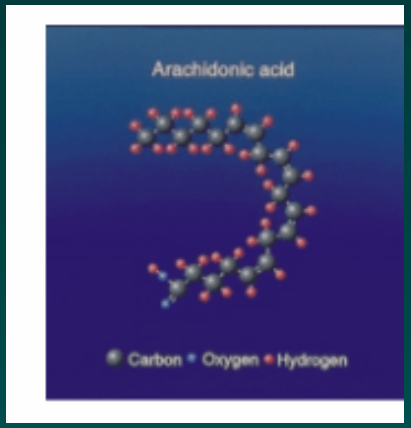
INTERAKCE LIPIDOVÝCH SLOŽEK VÝŽIVY S ENDOGENNÍMI REGULÁTORY CYTOKINETIKY VE STŘEVĚ

Laboratoř Cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

VÝŽIVA

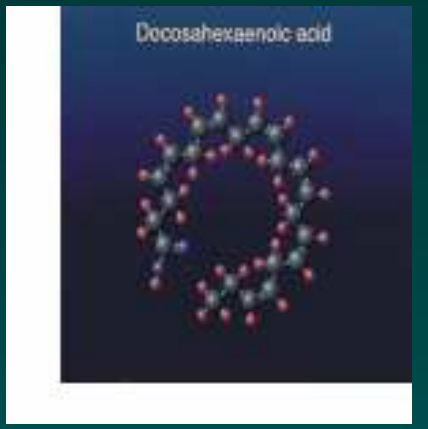
hraje roli při vzniku v aterosklerózy, nádorů a řady dalších onemocnění.
Mechanismy jsou předmětem výzkumu
Je prokázáno, že
vysoký příjem kalorií a tvorba tukových zásob je rizikovým faktorem.
Příjem, absorpce a metabolismus velkého množství potravy vyžaduje oxidativní metabolismus a produkuje více reaktivních kyslíkových radikálů, které poškozují DNA.
Ukázalo se, že příjem tuků, zejména živočišných zvyšuje riziko aterosklerózy a nádorů.
Epidemiologické studie předpokládají
pozitivní korelaci mezi příjmem tuků a nádory prsu, kolonu a prostaty.
Navzdory dlouhé historii studií tuků a nádorů, zůstává řada protikladů.
Ukazuje se, že nejen kvantita, ale i kvalita tuků hraje důležitou roli, a že se zde uplatňují i rostlinné oleje a rybí olej, zejména
vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK, PUFAs)
tříd n-3 a n-6



Zdroje tuků

živočišné a rostlinné

Mastné kyseliny



- s krátkým řetězcem – 6-12 C (SCFA)

kys. máselná,propionová

- nasycené – 12 a více C

kys. palmitová, stearová

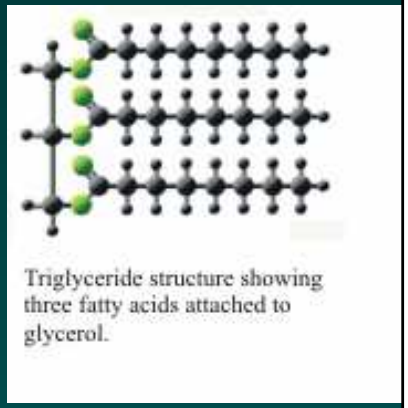
- mononenasycené – 16 a 18 C, 1 dvojná vazba

kys. palmitoolejová, olejová

- polynenasycené (PUFA) – 18 a více C, 2 a více dvojných vazeb

kys linoleová, alfa-linolenová – esenciální MK

Změny membránových fosfolipidů přímo ovlivňují **syntézu lipidových mediátorů** typu **eikosanoidů**, PAF a sekundárních přenašečů diacylglycerolu a ceramidu. Lipidové mediátory ovlivňují produkci a funkci cytokinů. To má důležitý dopad na řadu imunitních a buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciace a apoptózy


Triglyceride structure showing three fatty acids attached to glycerol.

Imbalance v lipidovém metabolismu hraje roli u mnoha závažných onemocnění

- Vysoká hladina cholesterolu je spojena s kardiovaskulárními chorobami, které jsou nejčastější příčinou úmrtí v populaci.
- Lipidy produkované buňkami imunitního systému jsou zahrnuty v zánětlivých onemocněních jako je revmatoidní artritida, sepse, astma, zánětlivé onemocnění střeva.
- Lipidy hrají úlohu také v psychických a neurodegenerativních onemocněních (deprese, schizofrenie, Alzheimerova choroba)
- Lipidy ovlivňují počátek a rozvoj nádorových onemocnění

Relativní procento různých mastných kyselin v potravě a změny způsobené průmyslovým zpracováním potravin

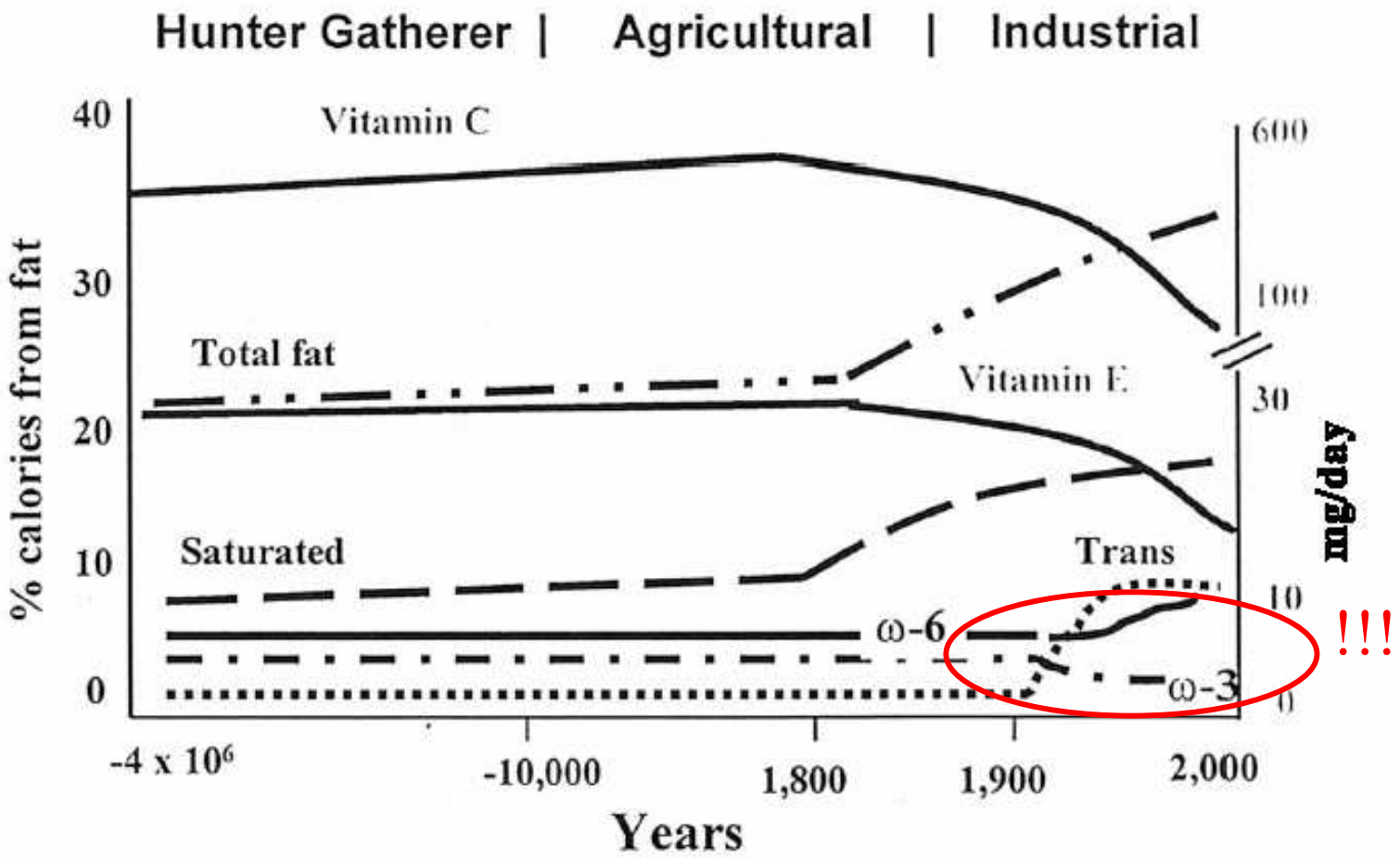


Fig. 1. Hypothetical scheme of fat, fatty acid (ω6, ω3, *trans* and total) intake (as percentage of calories from fat) and intake of vitamins E and C (mg/d). Data were extrapolated from cross-sectional analyses of contemporary hunter-gatherer populations and from longitudinal observations and their putative changes during the preceding 100 years [75].

VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY

(Polyunsaturated fatty acids - PUFAs) - mastné kyseliny s 2 i více dvojnými vazbami.

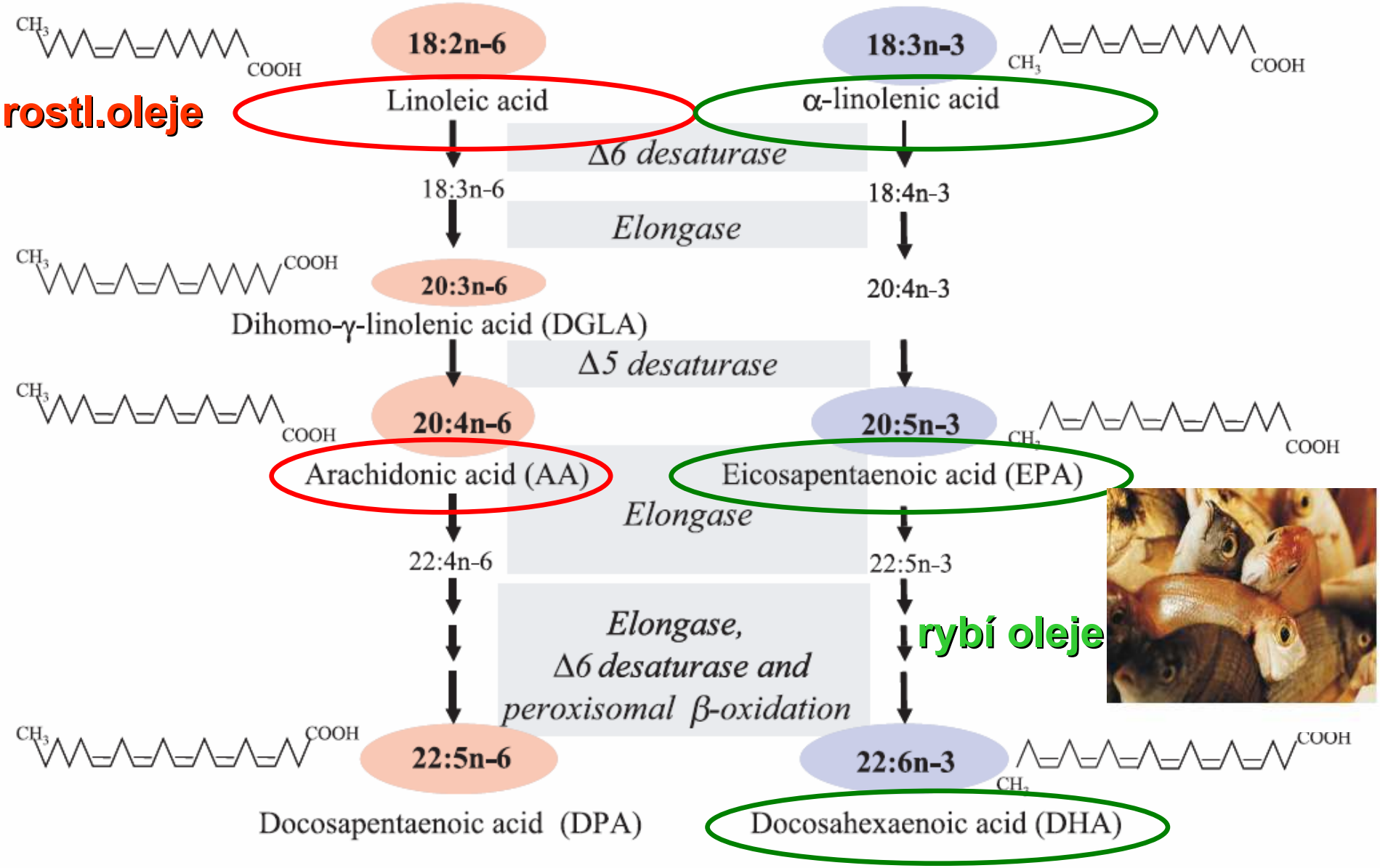
Tři hlavní skupiny PUFAs:
n-3 (omega-3), n-6 a n-9, podle polohy dvojné vazby nejbližší ke koncovému metylovanému uhlíku.
Tyto jsou metabolizovány stejným způsobem alternativními **desaturačními a elongačními enzymy.**

NOMENKLATURA:
Např. kyselina arachidonová, 20:4, n-6
20 - počet uhlíků
4 - počet konjugovaných dvojných vazeb
n-6 - poloha první dvojné vazby od metylovaného konce molekuly
Téměř všechny dvojné vazby jsou ve víceméně stabilní cis - konfiguraci.
Živočichové nedovedou syntetizovat n-3 a n-6 PUFAs de novo ani nedovedou přeměnit jednu sérii v druhou.
Tyto **ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY** musí být obsaženy v potravě podobně jako vitamíny. Jsou životně důležité jako složka všech membrán a permeabilní bariéry pokožky a jako prekursory eikosanoidů a s nimi souvisejících látek, které hrají důležitou regulační úlohu ve tkáních.

Zdrojem jsou rostlinné oleje (n-6 PUFA) a rybí olej (n-3 PUFA)

VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)

(Polyunsaturated fatty acids - PUFAs) - mastné kyseliny s 2 i více dvojnými vazbami. Esenciální prekurzorové kyseliny řady n-6 a n-3



Důležitý je poměr n-3: n-6 VNMK!!!

Kys. linolová (18:2, ω-6)
kyselina arachidonová (AA, 20:4), rostlinné oleje
zdroj eikosanoidů (prostaglandiny, leukotrieny) význam u různých nádorů.
V experimentálních systémech často podpůrný účinek pro vznik a rozvoj nádorů

Kys. alfa-linolenová (18:3, ω-3)
kys. eikosapentaenová (20:5) a dokosahexaenová (22:6)
z rybích a některých rostl. olejů (pupalka, len, rakytník)
V experimentálních systémech často inhibiční účinek pro vznik a rozvoj nádorů

LIPIDOVÉ SLOŽKY VÝŽIVY

VÍCE, NEŽLI JEN ZDROJ ENERGIE!!!!

- ◆ strukturální a regulační úloha
- ◆ dopad na fyziologické funkce organizmu
- ► účinky na imunitní systém
- ► regulace proliferace, diferenciace a apoptózy

► úloha v karcinogenezi

(etiologie nádorů tlustého střeva, prostaty, prsu)

Laboratory of Cytokinetics

Spolu s cytokiny a hormony fungují jako
intra- i intercelulární mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě

Poměr obsahu ω-6 a ω-3 esenciálních vysoce nenasycených mastných kyselin (**VNMK**) ovlivňuje
vlastnosti membrán, zejména jejich fluiditu a produkci látek vznikajících hydrolýzou membránových fosfolipidů.

Tyto změny pak ovlivňují vazbu cytokinů, aktivitu receptorů i funkci na membránu vázaných signálních molekul (G proteinů, fosfolipáz atd.).

Laboratory of Cytokinetics

Patologické změny v produkci a funkci cytokinů a eikosanoidů přispívají k rozvoji nádorových onemocnění zejména ovlivněním imunitního systému a buněčné kinetiky

Metabolismus a obrat fosfolipidů v membránách i oxidativní metabolismus nádorových buněk se zásadně liší od buněk nenádorových.

Nádorové buňky kolonu vykazují:

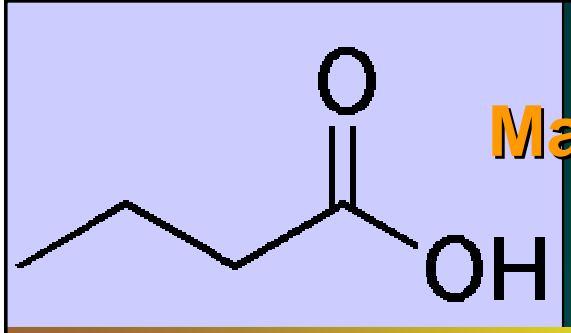
- změny ve spektru a koncentraci VNMK ve srovnání s normální tkání
- zvýšenou periferní utilizaci VNMK z potravy
- změny v oxidativním metabolismu a antioxidační ochraně
- zvýšenou aktivitu enzymů metabolismu kys. arachidonové (COX2, 12-LPO...) a produkci eikosanoidů
- sníženou citlivost k endogenním inhibitorům růstu (TGF-β1), induktorům apoptózy (TNFα, FasL, TRAIL) a diferenciace (butyrát)

Laboratory of cytokinetics

VLÁKNINA

Table 1. Possible mechanisms for the protective action of dietary fibre on colorectal oncogenesis

Physical
Increased bulk and dilution of carcinogen
Decreased contact time due to more rapid transit
Binding of carcinogen
Binding of bile salts
Prebiotic and metabolic action of flora
Alteration of colonic microflora; numbers and species balance
Inhibition of carcinogen activation
Stimulation of flora to increase bulk
Alteration of bile salt metabolism to reduce conversion to secondary bile salts
Fermentative
Lowering of pH
Reduced solubility of bile salts
Increased production of SCFAs, especially butyrate
Metabolic
Reduced insulin resistance and hyperinsulinaemia



Mastné kyseliny s krátkým řetězcem– BUTYRÁT

► produkován anaerobní mikrobiální fermentací vlákniny ve střevě

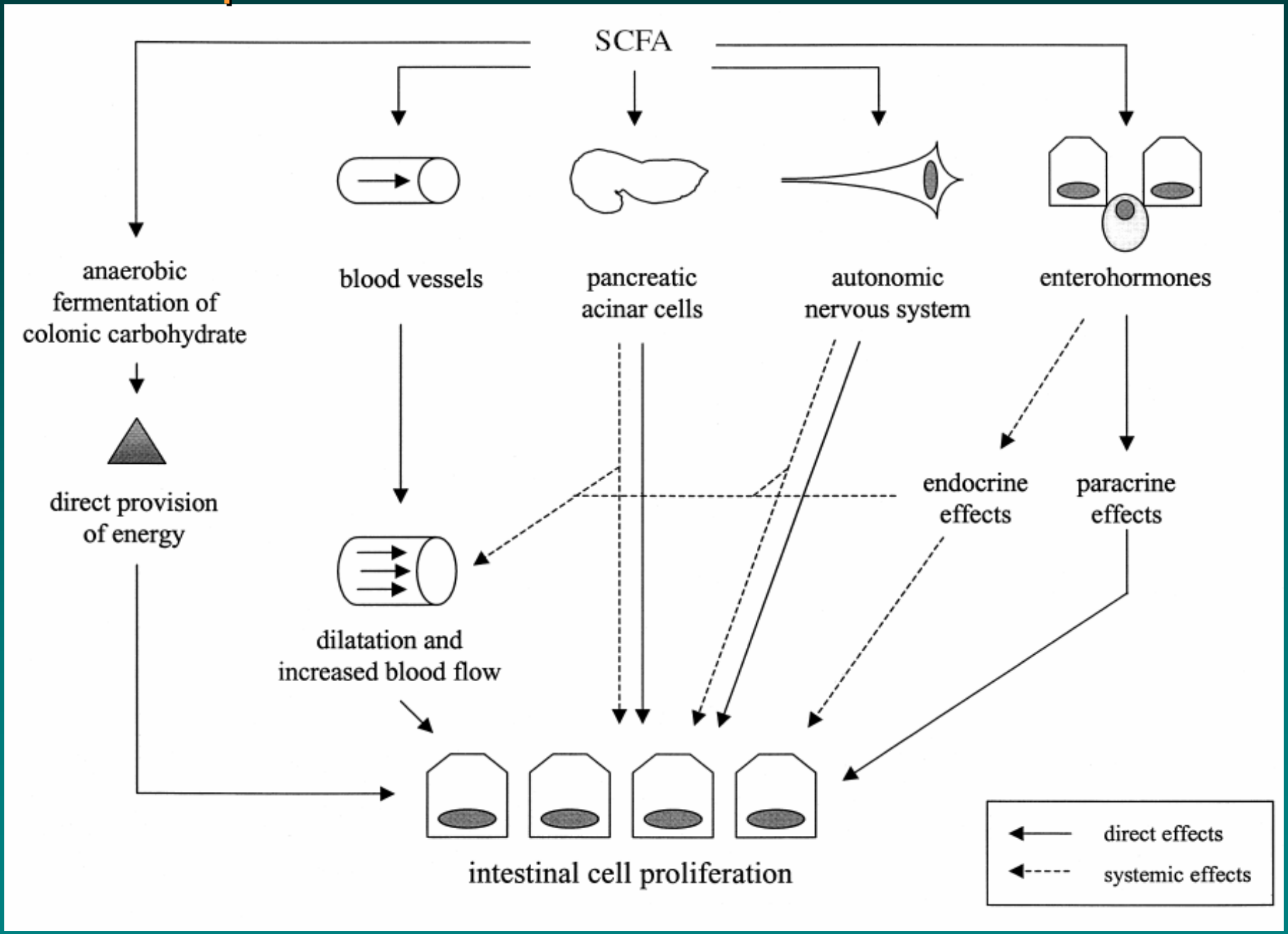
► zdroj energie pro normální kolonocyty

► významný pro udržení homeostázy ve střevní tkáni regulací exprese genů spojených s regulací proliferace, diferenciace a apoptózy (microarray analýza – změny exprese 19 400 genů), exportní protein MCT1

