membránově vázaných proteinů adherentních spojů. Pomocí metody Western blotting byly měřeny hladiny E-kadherinu, β -kateninu. Hladina E-kadherinu po expozici 20 nM TPA a 10 μ M β -HBCD byla mírně zvýšena, 40 μ M PCB 153 naopak hladinu tohoto proteinu mírně snižuje. Ačkoli hladina celkového β -kateninu po expozici HBCD nebyla na proteinové

úrovni změněna, na úrovni mRNA byl naměřen významný pokles hladiny genu Axin2 po expozici isomery HBCD i PCB 153. Toto zjištění ukazuje, že HBCD suprimují Wnt/ β -katenin-dependentní genovou expresi, tedy jeden z důležitých pochodů vývoje tkání a nádorové promoce.

7. Literatura

Knihy

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition. Garland Science, NY, USA

Morose G. (2006) *An Overview of Alternatives to Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and Hexabromocyclododecane (HBCD)*. (2006) A Publication of the Lowell Center for Sustainable Production University of Massachusetts – Lowell, Lowell, MA, USA.
<http://www.chemicalspolicy.org/downloads/AlternativestoTBBPAandHBCD.pdf>.

Weil E. D., Levchik, S. V. (2009) *Flame Retardants for Plastics and Textiles Practical Applications*, Hanser Gardner Publications, Cincinnati, OH, USA.

Články

Battle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., de Herreros G. A. (2000) The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells *Nature Cell Biology* **2**, 84 – 89

Berthoud M. V., Minogue J. P., Laing G. J., Beyer C. E. (2004) Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovascular Research* **62**, 256 – 267

Binková B., Giguère Y., Rössner P., Dostál M., Šrám J. R. (2000) The effect of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution. *Mutation Research* **471**, 57 – 70

Bissell J. M., Radisky D. (2001) Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer* **1**, 46 – 54

Cameron J. S., Malik S., Akaike M., Lerner-Marmarosh N., Yan C., Lee D. J., Abe I. J., Yang J. (2003) Regulation of Epidermal Growth Factor-induced Connexin 43 Gap Junction Communication by Big Mitogen-activated Protein Kinase 1/ERK5 but Not ERK1/2 Kinase Activation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 18682 – 18688,

Cantón F. R., Peijnenburg M. C. A., Hoogenboom P. A. L. R., Piersma H. A., van der Ven M. T. L., van den Berg M., Heneweer M. (2008) Subacute effects of hexabromocyclododecane (HBCD) on hepatic gene expression profiles in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **231**, 267 – 272

Cavallaro U., Christofori G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* **4**, 118 – 132

Chengelis C. P., (2001) A 90-day Oral (Gavage) Toxicity Study of HBCD in Rats. Wil Research Laboratories, Ashland, OH, USA

Conacci-Sorrell M., Zhurinsky J., Ben-Ze'ev A. (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 987 – 991

Covaci A., Gerecke A. C., Law R. J., Voorspoels S., Kohler M., Heeb N. V., Leslie H., Allchin C. R., De Boer J. (2006) Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: a review. *Environ. Sci. Technol* **40**, 3679 – 3688

DeBoer J., Allchin c., Zegers B., Boon J. P., Brandsma S. A., Morris S., Kruijt A. W., van der Veen I., Hesselings J. M., Haftka J. J. H. (2002) HBCD and TBBP-A in sewage sludge, sediments and biota including interlaboratory study. Ymuiden. The Netherlands: Netherlands Institute for Fisheries Research (RIVO) BV. Report number C033/02

Edinger L. A., Thompson B. C. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 663 – 669

Eriksson P., Fischer C., Wallin M., Jakobsson E., Fredriksson A. (2006). Impaired behaviour, learning and memory in adult mice neonatally exposed to hexabromocyclododecane (HBCDD). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **21**, 317 – 322

Garret D. M. (2001) Cell cycle control and cancer. *Current Science* **81**, 515 – 521

Germer S., Piersma H. A., van der Ven L., Kamyschnikow A., Fery Y., Schmitz J. H., Schrenk D. (2006) Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. *Toxicology* **218**, 229 – 236

Halbleib J. M., Nelson W. J. (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* **20**, 3199 – 3214

Hamers T., Kamstra H. J., Sonneveld E., Murk J. A., Kester A. H. M., Andersson L. P., Legler J. Brouwer A. (2006) In Vitro Profiling of the Endocrine-Disrupting Potency of Brominated Flame Retardants. *Toxicological Sciences* **92**, 157 – 173

Hartsock A., Nelson W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 660 – 669

Haukas M., Hylland K., Berge A. J., Nygard T., Mariussen E. (2009) Spatial diastereomer patterns of hexabromocyclododecane (HBCD) in a Norwegian fjord. *Science of the Total Environment* **407**, 5907 – 5913

Heeb V. N., Schweizer B. W., Kohler M., Gerecke C. A. (2005) Structure elucidation of hexabromocyclododecanes – a class of compounds with a complex stereochemistry. *Chemosphere* **61**, 65 – 73

Heeb, N. V., Schweizer B. W., Peter Mattrel P., Haag R., Gerecke C. A., Kohler M., Schmid P., Zennegg M., Wolfensberger M. (2007) Solid-state conformations and absolute configurations of (+) and (-) α -, β -, and γ -hexabromocyclododecanes (HBCDs). *Chemosphere* **68**, 940 – 950

- Hinkson C. N.**, Whalen M. M. (2009) Hexabromocyclododecane decreases the lytic function and ATP levels of human natural killer cells. *J. Appl. Toxicol.* **29**, 656 – 661
- Israels E. D.**, Israels L. G. (2000) The Cell Cycle, Stem Cells. *The Oncologist* **5**, 510 – 513
- Johansson A. J.**, Appelqvist H., Nilsson C., Kagedal K., Roberg K., Ollinger K. (2010) Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis* **15**, 527–540
- Komiya Y.**, **Habas R.** (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68 – 75
- Leithe E.**, Rivedal E. (2004) Ubiquitination and Down-regulation of Gap Junction Protein Connexin-43 in Response to 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Treatment. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 50089 – 50096
- Lilienthal H.**, van der Ven M. T. L., Piersma H. A., Vos G. J. (2009) Effects of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on dopamine-dependent behavior and brainstem auditory evoked potentials in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicology Letters* **185**, 63 – 72
- Livak K. J.**, Schmitgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402 – 408
- Luch A.** (2002) Cell Cycle Control and Cell Division: Implications for Chemically Induced Carcinogenesis. *ChemBioChem* **3**, 506 – 516
- Machala M.**, Bláha L., Vondráček J., Trosko E. J. Scott J., Upham L. B. (2003) Inhibition of gap junctional intercellular communication by noncoplanar polychlorinated biphenyls: inhibitory potencies and screening for potential mode(s) of action. *Toxicological Sciences* **76**, 102 – 111

Malumbres M., Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* **9**, 153 – 166

Mariussen E., Fonnum F. (2003) The effect of brominatedflameretardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochemistry International* **43**, 533 – 542

Mariussen E., Fonnum F. (2006) Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: An update. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**, 253 – 289

Mese G., Richard G., White W. T. (2007) Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 2516 – 2524

Morris S., Allchin C. R., Zegers B. N., Haftka J. J. H., Boon J. P., Belpaire C., Leonards E. G. P., van Leeuwen J. P. S., de Boer J. (2004) Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Brominated Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5497 – 5504

Nagafuchi A., (2001) Molecular architecture of adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 600 – 603

Perkins G., Goodenough D., Sosinsky G. (1997) Three-Dimensional Structure of the Gap Junction Connexon. *Biophysical Journal* **72**, 533 – 544

Quasnichka H., Slater C. S., Beeching A. C., Boehm M., Sala-Newby B. G., George J. S. (2006) Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by -Catenin/T-Cell Factor Signaling Involves Modulation of Cyclin D1 and p21. *Expression Circ Res.* **99**, 1329 – 1337