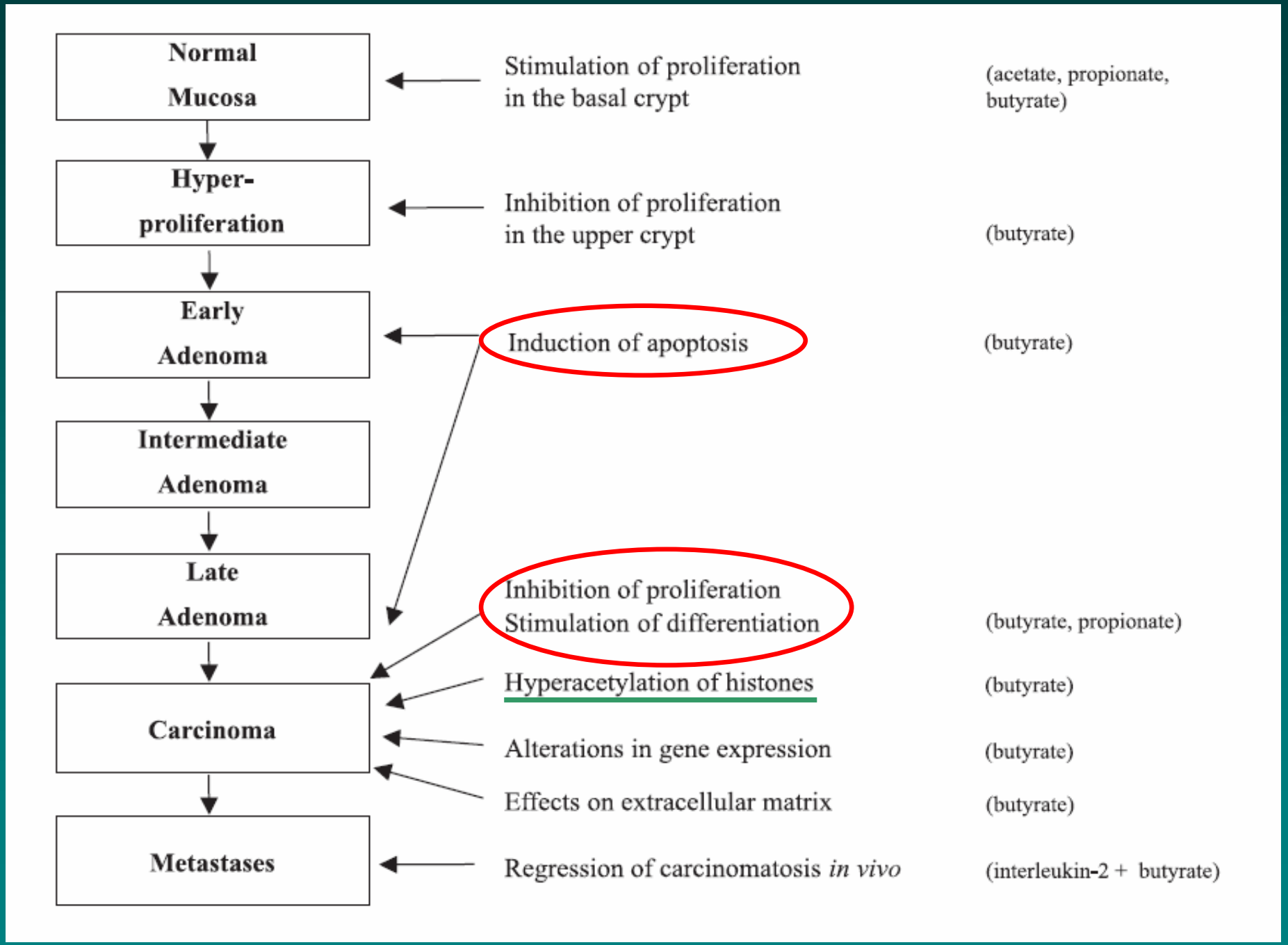
► butyrát sodný (NaBt) snižuje proliferaci a indukuje diferenciaci a apoptózu neoplastických kolonocytů *in vitro* a *in vivo*

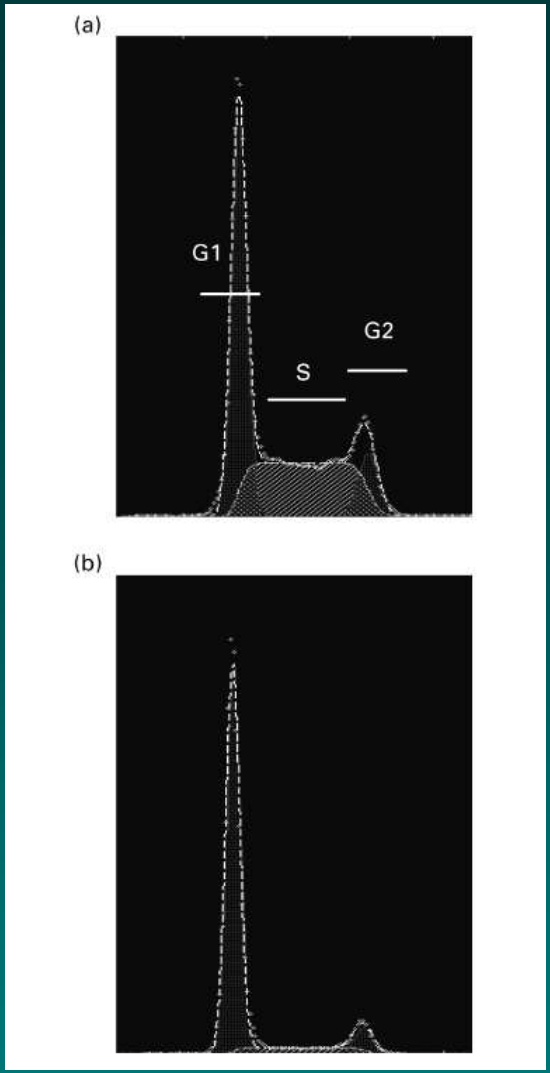
Prevence NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA

Možné mechanismy působení SCFA na proliferaci a funkci střevních buněk



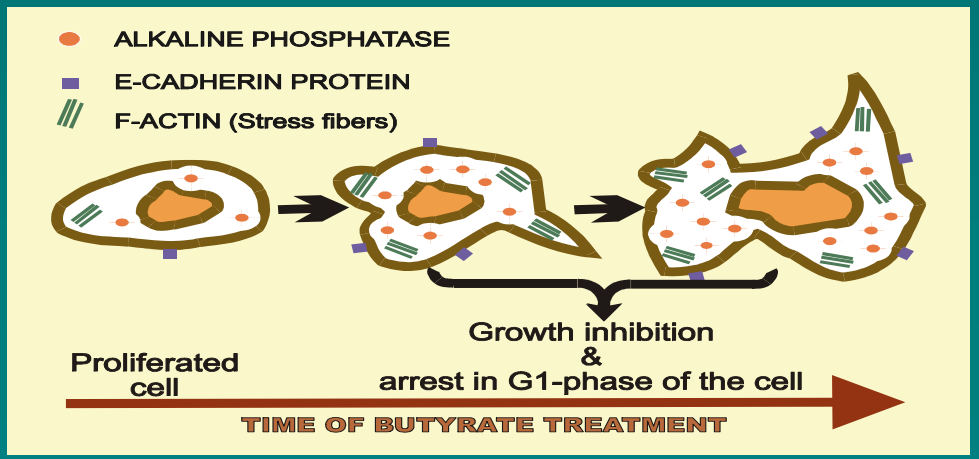
The effects of butyrate in the colon epithelial cells during adenoma-carcinoma transition





Účinky butyrátu na nádorové buňky:

Inhibice proliferace – blok v G1 nebo G2/M, indukce p21, Cyklin D1,D3, downregulace c-myc
Indukce diferenciace a apoptózy – genové arrays
Inhibitor histon deacetyláz – změny exprese genů
Ovlivnění specif. kináz, aktivace PPAR gamma, inhibice NFkB
Inhibice c-Src, FAK, iNOS, COX-2



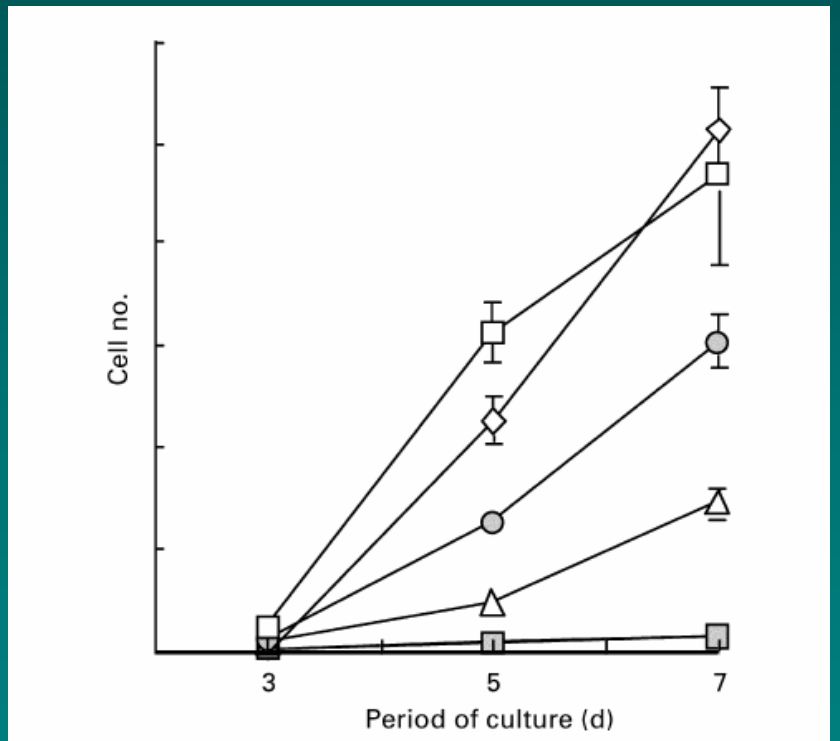


Fig. 1. Dose-dependent inhibition of rat non-tumoural intestinal epithelial cells (IEC-6) by butyrate as assessed *in vitro*. Cells were cultured without (◇; control) or with butyrate (□, 0·5 mM; ⊛, 1 mM; △, 2 mM; ▨, 5 mM) and cell number was measured after 3, 5 and 7 d.

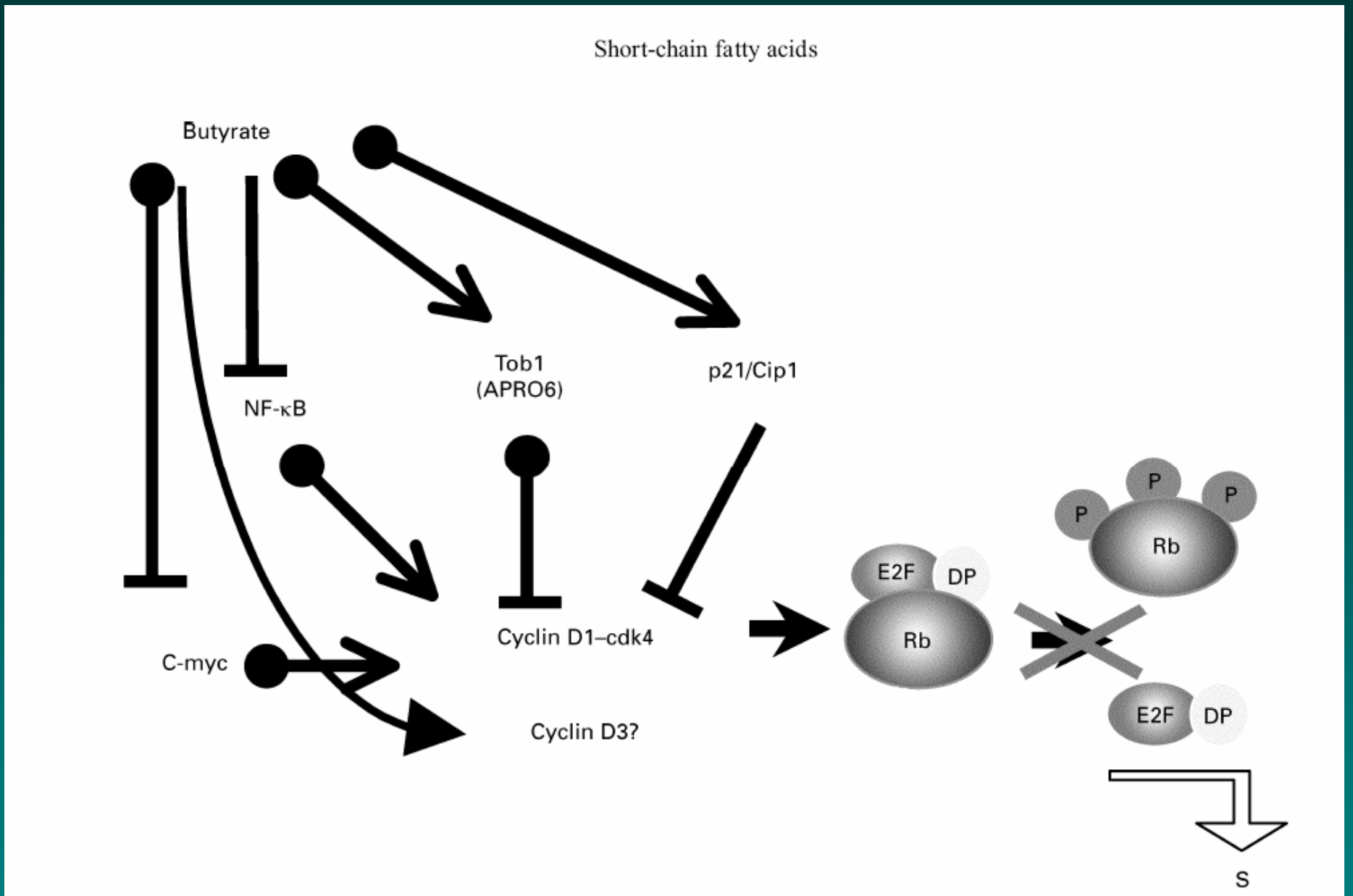


Fig. 4. Overview of the different pathways leading to inhibition of cell proliferation and the blocking of the G1 stage of the cell cycle (for details, see p. 104). NF-kB, nuclear factor kappa B; Rb, retinoblastoma protein; cdk, cyclin-dependent kinases; p21/cip1, a member of the Cip/Kip family which bind to the cyclin–cdk complex to inhibit its activity; Tob1 (APRO6), a member of the anti-proliferative family APRO, members of which control cyclin D1 transcription.

Blottiere HM et al., Proc.Nutr. Soc. 2003

NÁDORY KOLOREKTA (CRC)

Výskyt

industrializované země (životní styl, výživa)

ČR (třetí nejčastější příčina úmrtí na rakovinu)

věková distribuce (muži nárůst případů od 60 let; ženy od 70 let)

Epitel kolorekta

střevní krypty (část proliferační a diferenciační)

výměna epitelu (zrání buněk, odumírání apoptózou-anoikis (detachment-induced apoptosis)

koncentrace růstových faktorů v kryptách (v proliferační části více buněk produkujících GF)

Kolorektální karcinogeneze

porušení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací v kryptě

hyperproliferativní krypta, adenom, adenokarcinom, karcinom, metastázy

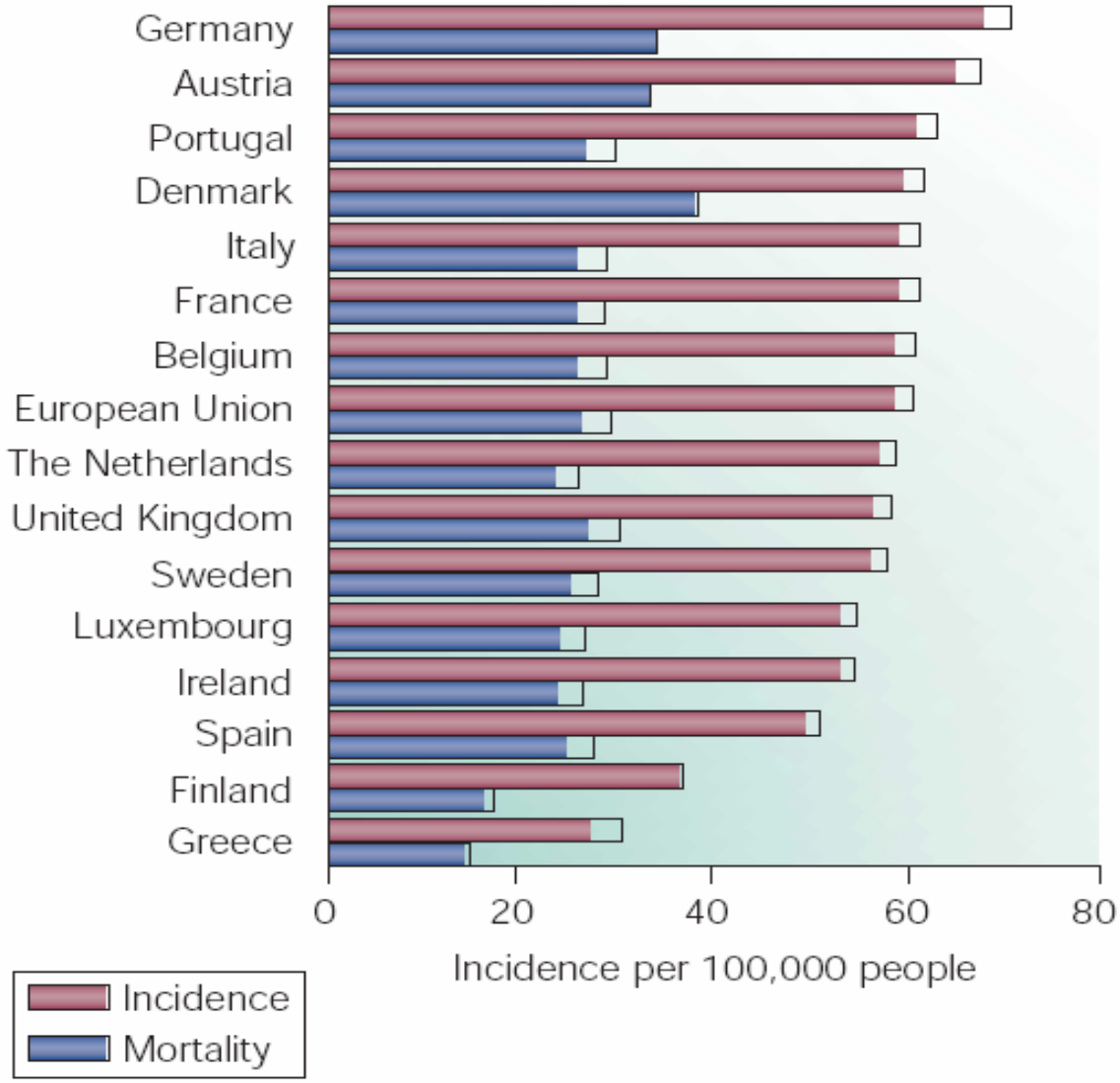
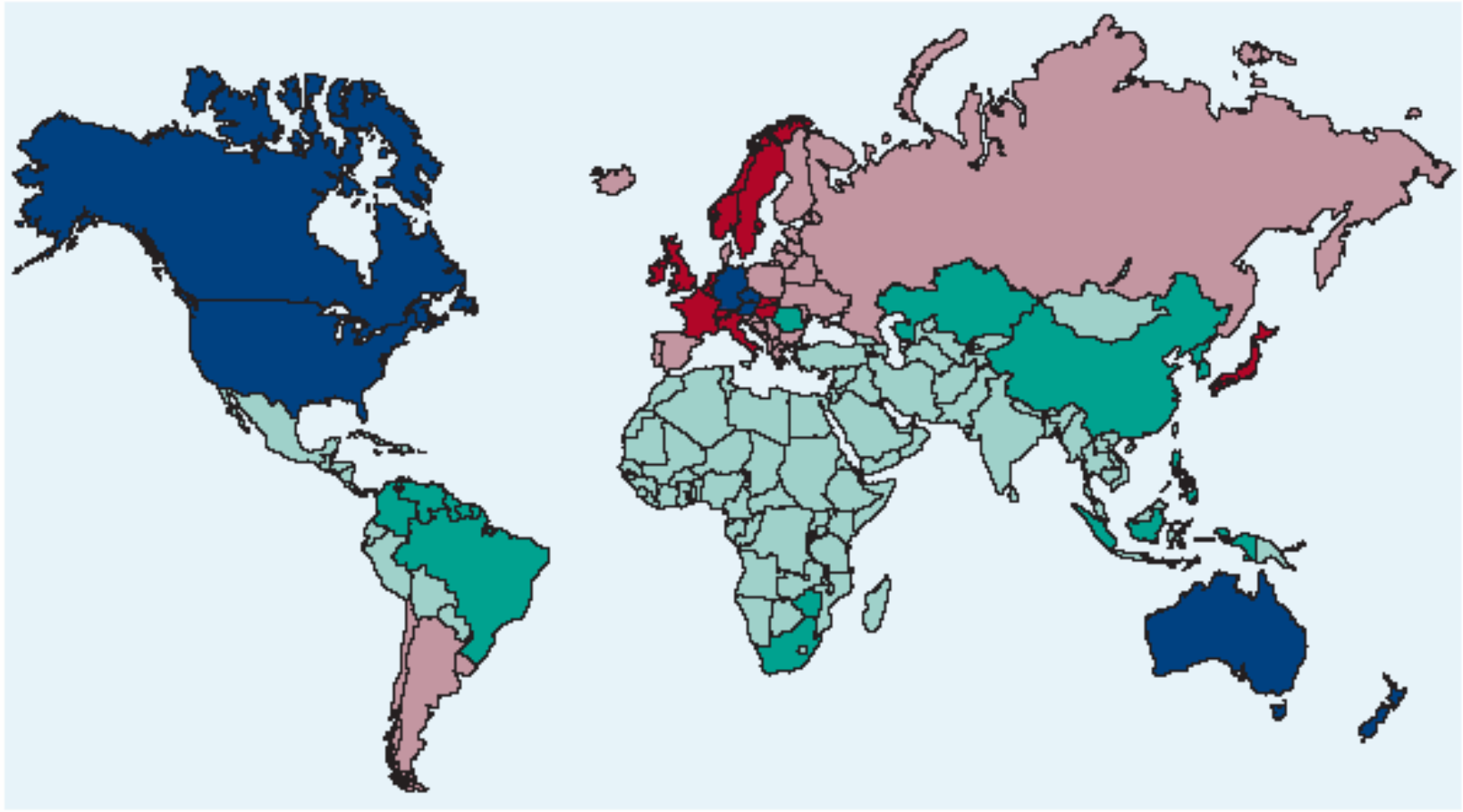
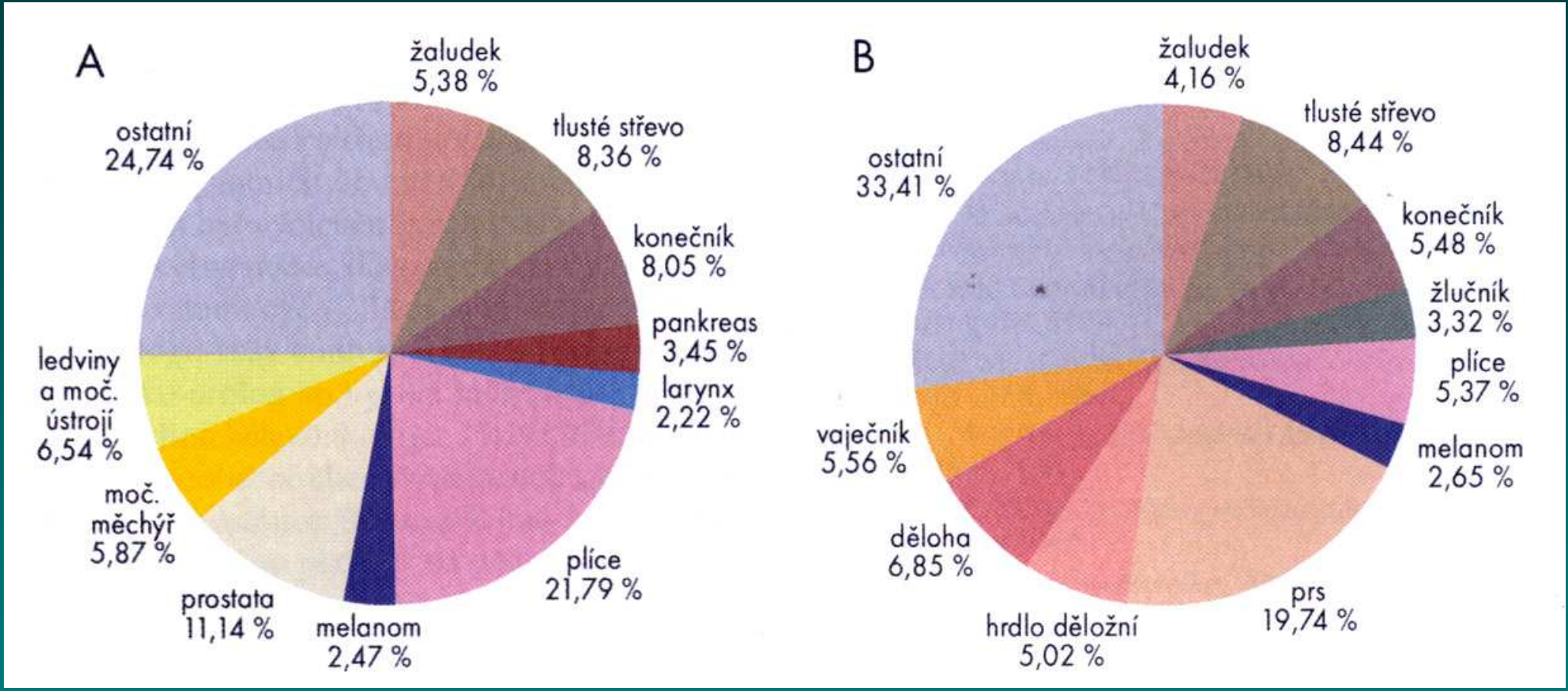


Figure 1 | **Colorectal cancer incidence in males in the European Union.** Rates of colorectal cancer by incidence, per 100,000 people, and mortality during 1996. Data were collected from Eucan — a service that provides data on the incidence and mortality of 24 key cancers in 15 member states of the European Union[2].

a Incidence rates of colorectal cancer





Struktura hlášených onemocnění novotvary bez dg. C44. A – muži; B – ženy (podle ÚZIS)

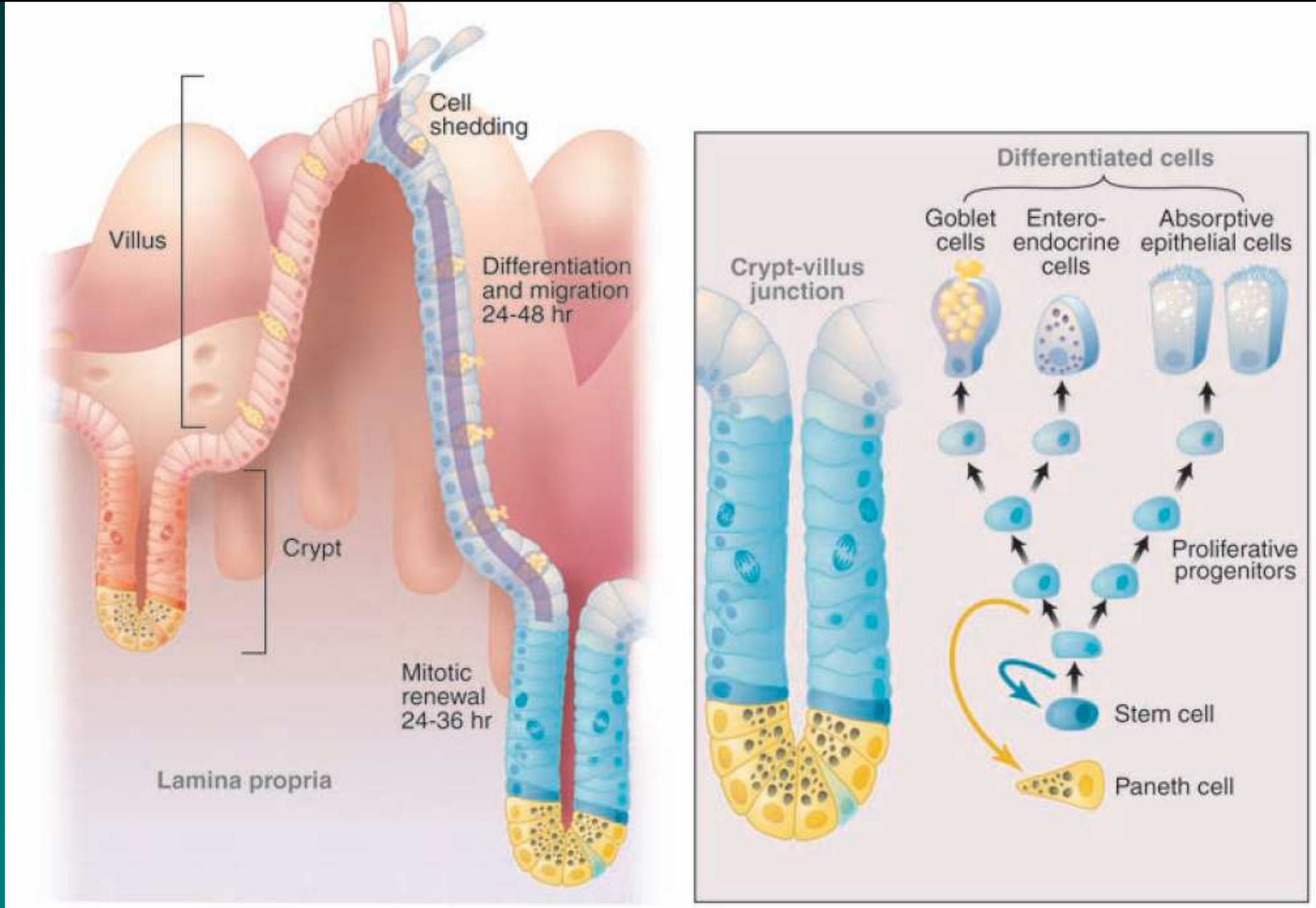


Fig. 1. The anatomy of the small intestinal epithelium. The epithelium is shaped into crypts and villi (**left**). The lineage scheme (**right**) depicts the stem cell, the transit-amplifying cells, and the two differentiated branches. The right branch constitutes the enterocyte lineage; the left is the secretory lineage. Relative positions along the crypt-villus axis correspond to the schematic graph of the crypt in the center.

Obnova střevní výstelky

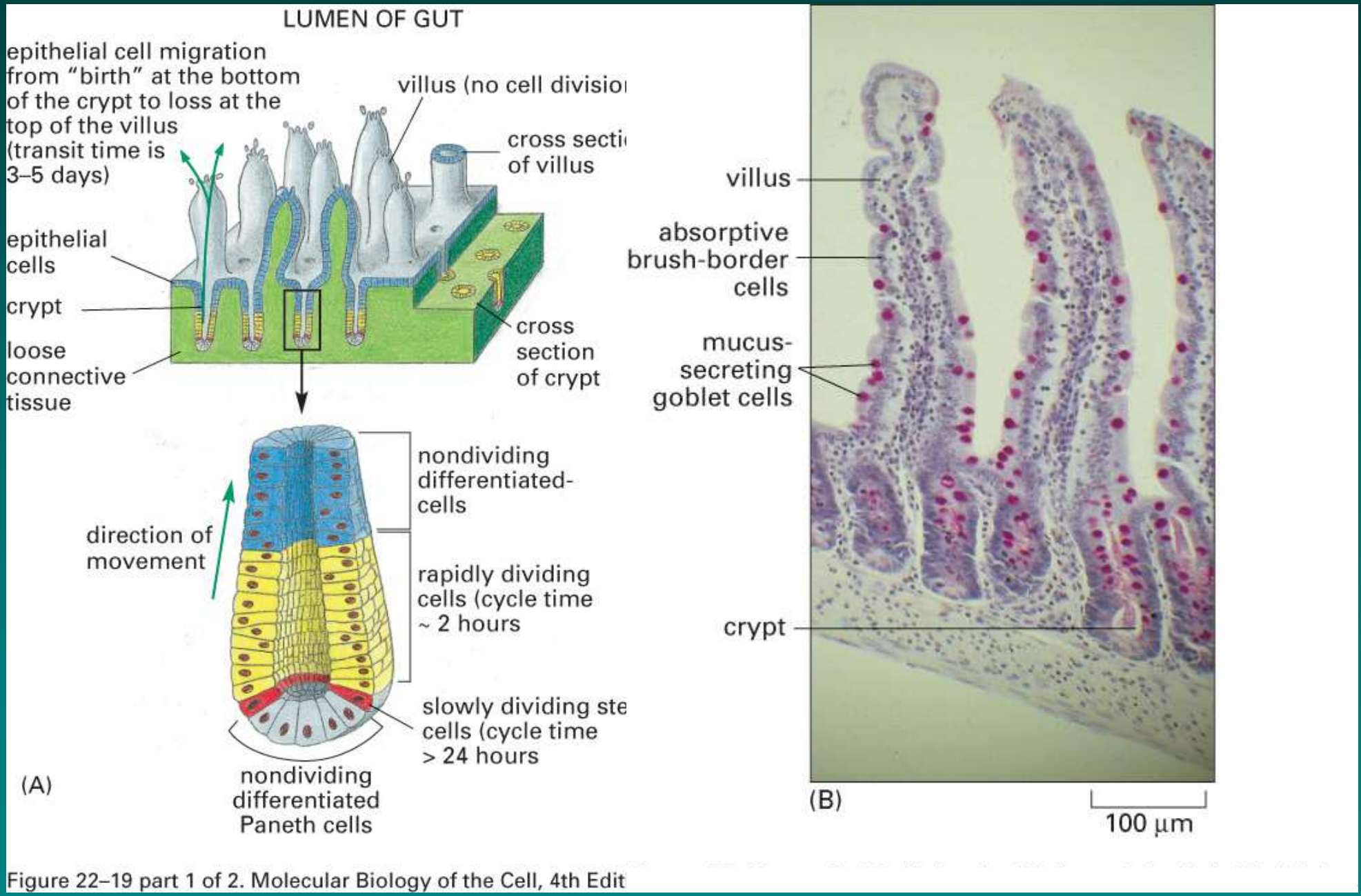
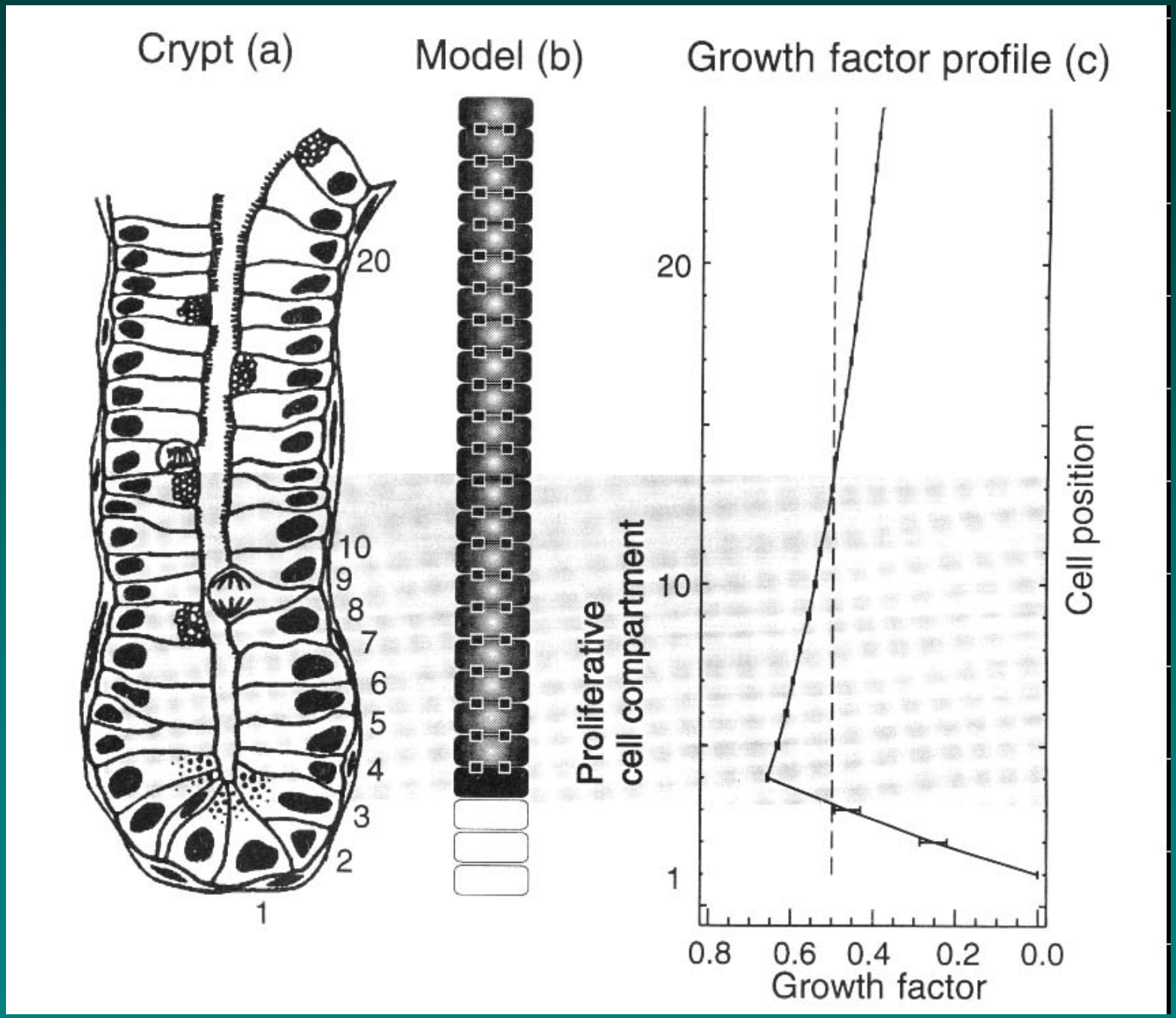


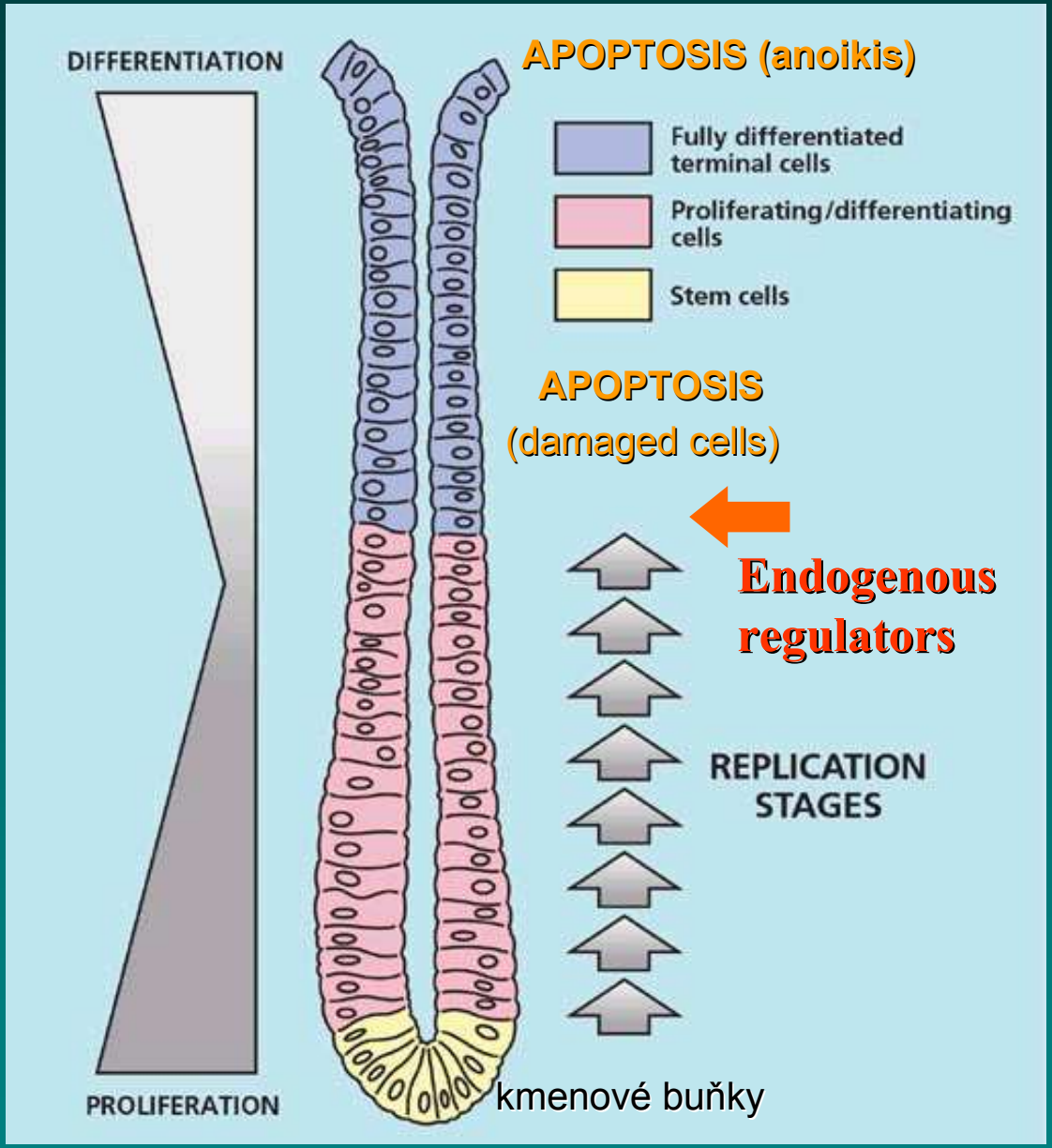
Figure 22–19 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edit