Reistad T., Fonnum F., Mariussen E. (2006) Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Arch. Toxicol.* **80**, 785 – 796

Roosens L., Abdallah E. A. M., Harrad S., Neels H., Covaci A. (2009) Exposure to Hexabromocyclododecanes (HBCDs) via Dust Ingestion, but Not Diet, Correlates with Concentrations in Human Serum: Preliminary Results. *Environ Health Perspect* **117**, 1707 – 1712

Rosenkrantz H. S., Pollack N., Cunningham A. R. (2000) Exploring the relationship between the inhibition of gap junctional intercellular communication and other biological phenomena. *Carcinogenesis* **21**, 1007 – 1011

Segretain D., Falk M. M. (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta* **1662**, 3 – 21

Sellström U., Bignert A., Kierkegaard A., Häggberg L., de Wit A. C., Olsson M., Jansson B. (2003) Temporal trend studies on tetra and pentabrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in guillemot egg from the Baltic Sea. *Environ. Sci Technol.* **37**, 5496 – 5501

Sládek Z., Ryšánek D. (1999) Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *Vet. Med.* **44**, 309 – 320

Sohl G., Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* **62**, 228 – 232

Šimečková P. (a), Vondráček J., Andryšík Z., Zatloukalová J., Krčmář P., Kozubík A., Machala M. (2009) The 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl–Enhanced Degradation of Connexin 43 Involves Both Proteasomal and Lysosomal Activities. *Toxicological Sciences* **107**, 9 – 18

Šimečková P. (b), Vondráček J., Procházková J., Kozubík A., Krčmář P., Machala M. (2009) 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits β -catenin-dependent transcription in liver epithelial cells. *Toxicology* **260**, 104 – 111

Švihálková-Šindlerová L., Machala M., Pěnčíková K., Marvanová S., Neča J., Topinka J., Sevastyanova O., Kozubík A., Vondráček J. (2007), Dibenzanthracenes and benzochrysenes elicit both genotoxic and nongenotoxic events in rat liver 'stem-like' cells. *Toxicology* **232**,147 – 159

Taylor C. R., Cullen P. S., Martin J. S. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 231 – 241

Thompson D. M., Monga S. P. S. (2007) WNT/ β -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298 – 1305

US EPA. (2006) U.S. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act (TSCA) Chemical Substance Inventory. Inventory Update Rule Public Database. Office of Pollution and Prevention of Toxics: Washington, D.C., USA

van der Meer J. F., Faber J. D., Aalders G. C. M., Poot A. A. (2010) Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers Med. Sci.* **25**, 259 – 267

van der Ven M. T. L., van de Kuil T., Leonards G. E. P., Slob W., Lilienthal H., Litens S., Herlin M., Hakansson H., Cantón F. R., van den Berg M., Visser J. T., van Loverena H., Vos G. J., Piersma H. A. (2009) Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicology Letters* **185**, 51 – 62

Zhang X., Yang F., Zhang X., Xu Y., Liao T., Song S., Wang J. (2008) Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquat. Toxicol* **86**, 4 – 11

Zhang X., Yang F., Xu Ch. Liu W., Wen S., Xu Y. (2008) Cytotoxicity evaluation of three pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers on Hep G2 cell. *Toxicology in Vitro* **22**, 1520 – 1527

8. Seznam použitých zkratek

AJ	Adherent junction
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BFR	Brominated flame retardants
CBD	Catenin-binding domain
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cx43	Connexin 43
CYP450	Cytochrom P450
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindoldihydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxide
Dvl	Dishevelled
FBS	Fetal bovine serum
Fz	Frizzled
GJ	Gap junction
GJIC	Gap junction intercellular communication
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
HBCD	Hexabromocyclododecane
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase
MAP	Mitogen activated protein
MPF	Mitosis Promoting Factor
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PBDE	Polybrominated diphenyl ethers
PCB	Polychlorinated biphenyl
PKC	Protein Kinase C
TCF/LEF1	T Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
WB-F344	The diploid epithelial cell line, WB-F344, which was isolated from the liver of an adult, male Fisher-344 rat