Střevní krypta a profil růstových faktorů



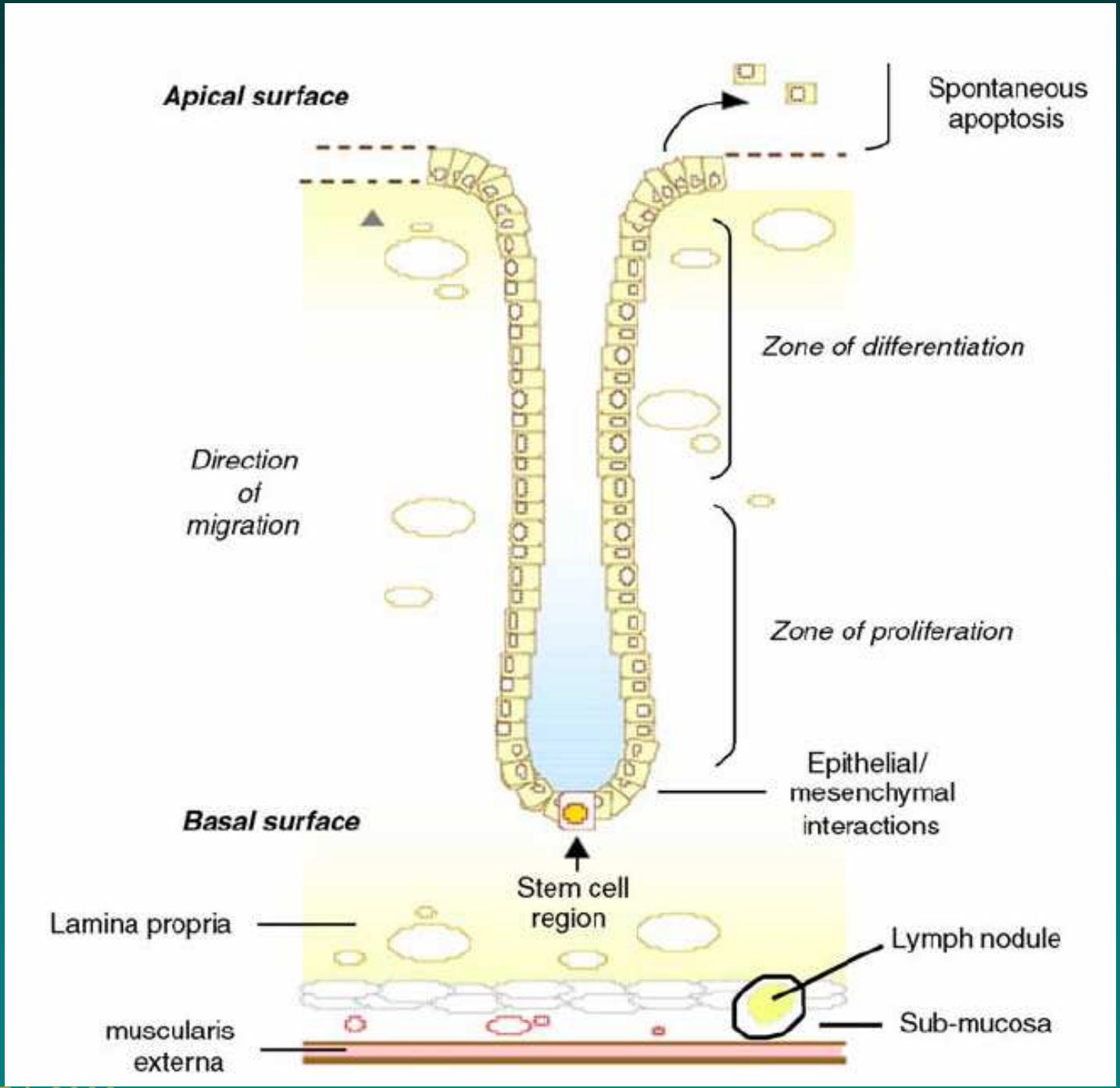
EPITEL TLUSTÉHO STŘEVA (kolonu)

- kontinuálně se obnovující buněčné populace
- řada zásadních fyziologických funkcí
- dynamická rovnováha mezi přírůstkem buněk na bázi krypty (proliferace) a úbytkem (anoikis – „detachment induced apoptosis“) na povrchu.
- regulace endogenními faktory (hormones and cytokines), ale rovněž složkami diety přítomnými v lumen střeva



Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou ve střevní kryptě

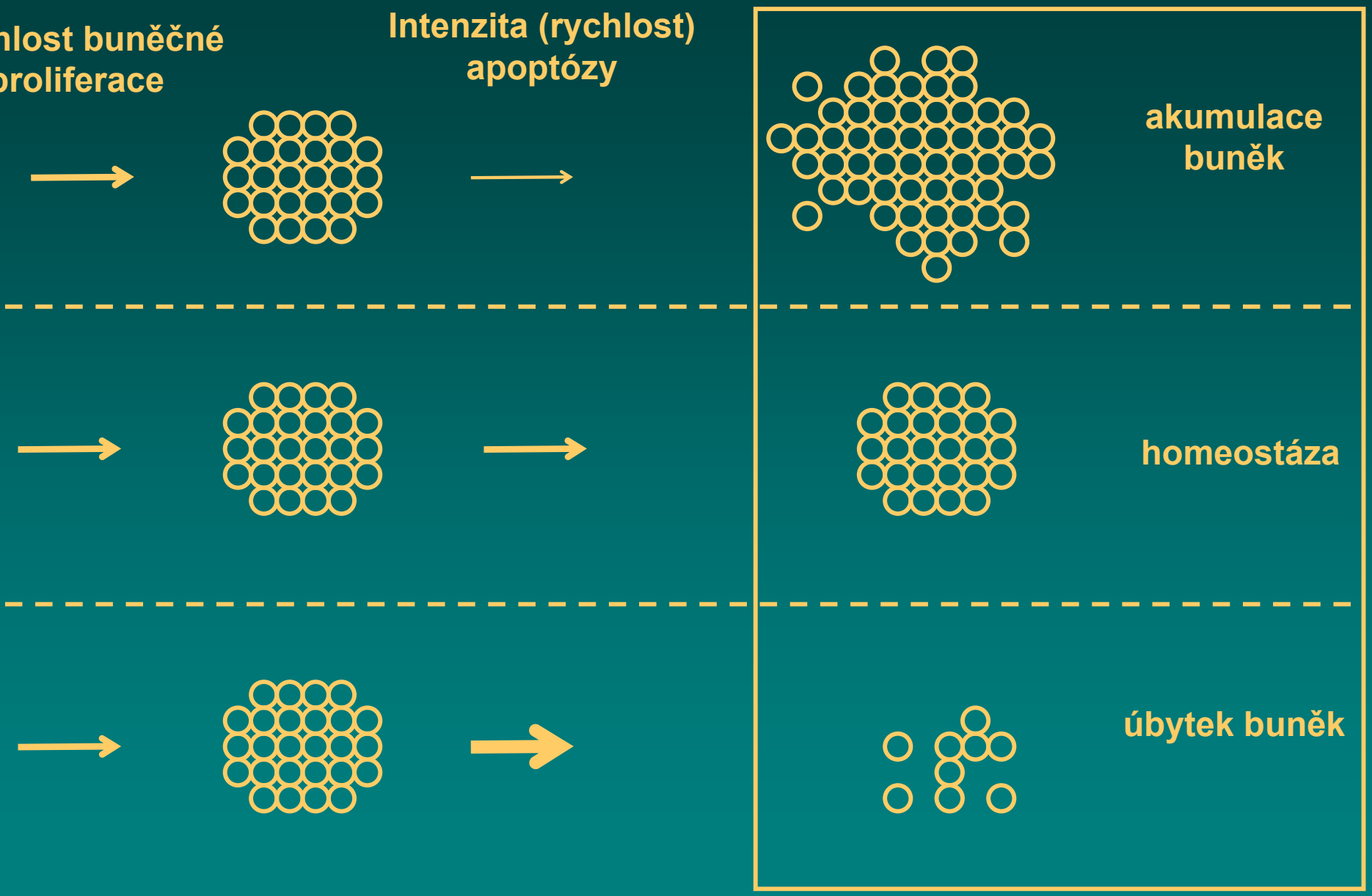


Chell S et al., BBA 2006

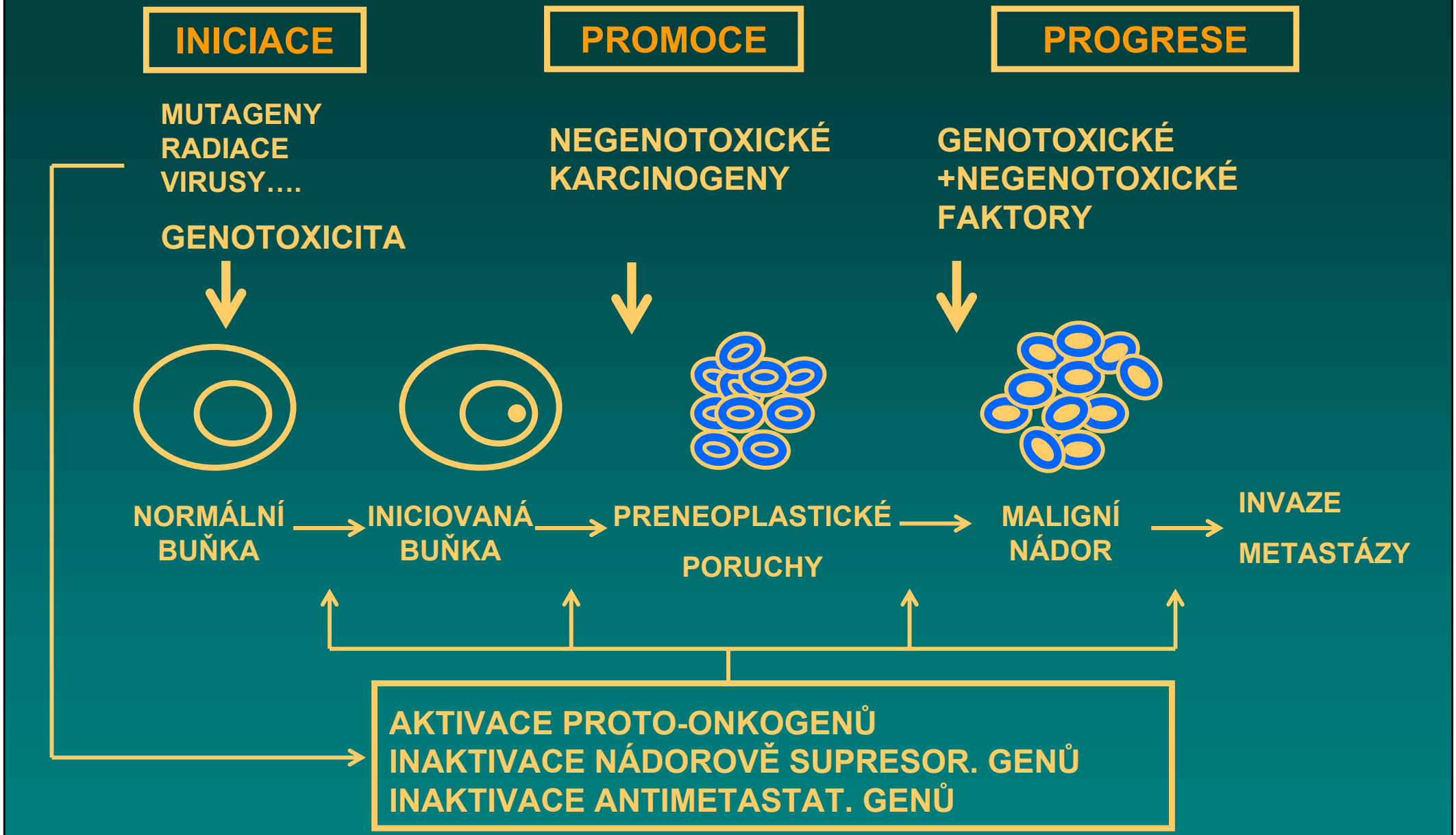
Vliv různé intenzity apoptózy na homeostázu

Rychlost buněčné proliferace

Intenzita (rychlost) apoptózy



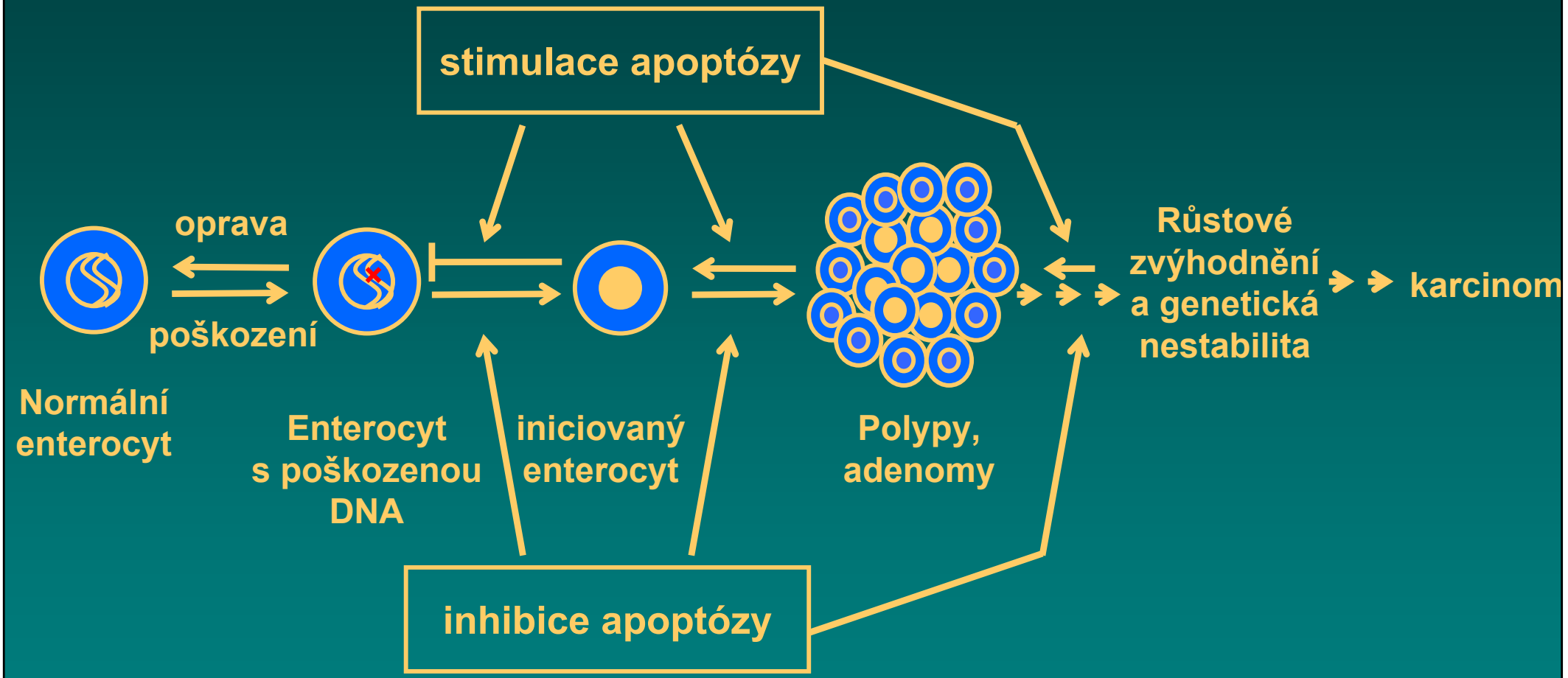
Laboratory of cytokinetics



Mnohostupňový proces karcinogeneze

Laboratory of cytokinetics

Vliv narušení (stimulace/inhibice) průběhu apoptózy v rámci procesu vícestupňové karcinogeneze



Laboratory of Cytokinetics

Karcinogeneze však znamená víc než jen mutagenezi

Kromě genových a chromozomálních mutací (genotoxicita) zahrnuje i
NEGENOTOXICKOU SLOŽKU (EPIGENETICKÉ DĚJE)
změny v expresi genetické informace
na transkripční, translační nebo postranslační úrovni

Geny jsou zapínány a vypínány
- ► během vývoje
- ► během buněčného cyklu, když buňka proliferuje
- ► když buňka diferencuje
- ► když je diferencovaná buňka stimulována k adaptivní odpovědi

Iniciovaná kmenová buňka je omezena v dalším růstu okolními normálními buňkami.

Po expozici nádorovým promotorem nebo promočními podmínkami (buněčná smrt nebo odstranění buněk) suprimující účinek okolních buněk prostřednictvím kontaktní inhibice mizí.

Laboratory of Cytokinetics

Homeostáza ve tkáních

je udržována
integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných)
a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciace, adaptivní odpovědi a apoptózy.

Iniciované preneoplastické buňky jsou udržovány v latentním stavu v důsledku působení těchto "přirozených" regulačních mechanismů.

V podpůrné (promoční) fázi rozvoje nádorů se uplatňují
látky působící negenotoxickými (nebo epigenetickými) mechanismy, tzv. nádorové promotory, které způsobují změny chování buněk v důsledku deregulace zmíněných procesů.

Zásahy, které vedou ke změnám v expresi genů a k poruchám homeostázy se odehrávají v buňce na různých úrovních a různými mechanismy.

Laboratory of Cytokinetics

Hlavní mechanismy charakterizující negenotoxickou karcinogenezi

- ovlivnění mechanismů signálové transdukce
- aktivace specifických receptorů
- produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, RNS)
- změny GJIC
- změny v metylaci DNA nebo v acetylaci histonů
- ovlivnění exprese onkogenů, nádorově supresorových genů a genů buněčného cyklu

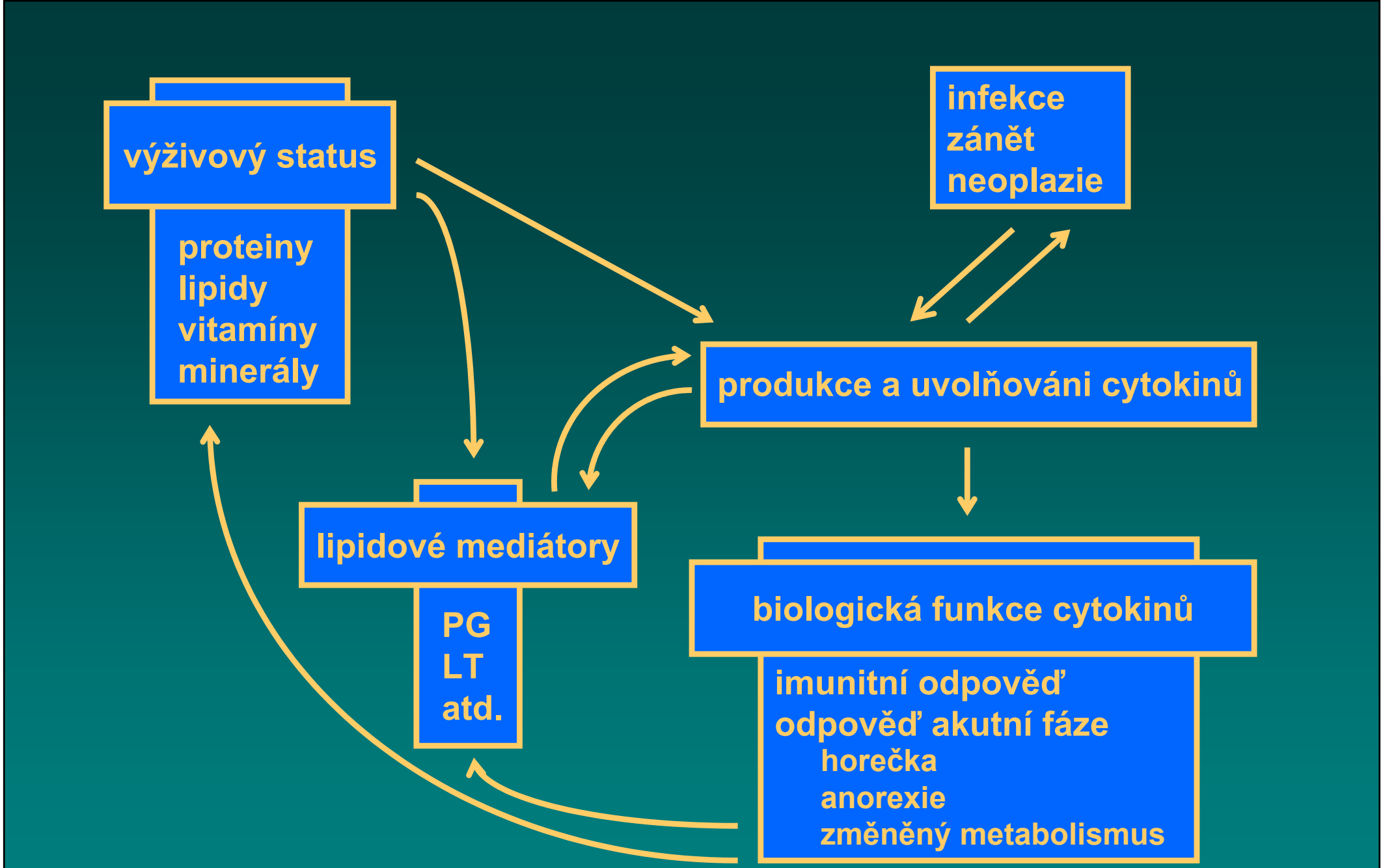
- změny buněčného cyklu
- změny proliferace (regenerativní nebo mitogenní)
- změny v apoptóze
- změny v rovnováze vyúsťující ve změnu obratu buněk ve tkáni

Laboratory of Cytokinetics

CYTOKINY

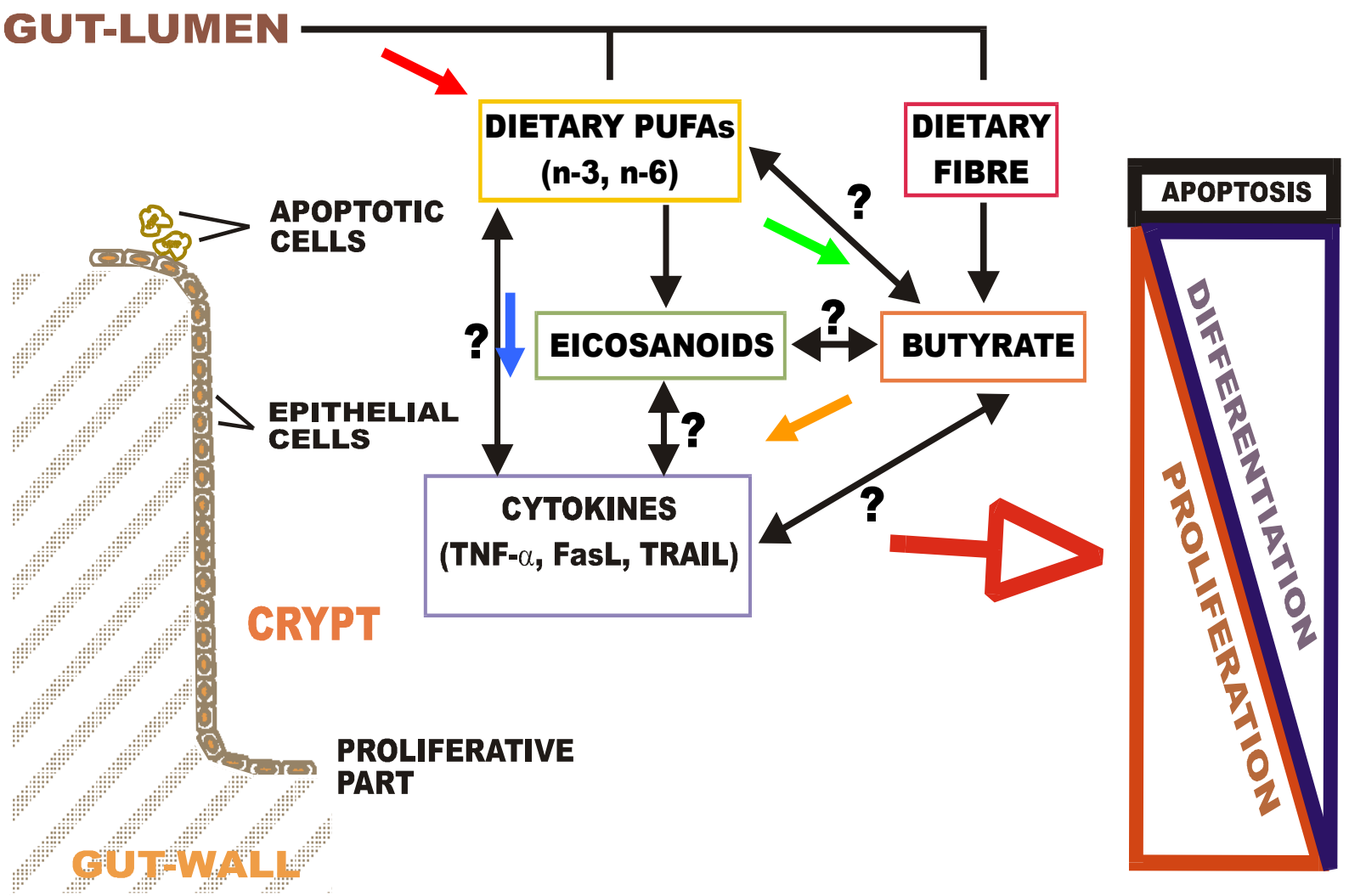
Důležité endogenní faktory ovlivňující kolorektální karcinogenezi
TNF-family (TNF-α, Fas ligand, TRAIL – TNF relating apoptosis inducing factor)
TGF-family (TGF-β)
EGF – epidermální růstový faktor
Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukiny
► multifunkční cytokin
► jeden z hlavních mediátorů zánětu
► TNF- α je produkován makrofágy a dalšími buňkami imunitníhp systému
► koncentrace TNF- α v kolonu je zvýšena během chronického zánětu (ulcerativní kolitida nebo Crohnova choroba)
► úloha v nádorové kachexii
► existuje interakce mezi cytokiny a dietetickými faktory – mastné kyseliny a eikosanoidy

Laboratory of cytokinetics



Vzájemné vztahy mezi výživou a infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny

INTERACTIONS OF DIETARY FACTORS AND ENDOGENOUS REGULATORS SUPPOSED TO AFFECT CYTOKINETICS OF COLONIC EPITHELIAL CELLS



Kovaříková M. et al. Eur J Cancer 2000
Kovaříková M. et al. Differentiation 2004

Hofmanová J. et a. Eur J Nutr 2005
Hofmanová J. et al. Cancer Letters 2005
Vaculová et al. Cancer Letters 2005

EXPERIMENTÁLNÍ CÍLE v Laboratoři cytokinetiky

◆ **ÚČINKY VNMK** kys. arachidonová, AA, 20:4, n-6
kys. dokosahexaenová, DHA, 22:6, n-3
BUTYRÁTU (NaBt)
samostatně nebo v kombinaci na cytokinetiku epiteliálních buněk kolonu a detailnější poznání mechanismů účastnících se těchto procesů

◆ **INTERAKCE MASTNÝCH KYSELIN** (a jejich metabolismu) s **ENDOGENNÍMI INDUKTORY APOPTÓZY** (TNFα, Fas, TRAIL) a jejich vlivu na epiteliální buňky kolonu - mechanismy

- změny buněčných lipidů v souvislosti s modulací cytokinetiky
- srovnání odpovědi nádorových a „normálních“ buněk kolonu

Laboratory of cytokinetics

VÝSTUPY

- **Základní výzkum**

- **Klinika a výrobní praxe**

  - protinádorová prevence a terapie
  - oblast nutriční farmakologie

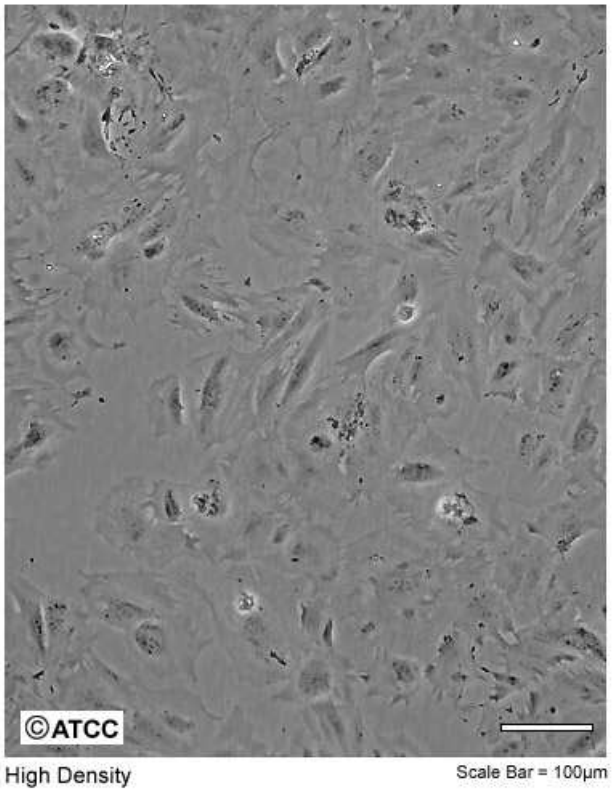
optimalizace lipidových výživ pro určité diagnózy („disease specific nutrition“), zejména u pacientů s nádorovým onemocněním

(Projekt cíleného výzkumu AV ČR – „Tukové složky výživy…)

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

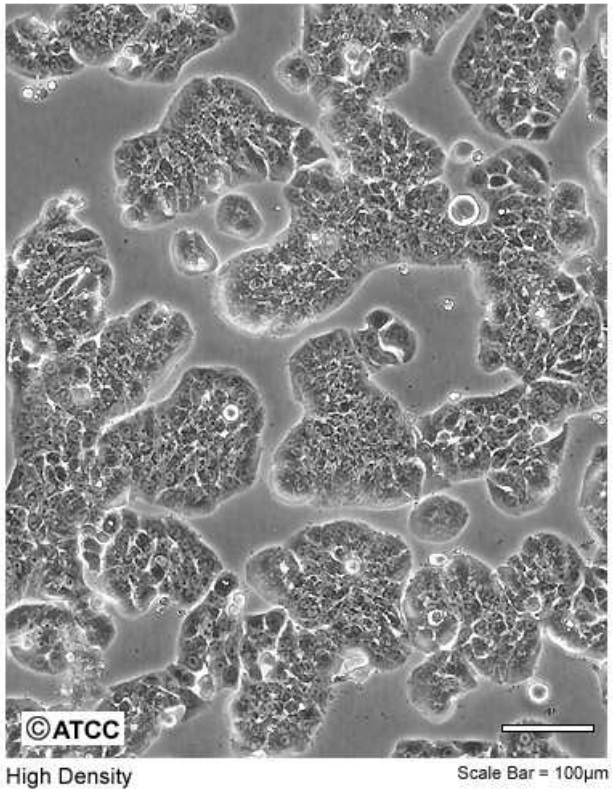
Linie lidských epiteliálních buněk kolonu

FHC
normální
fetální střevo



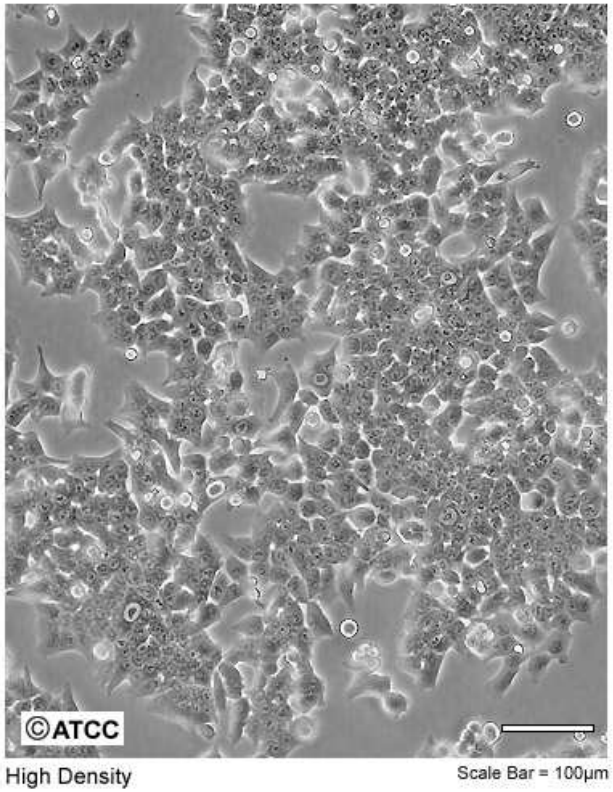
HT-29
diferencující
neinvazívní

Adenokarcinom kolonu



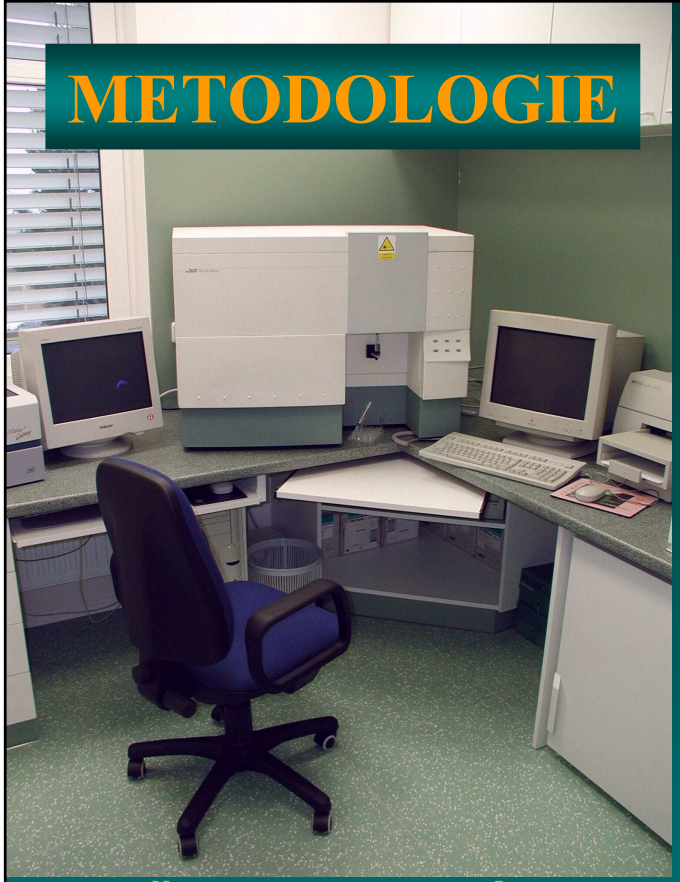
CaCo-2

HCT-116
nediferencující
invazívní



SW 620 – lymf. uzlina

METODOLOGIE



CYTOKINETIKA

Detekce proliferace- regulace buněčného cyklu a zapojených proteinů,

diferenciace -buněčná morfologie, aktivita specifických enzymů, exprese specifických proteinů

apoptózy -detekce charakteristických změn na úrovni jádra, mitochondrií, membrán, cytoskeletu, exprese regulačních proteinů, štěpení specifických enzymů a substrátů

ZMĚNY LIPIDOVÉHO METABOLISMU A VLASTNOSTÍ BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

-změny spektra MK v bun. lipidech, „lipid packing“ v membránách, akumulace triglyceridů, detekce kardiolipinu, membránový potenciál

ZMĚNY OXIDATIVNÍHO METABOLISMU

- produkce reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) a dusíku, lipidová peroxidace, účinky antioxidantů

Využití moderních metod průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie, spektroskopie, metod molekulární biologie…

DETEKCE APOPTÓZY S VYUŽITÍM PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE - SROVNÁNÍ VYBRANÝCH METOD

Vaculová Alena, Hofmanová Jiřina, Souček Karel, Horváth Viktor, Kozubík Alois

Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav Akademie věd ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno;
e-mail: vaculova@ibp.cz

ÚVOD

Apoptóza, geneticky kontrolovaný proces buněčné smrti, je charakterizována specifickými morfologickými a biochemickými znaky. Mezi ně patří bobtnání cytoplazmatické membrány, ztráta buněčné adheze, reorganizace cytoskeletu, kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu a tvorba tzv. apoptotických tělísek. Zároveň dochází k aktivaci kaspáz, změnám v mitochondriálního membránového potenciálu, změnám v symetrii rozložení lipidů v membránách a aktivaci endonukleáz, která je doprovázena internukleozomální fragmentací DNA.

TRAIL je ligand z rodiny TNF (tumor necrosis factor), který indukuje apoptózu u celé řady nádorových buněk, zatímco většina normálních buněk je k jeho účinkům rezistentní. V současné době je intenzivně studována možnost využití TRAILu v protinádorové terapii. Úspěšnému využití TRAILu v klinické praxi musí předcházet detailní studium jeho signální dráhy.

TRAIL indukuje apoptózu po vazbě na tzv. „death receptory" DR4 (TRAIL-R1) a DR5 (TRAIL-R2). Na úrovni receptoru dochází k tvorbě signálního komplexu zvaného DISC a k aktivaci iniciační kaspázy-8. Aktivovaná kaspáza-8 může dále přenášet apoptotický signál dvěma cestami. Dochází jednak k přímé aktivaci kaspázy-3, jednak ke štěpení proteinu Bid, který přenáší signál do mitochondrií. V regulaci průběhu tzv. mitochondriální dráhy indukce se významně uplatňují proteiny rodiny Bcl-2, reaktivní metabolity kyslíku, změny mitochondriálního membránového potenciálu a vyliti pro-apoptotických proteinů do cytoplazmy. Následuje aktivace iniciační kaspázy-9, která dále aktivuje kaspázu-3. Tato efektorová kaspáza se pak podílí na štěpení celé řady tzv. „death substrátů" jako jsou např. poly(ADP-riboosyl) polymeráza (PARP) nebo cytokeratin 18 (CK18).

V naší práci jsme se zaměřili na studium signální dráhy a změn v průběhu apoptózy indukované TRAILem u modelové buněčné linie lidského adenokarcinomu kolonu HT-29. Při studiu jsme využili řadu metod průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie a western blotingu s následnou imunodetekcí. Získané výsledky, jejich srovnání a interpretace jsou obsahem tohoto sdělení.

CÍLE PRÁCE

- popis signální dráhy TRAILu u lidských nádorových buněk kolonu HT-29
- detekce charakteristických parametrů apoptózy nádorových buněk kolonu HT-29 s využitím několika modernich metod průtokové cytometrie a srovnání dosažených výsledků
- interpretace těchto výsledků s ohledem na další výsledky získané pomocí metod fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie a western blotingu s následnou imunodetekcí

ZÁVĚRY

Detekce apoptózy indukované TRAILem u buněk linie HT-29
- srovnání vybraných metod

Po působení TRAILu docházelo k významným změnám na úrovni cytoskeletu a plazmatické membrány buněk HT-29

- v důsledku aktivace kaspáz (potvrzeno pomocí detekce aktivity kaspáz a štěpení prokaspáz) docházelo ke specifickému štěpení CK18 u 25,7% buněk
- u stejného počtu buněk (26,3%) byla detekována translokace PS v cytoplazmatické membráně

Velmi dobrá korelace výsledků použitých metod byla také zaznamenána na úrovni mitochondrií

- TRAIL indukoval významný pokles MMP u 14,6% buněk
- jako pozitivní s ohledem na expresi proteinu Apo2.7 bylo detekováno 17,1% buněk

Během apoptózy buněk HT-29 byla pozorována kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu u 15% buněk (fluorescenční mikroskop). Nebylo však detekováno internukleozomální štěpení DNA (TUNEL, agarózová gelová elektroforéza). Předpokládáme proto, že u buněk této linie probíhalo štěpení DNA pouze na malý počet fragmentů o vysoké molekulové hmotnosti, pro jejichž detekci pravděpodobně nebyla metoda TUNEL dostatečně citlivá.

USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ

Buňky HT-29 byly vysévány v McCoyově médiu s 5% séra a kultivovány při standardních podmínkách. 24 hodin po vysetí byly buňky ovlivněny přidáním TRAILu (100 ng/ml, lidský rekombinantní His-TRAIL) na dobu 4 hodin. Následovalo hodnocení charakteristických parametrů apoptózy, především pomocí několika různých metod průtokové cytometrie (FACSCalibur, Becton Dickinson). Získané výsledky byly dále doplněny pomocí metod fluorimetrie (Fluostar Galaxy), fluorescenční mikroskopie (Olympus IX70) a metody western blotingu s následnou imunodetekcí. Všechna data (vždy 3 nezávislá opakování) byla statisticky vyhodnocena (ANOVA, Tukey test, p 0,05), (*) značí výsledek významný ve srovnání s neovlivněnou kontrolou.

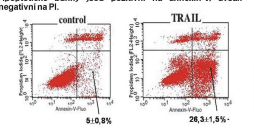
SHRNUTÍ

Bylo provedeno srovnání výsledků získaných pomocí metod průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Hodnoty v tabulce představují výsledky (průměry ze tří nezávisiých opakování) hodnocení vybraných parametrů apoptózy - štěpení CK18, translokace PS, exprese proteinu Apo2.7, pokles MMP, změny na úrovni jádra detekované pomocí metody TUNEL (průtoková cytometrie) a na základě hodnocení jaderné morfologie (fluorescenční mikroskopie).

	cytoskelet a plazmatická membrána		mitochondrie		jádro	
% buněk	CK 18	PS	Apo2.7	MMP	DAPI	TUNEL
kontrola	1,7	5,0	1,8	2,4	2,8	0,2
TRAIL	25,7	26,3	17,1	14,6	15,0	0,3

Translokace fosfatidylserinů (PS) Annexin-V-FITC/propidium jodid (průtokový cytometr)

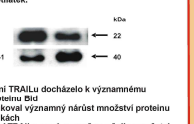
Během apoptózy dochází k translokaci PS z vnitřní strany mitochondriální membrány na stranu vnější. Pro detekci externalizovaného PS se používá annexin-V konjugovaný s FITC. Pro rozlišení populace apoptotických a nekrotických buněk se provádí současné barvení propidium jodidem (PI). Apoptotické buňky jsou pozitivní na annexin-V, avšak negativní na PI.



Po působení TRAILu docházelo k významné translokaci PS v plazmatické membráně, pozitivní s ohledem na tento studovaný parametr apoptózy bylo 26% buněk HT-29.

Proteiny rodiny Bcl-2 - Mcl-1, Bcl-2, Bid, Bax, Bak (western bloting, imunodetekce)

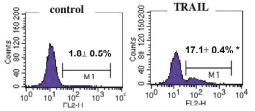
Proteiny rodiny Bcl-2 s antiapoptotickou (Bcl-2, Mcl-1) i proapoptotickou (Bid, Bax, Bak) funkcí se významně uplatňují v regulaci apoptózy indukované TRAILem u celé řady buněk na úrovni mitochondrií. Studovali jsme množství uvedených proteinů v buňkách pomocí elektroforézy, westernového přenosu a následné imunodetekce s využitím specifických protilátek.



- po působení TRAILu docházelo k významnému štěpení proteinu Bid
- TRAIL indukoval významný nárůst množství proteinu Mcl-1 v buňkách
- po působení TRAILu se významně neměnilo množství proteinů Bax a Bak
- v buňkách linie HT-29 se nevyskytuje protein Bcl-2

Mitochondriální protein Apo2.7 Apo2.7-PE (průtokový cytometr)

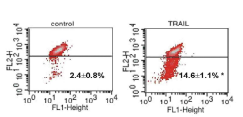
Apo2.7 (7A6 antigen) je protein o velikosti 38 kDa, nacházející se v membráně mitochondrií. Jeho exprese je charakteristická pro buňky podléhající apoptóze. V nepřítomnosti apoptotického stimulu není tento protein v buňce detekován. Detekce proteinu Apo2.7 se provádí pomocí specifické protilátky Apo2.7-FITC, po předcházející permeabilizaci buněk digitoninem.



Po působení TRAILu docházelo k významnému nárůstu exprese proteinu Apo2.7 u 17 % buněk HT-29.

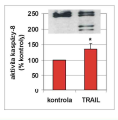
Mitochondriální membránový potenciál (MMP) TMRE (průtokový cytometr)

Ztráta MMP se hodnotí jako nepřímý důkaz otevření megapórů a zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, které hraje úlohu při vyliti některých mediátorů apoptózy z těchto organel. Při analýze MMP se používá fluorescenční lipofilní kation TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester), který se hromadí v mitochondriích v závislosti na MMP. S využitím průtokové cytometrie lze detekovat posun ve fluorescenci TMRE, podávající informaci o změnách MMP.



TRAIL indukoval významný pokles MMP u buněk HT-29; bylo detekováno 14,6 % buněk se sníženým MMP.

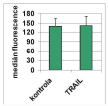
Aktivita kaspázy-8, štěpení prokaspázy-8 (fluorimetrická detekce, western bloting)



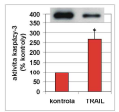
TRAIL indukoval štěpení prokaspázy-8, spojené se vznikem specifického fragmentu o velikosti 41/43 kDa. Současně jsme detekovali významné posílení aktivity této iniciační kaspázy u buněk HT-29.

Produkce ROS (DHR-123, průtokový cytometr)

Reaktivní metabolity kyslíku (ROS) mohou hrát významnou úlohu v indukci apoptózy. Pro měření produkce ROS jsme využili dihydrorhodamin-123 (DHR-123). Ve studovaném časovém intervalu jsme však neprokázali změny v produkci ROS po působení TRAILu u buněk HT-29.

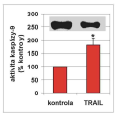


Aktivita kaspázy-3, množství prokaspázy-3 (fluorimetrická detekce, western bloting)

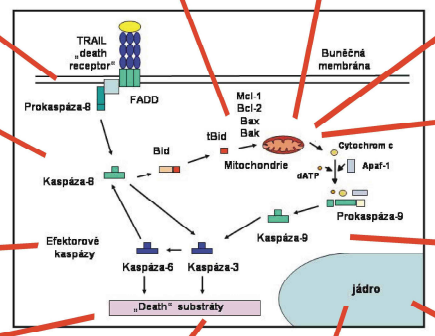


TRAIL indukoval významné štěpení prokaspázy-3, spojené se zvýšením aktivity kaspázy-3 u buněk HT-29.

Aktivita kaspázy-9, množství prokaspázy-9 (fluorimetrická detekce, western bloting)

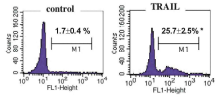


TRAIL indukoval významné štěpení prokaspázy-9, spojené se zvýšením aktivity kaspázy-9 u buněk HT-29.



Specifické štěpení cytokeratinu 18 (CK18) M30 cytoDEATH (průtokový cytometr)

Efektorové kaspázy mohou štěpit řadu substrátů v buňce. Na úrovni cytoskeletu se jedná především o CK18. Po specifickém rozštěpení molekuly CK18 je odhalen nový epitop, který se nachází výlučně u apoptotických buněk. Tento epitop lze detekovat pomocí specifické protilátky (M30 cytoDEATH), konjugované s FITC.



Po působení TRAILu docházelo k významnému specifickému štěpení CK18, pozitivní s ohledem na tento studovaný parametr apoptózy bylo 25,7% buněk HT-29.

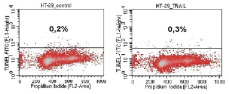
Štěpení proteinu PARP (western bloting)

PARP je jaderný protein (113 kDa), který se podílí na opravě zlomů DNA. Během apoptózy dochází ke specifickému štěpení PARP na fragmenty o velikosti 89 a 25 kDa. Detekce těchto fragmentů je považována za citlivý marker charakterizující probíhající apoptózu.

TRAIL indukoval významné štěpení PARP u buněk linie HT-29.

Internukleozomální štěpení DNA (TUNEL, průtokový cytometr)

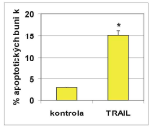
Aktivace endonukleáz a následné internukleozomální štěpení DNA patří mezi charakteristické znaky apoptózy. Vzniklé úseky DNA lze identifikovat pomocí enzymatického značení jejich 3'OH konců nukleotidy konjugovanými s FITC. Velmi výhodné je současné obarvení DNA propidium jodidem. Takto lze detekovat, zda indukce fragmentace DNA je specifická pro určité fáze buněčného cyklu.



U buněk HT-29 během apoptózy indukované TRAILem nebyla prokázána internukleozomální fragmentace DNA. Absence fragmentů DNA o velikosti 180 bp u apoptotických buněk HT-29 byla v naší laboratoři rovněž potvrzena pomocí agarózové gelové elektroforézy DNA.

Jademá morfologie (DAPI, fluorescenční mikroskopie)

Během apoptózy rovněž dochází k významným změnám morfologie jádra, které se projevují jako kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu. S využitím fluorescenční mikroskopie jsme (po obarvení DAPI) hodnotili množství apoptotických buněk na základě uvedených změn.



TRAIL indukoval významný nárůst (15%) počtu buněk s charakteristickou apoptotickou morfologií jádra.

Detekce apoptózy různými metodami

Průtoková cytometrie

Fluorimetrie

Fluorescenční mikroskopie

Western blotting

- změny v uspořádání membránových lipidů (AnnexinV)
- aktivita a štěpení kaspáz
- štěpení substrátů kaspáz (PARP, cytokeratin 18)
- exprese proteinů rodiny Bcl-2
- mitochondriální membránový potenciál
- kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

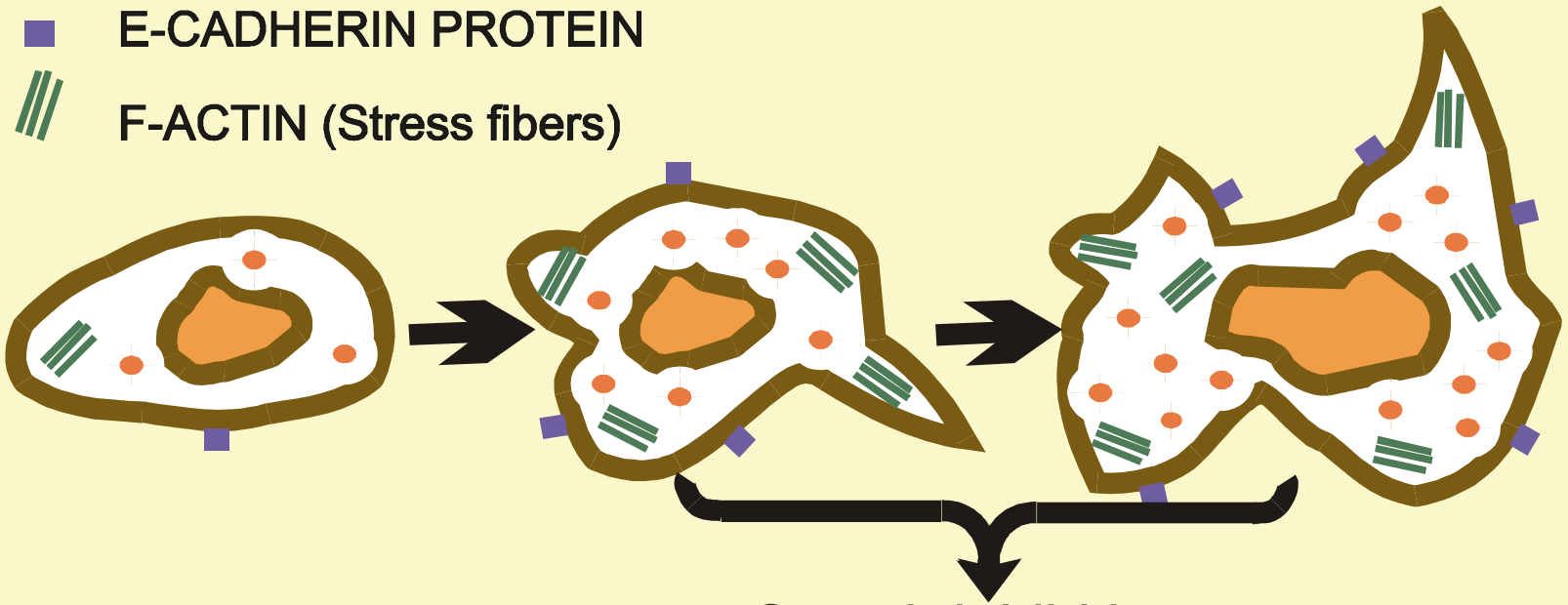
Znaky diferenciace indukované butyrátem

ALKALINE PHOSPHATASE

E-CADHERIN PROTEIN

F-ACTIN (Stress fibers)

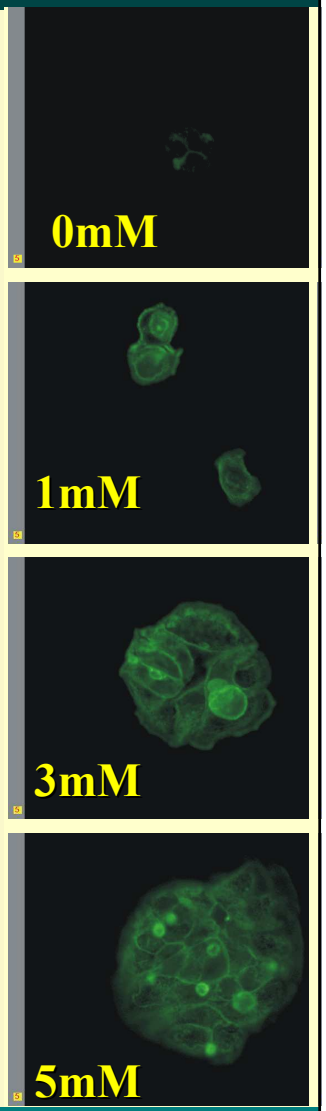
EXPRESE KARCINOEMBRYONÁLNÍHO ANTIGENU



Proliferated cell

Growth inhibition & arrest in G1-phase of the cell

TIME OF BUTYRATE TREATMENT



Laboratory of Cytokinetics

ÚČINKY VNMK

kys. arachidonová, AA, 20:4, n-6

kys. dokosahexaenová, DHA, 22:6, n-3

BUTYRÁTU (NaBt)

samostatně nebo v kombinaci

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

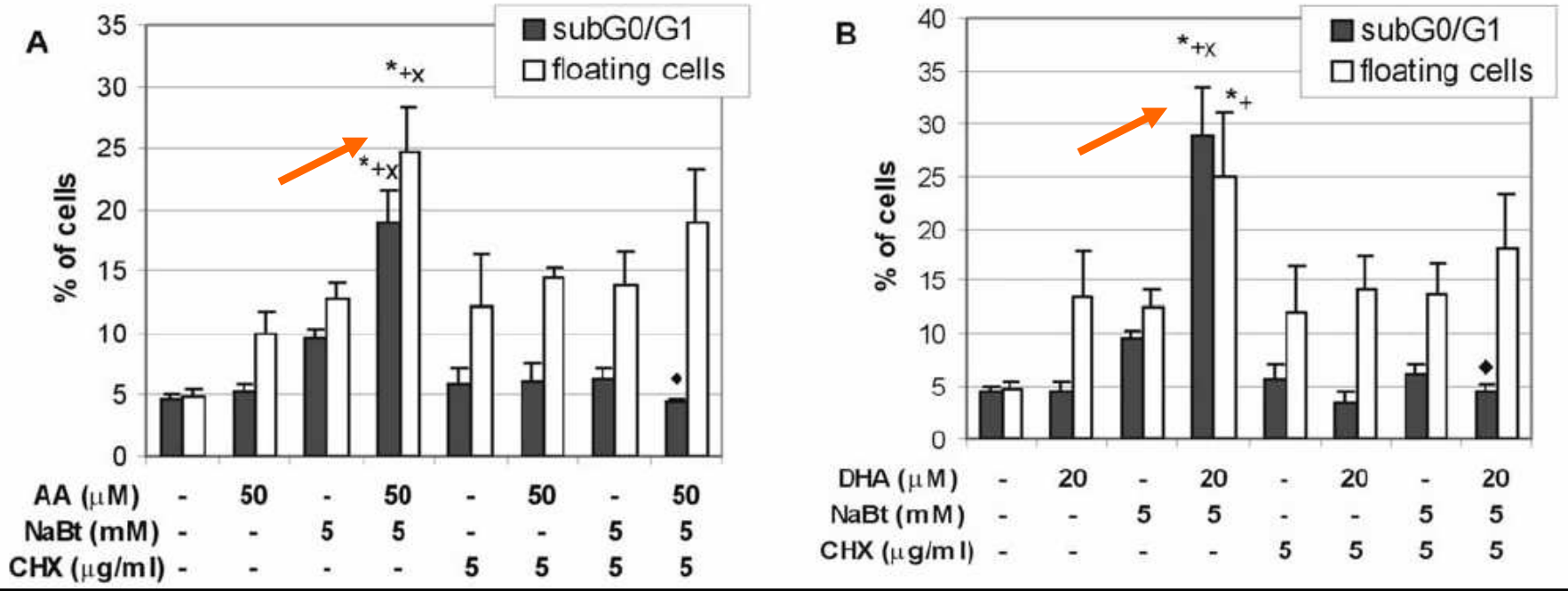
VNMK (AA, DHA) zvýšily citlivost buněk HT-29 k apoptóze indukované NaBt

Eur J Nutr (2005) 44: 40–51
DOI 10.1007/s00394-004-0490-2

ORIGINAL CONTRIBUTION

Jiřina Hofmanová
Alena Vaculová
Antonín Lojek
Alois Kozubík

Interaction of polyunsaturated fatty acids and sodium butyrate during apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells



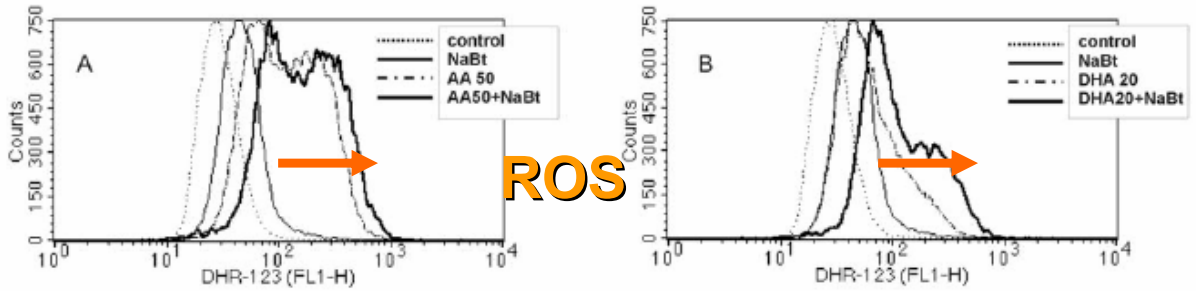


Fig. 5 Production of reactive oxygen species (ROS) in HT-29 cells non-pre-treated or pre-treated for 48 h with 50 μM of arachidonic (AA 50; A) or 20 μM of docosahexaenoic (DHA 20; B) acid and then incubated for 24 h in PUFA-free medium without or with 5 mM sodium butyrate (AA50-NaBt, DHA20-NaBt). ROS were measured by FCM as dihydrorhodamine-123 (DHR-123) fluorescence (FL1-H). The figure shows a representative result of three independent experiments

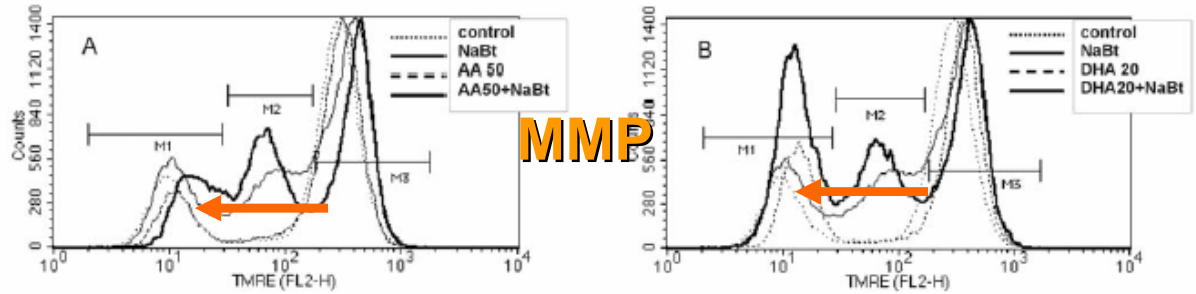
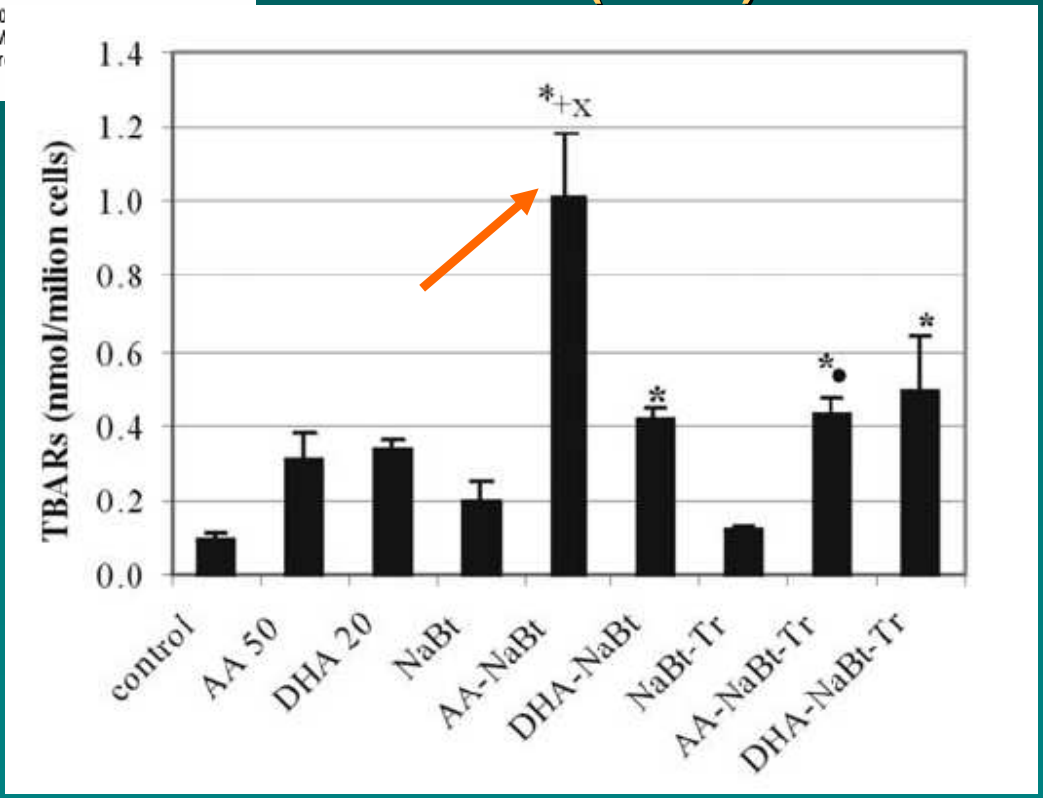


Fig. 6 Mitochondrial membrane potential (MMP) of HT-29 cells non-pre-treated or pre-treated for 48 h with 50 μM of arachidonic (AA 50 (DHA 20; B) acid and then incubated for 24 h in PUFA-free medium without or with 5 mM sodium butyrate (AA50-NaBt, DHA20-NaBt). MM methylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) fluorescence (FL2-H). *M1* region of collapsed MMP, *M2* region of dissipated MMP, *M3* r shows a representative result of three independent experiments

Zvýšená produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)

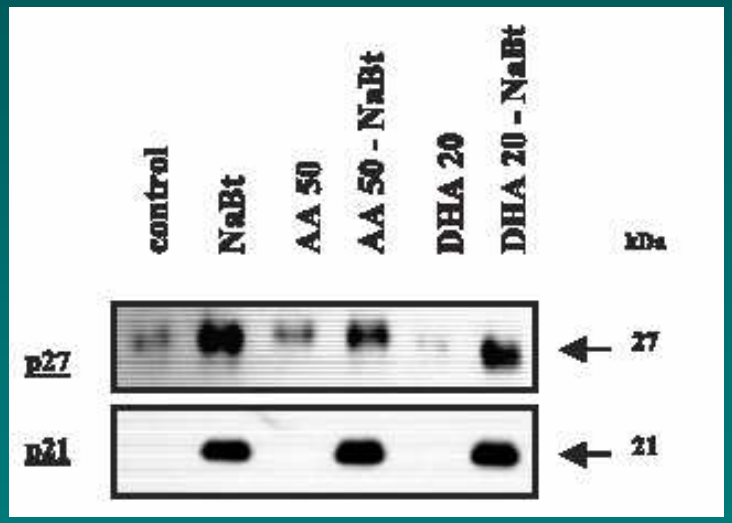
Snížený mitochondriální membránový potenciál (MMP)

Zvýšená lipidová peroxidace

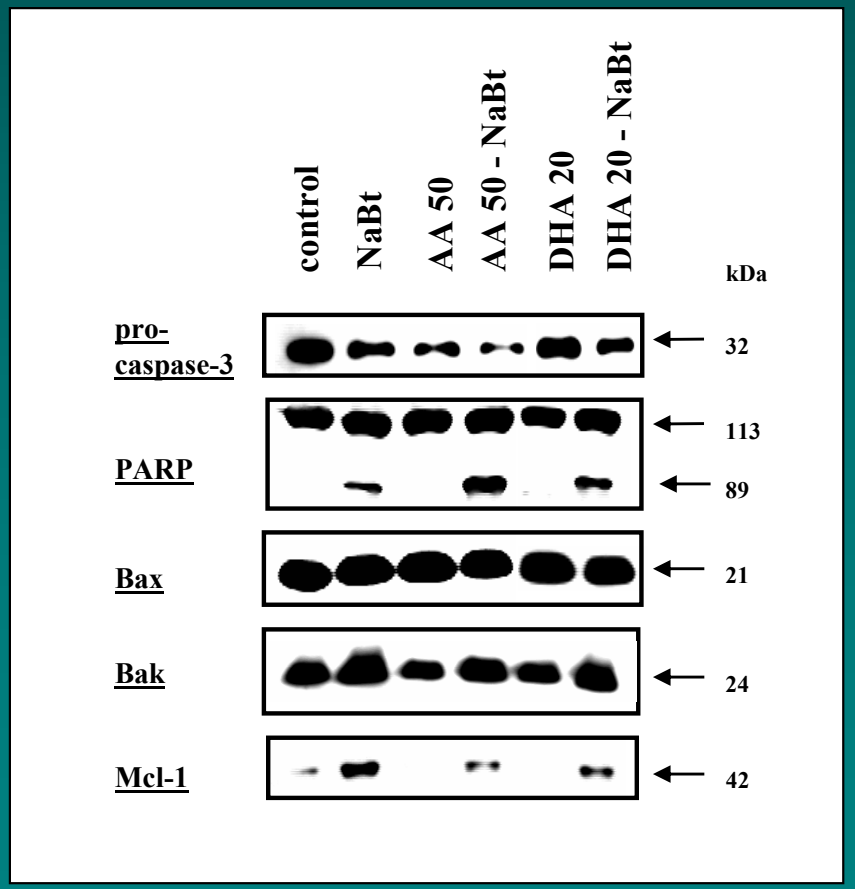


Molekulární determinanty účinků studovaných látek

Proteiny buněčného cyklu (p21, p27)



Apoptické proteiny



Laboratory of Cytokinetics

Srovnání odpovědi nenádorových a nádorových buněk k VNMK, NaBt a jejich kombinaci

- Odpověď střevních epiteliálních buněk na působení AA a DHA je významně vyšší u nenádorové linie FHC než u nádorových linií

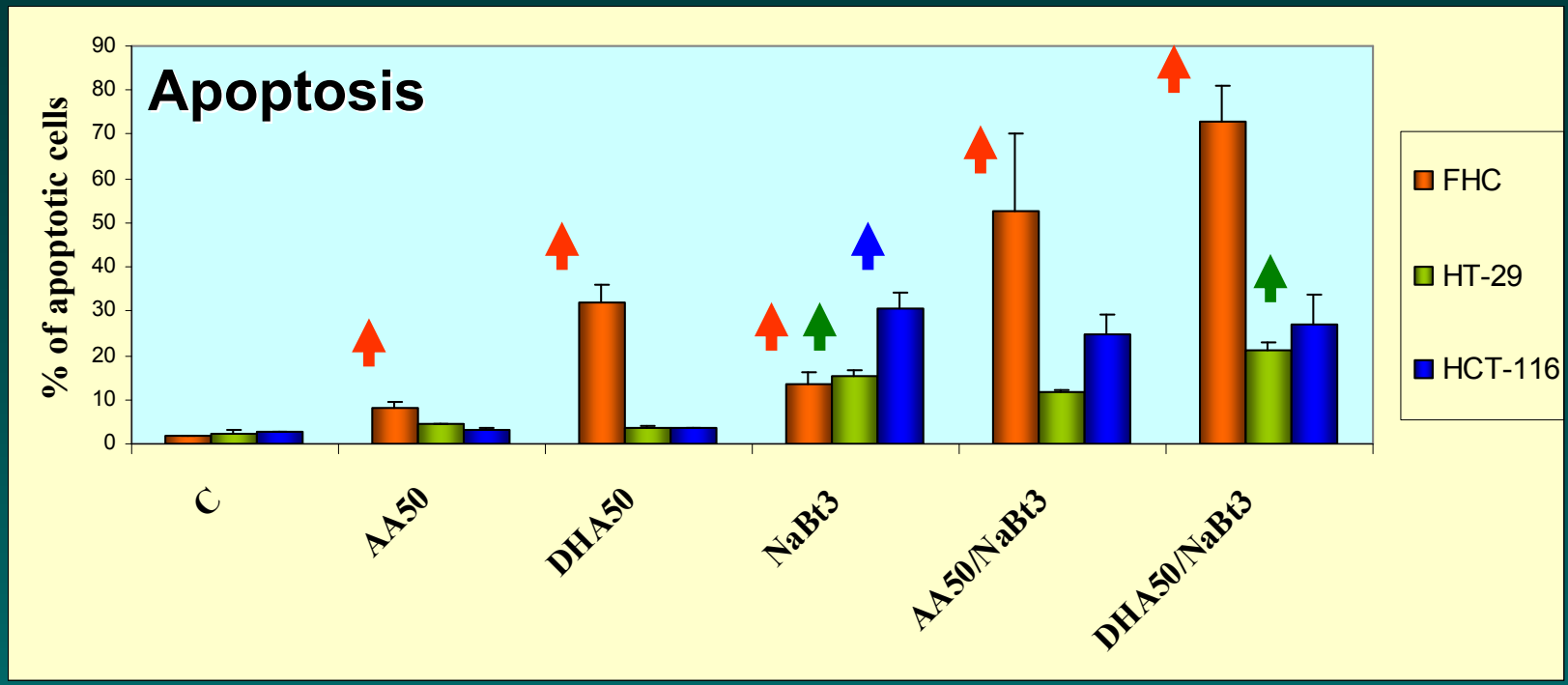
- Butyrát indukuje diferenciaci anebo apoptózu střevních buněk v závislosti na stupni transformace

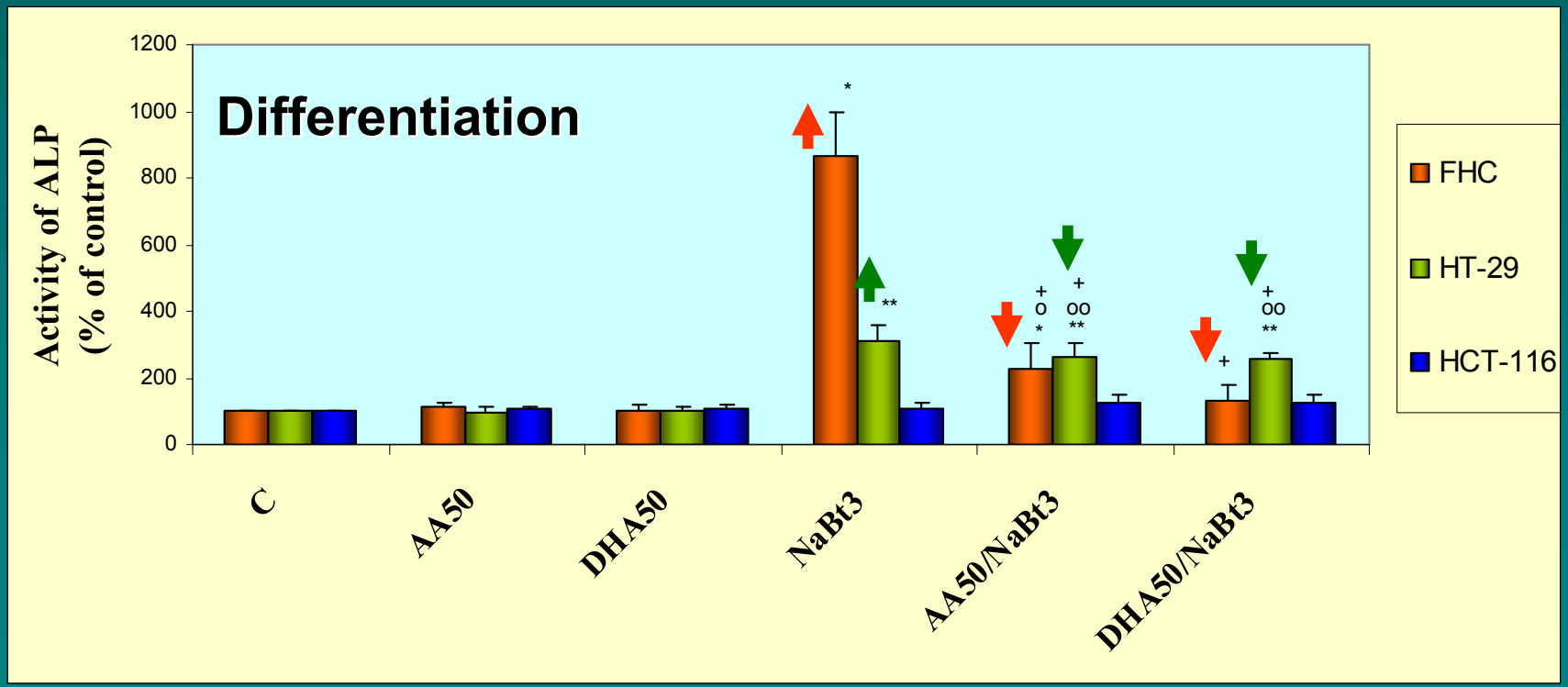
diferenciace	FHC ► HT-29 ► HCT116 ►SW620
apoptóza	SW620 ► HCT116 ► HT-29 ► FHC

- Tyto procesy mohou být modulovány spolupůsobením AA a zejména DHA.

Laboratory of Cytokinetics

Srovnání odpovědi nenádorových a nádorových buněk





Mcl-1

- protein rodiny Bcl-2 podporující přežití buněk

lokalizovaný na chromozomu 1q21
krátký „half life“ , rychlá regulace

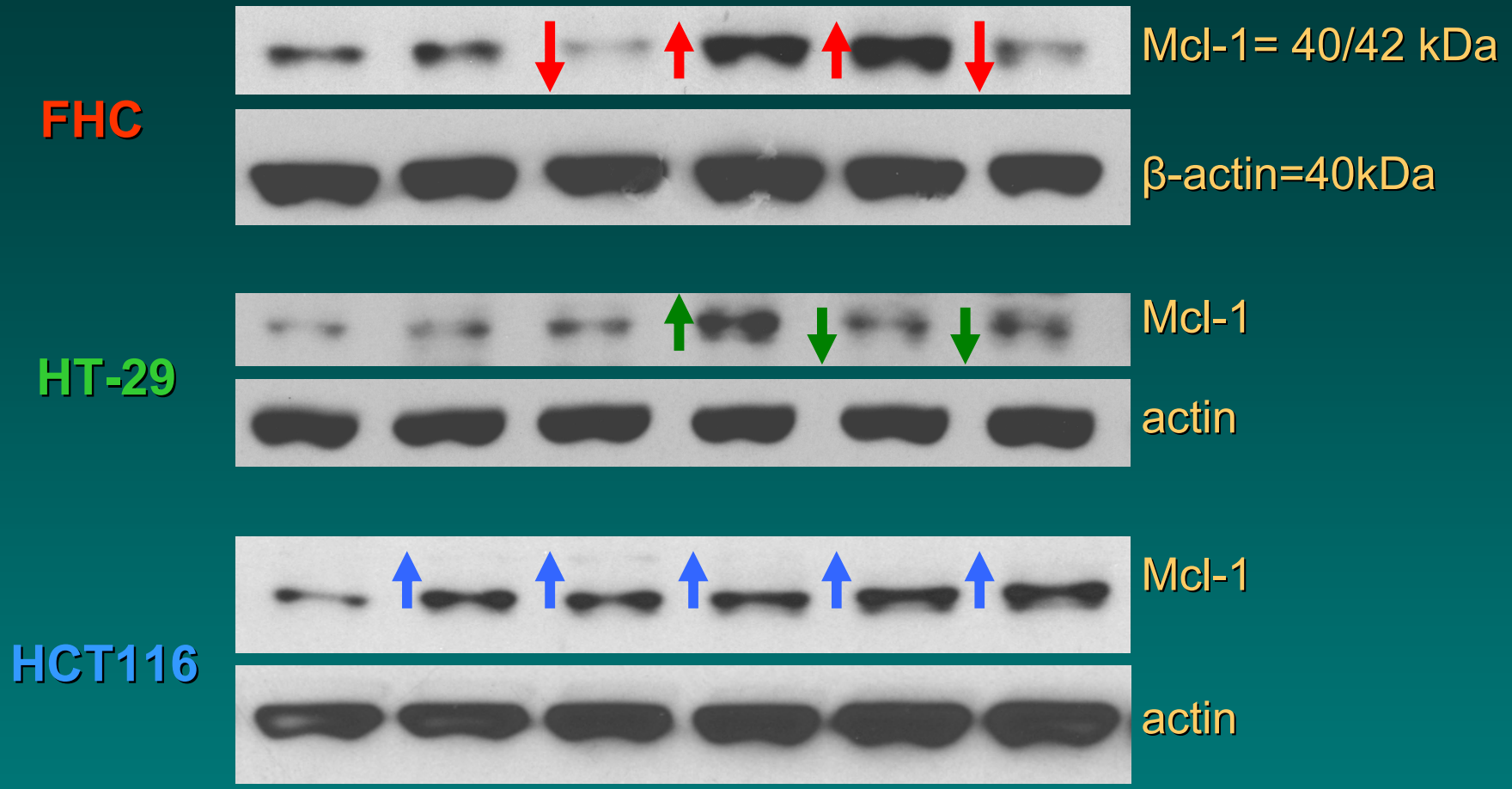
- hraje důležitou úlohu při rozhodování buněk mezi životem a smrtí v odpovědi na rychle se měnící prostředí
  - chrání buňky před apoptózou v průběhu diferenciac
  - exprese se snižuje při indukci apoptózy

- je štěpen kaspázami na molekulu podporující apoptózu

- zajímavý s hlediska protinádorové terapie

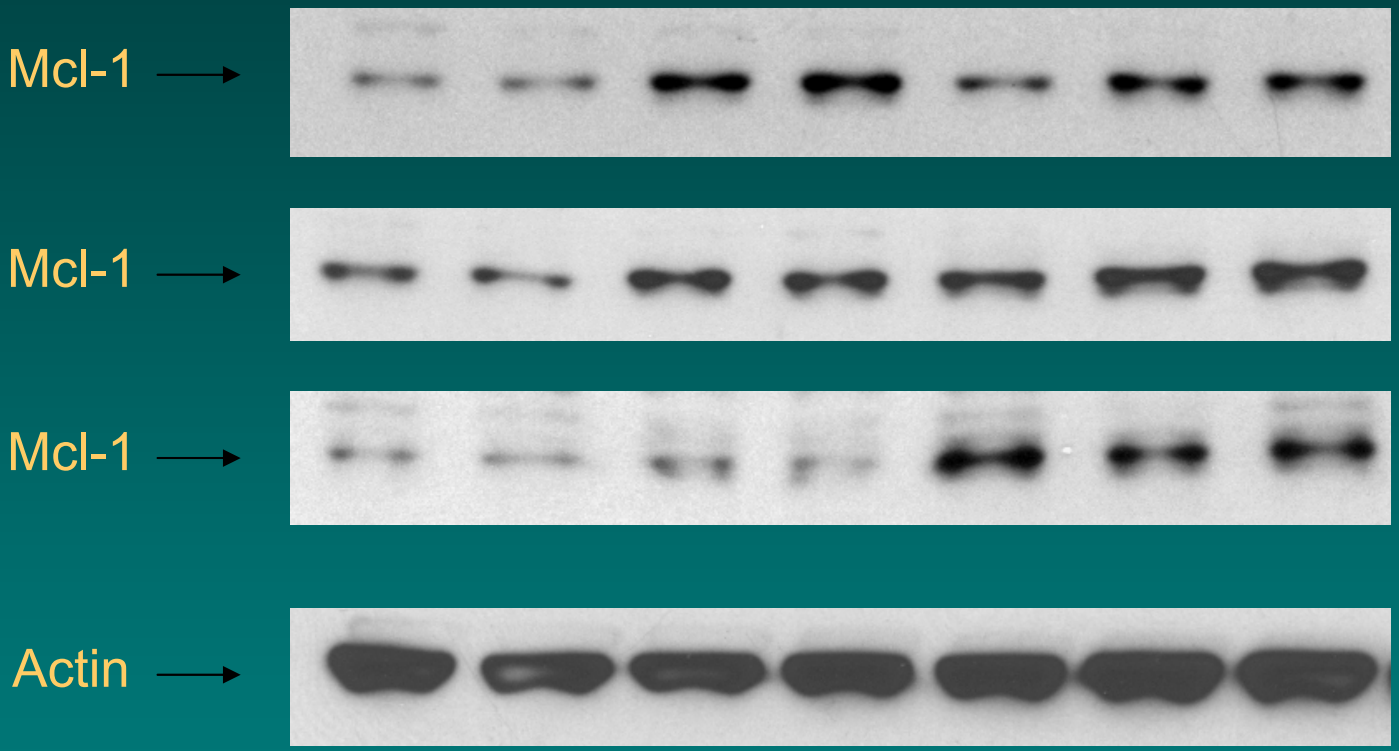
Laboratory of Cytokinetics

Exprese antiapoptického proteinu Mcl-1



Laboratory of Cytokinetics

Dynamic changes of Mcl-1 (HCT116 cells)



AA, DHA ↑

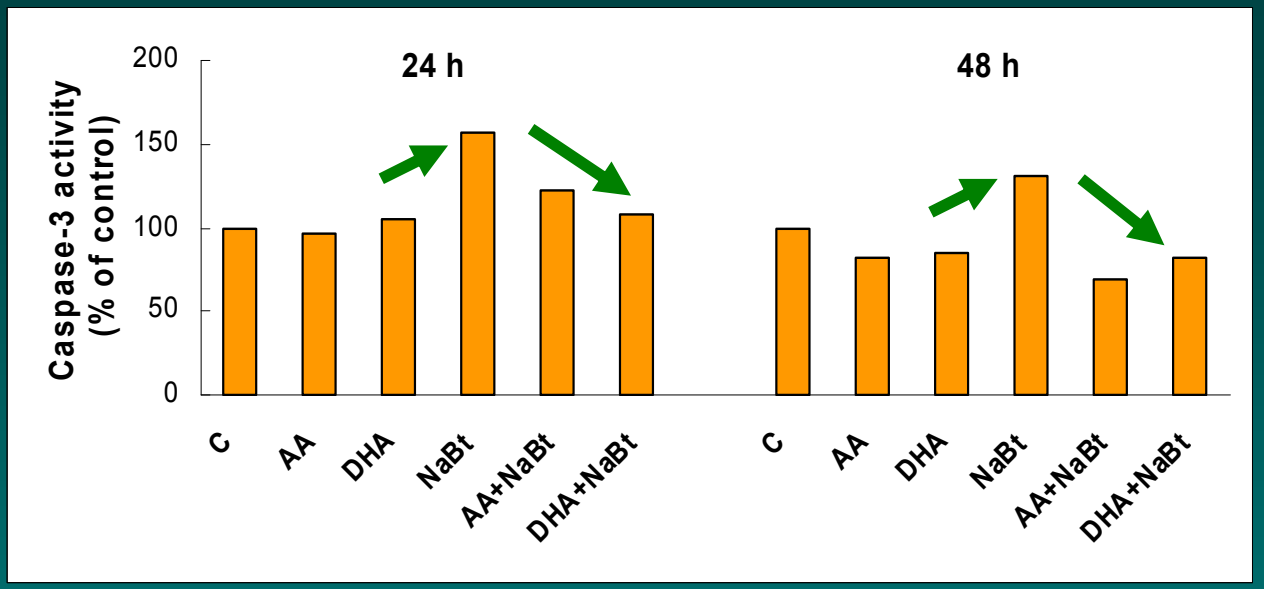
NaBt ↓

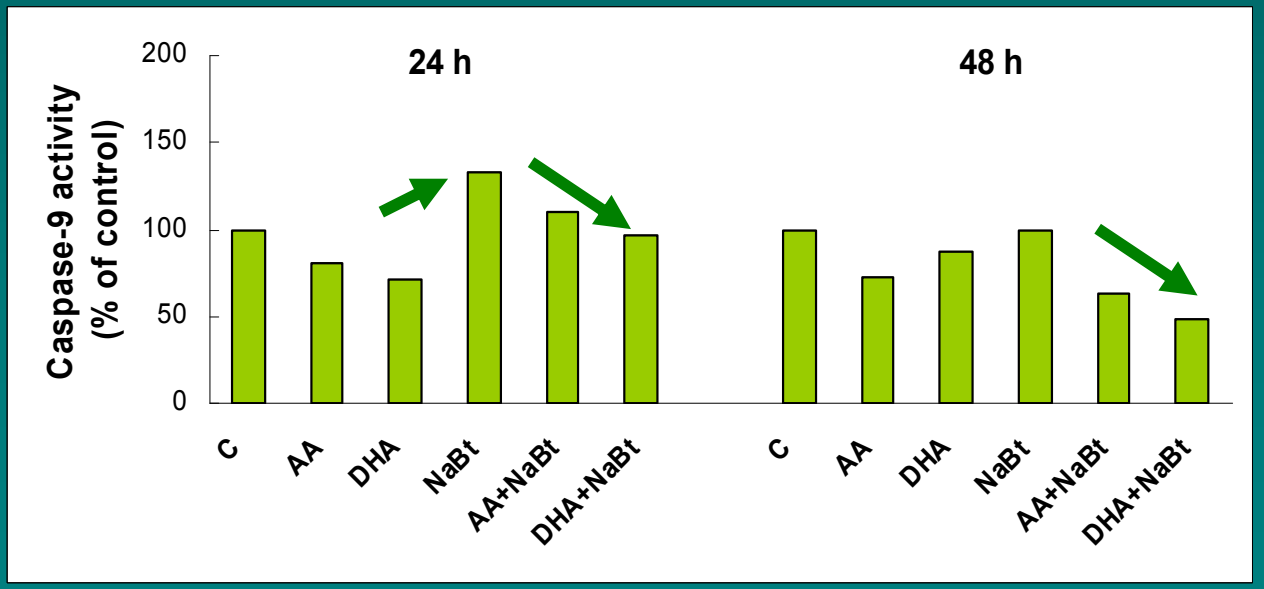
Mcl-1 = 40/42kDa

beta-actin = 40kDa

Aktivita kaspáz po působení AA, DHA,NaBt a jejich kombinace

HCT116

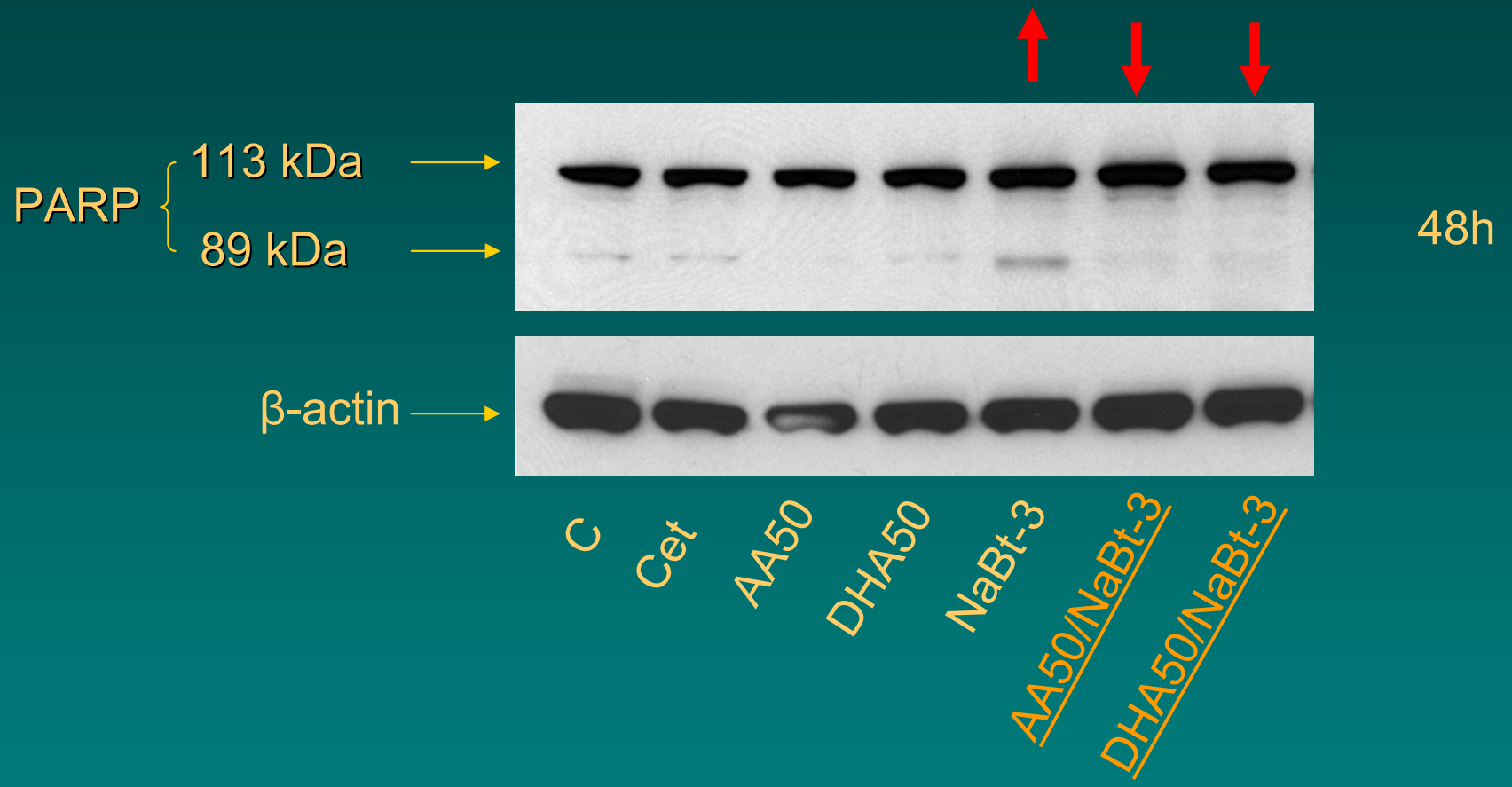




Intrinsic pathway

Laboratory of Cytokinetics

poly (ADP) ribose polymerase (PARP) cleavage



Laboratory of Cytokinetics

ÚČINKY ENDOGENNÍCH INDUKTORŮ APOPTÓZY
z rodiny cytokinů TNF
(tumor necrosis factor)

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Cytokiny rodiny TNF (tumor necrosis factor)

Ligand	Receptor
TNF-α	TNFR1, TNFR2
Fas ligand (FasL)	Fas (CD95, APO-1)
TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	DR4, DR5, DcR1, DcR2

Výzkum zaměřen na

► úlohu v regulaci buněčné smrti epiteliálních střevních buněk a

► příčiny rezistence nádorových buněk

Aplikace v nádorové terapii

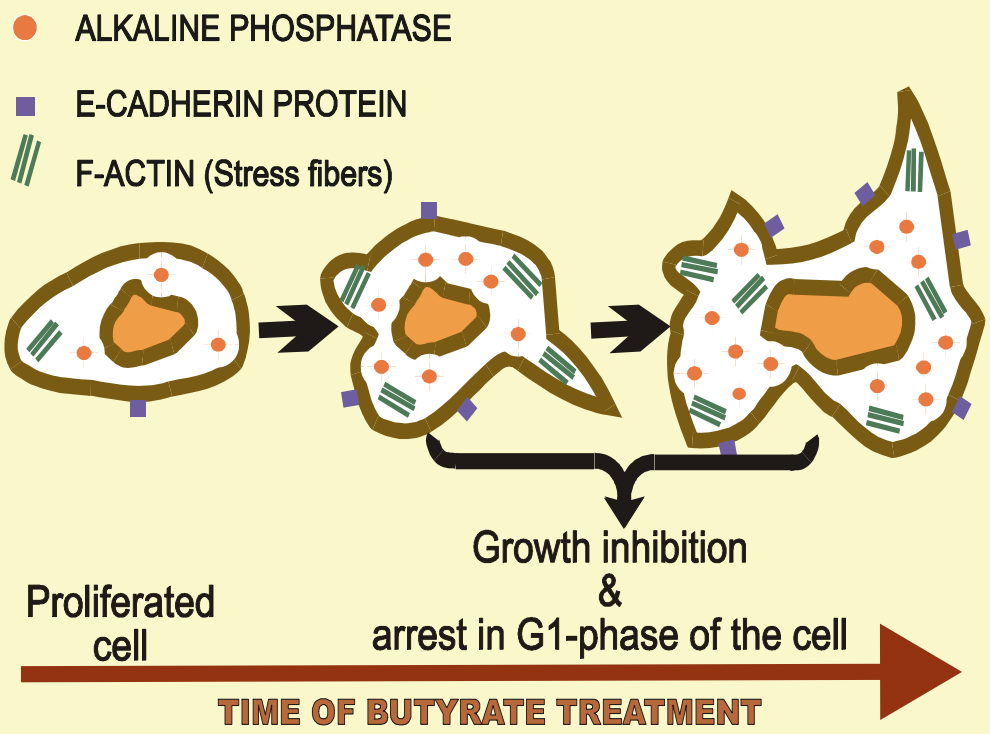
Zvýšení citlivosti buněk zásahy do signálních drah nebo kombinací s dalšími faktory

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

TNFα zvyšuje apoptózu buněk HT-29, ale potlačuje diferenciaci indukovanou NaBt u epiteliálních buněk tlustého střeva

• Butyrát vzniká ve střevě fermentací nestravitelné vlákniny
• Navozuje diferenciaci a následnou apoptózu epiteliálních buněk střeva

Znaky diferenciace střevních buněk



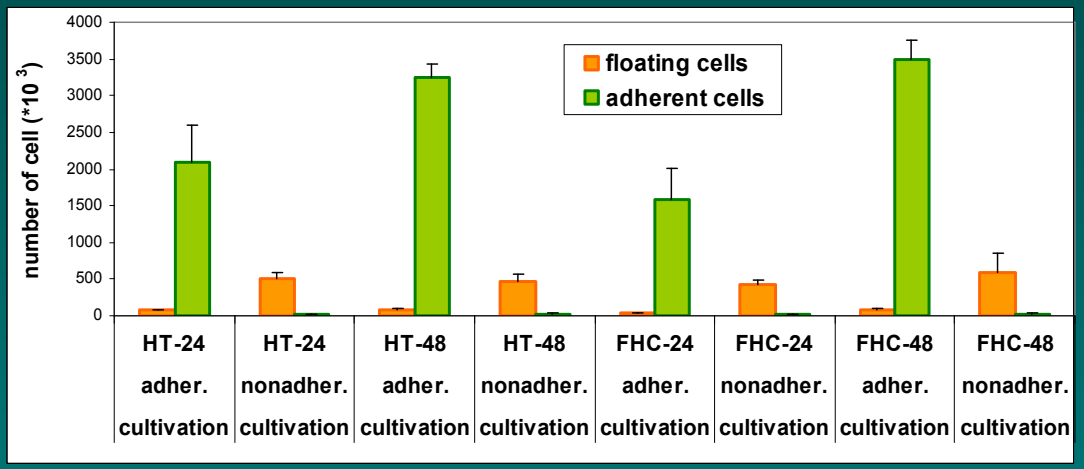
• TNF-α je v tlustém střevě dlouhodobě produkován během chronických zánětlivých onemocnění střeva (ulcerativní kolitida, Crohnova choroba apod.)
• Buňky nádorů tlustého střeva obsahují zvýšené množství TNF ve srovnání ze zdravou tkání

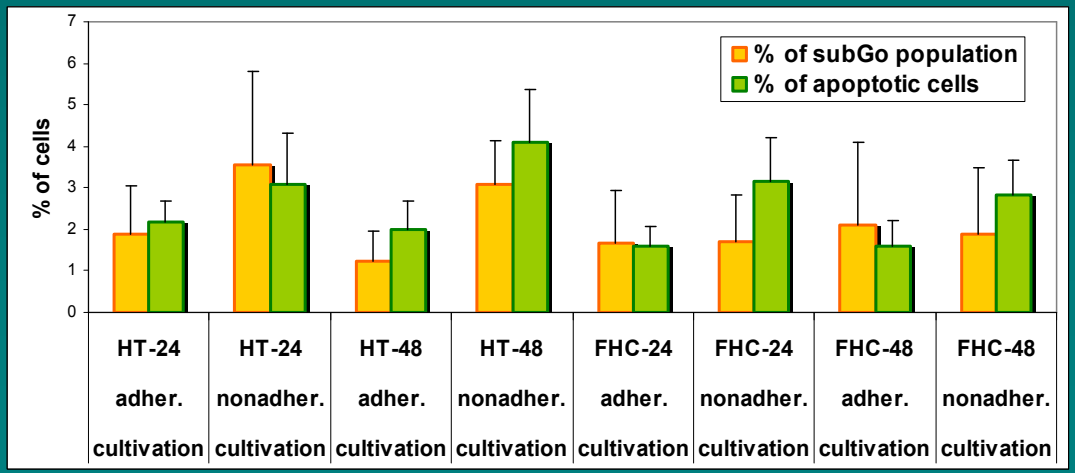
TNF-α posiluje apoptózu a potlačuje diferenciaci navozenou butyrátem u střevních nádorových buněčných linií HT-29 a CaCo-2 a u fetálních střevních buněk FHC

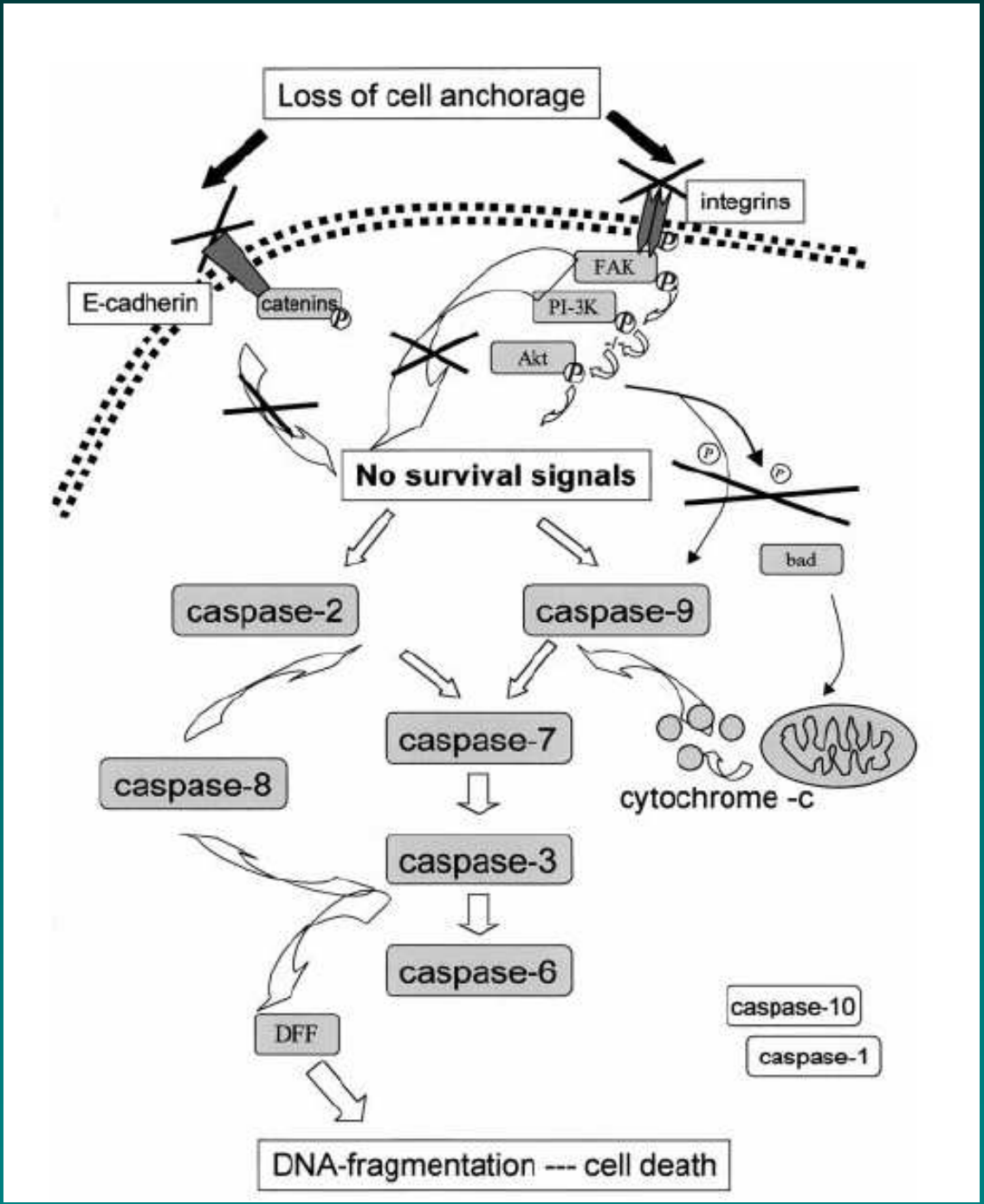
Indukce buněčné smrti a změny adhezívních vlastností epiteliálních buněk střeva během indukce anoikis

Pro indukci anoikis v podmínkách in vitro je používán model neadherentní kultivace buněk

- Anoikis představuje typ buněčné smrti, kterou umírají epiteliální buňky pokud dojde k narušení jejich kontaktu s extracelulární matrix.
- V tlustém střevě je anoikis navozena po uvolnění buněk v horních částech krypt, a funguje zde jako jeden z faktorů pro udržení rovnováhy mezi cytokinetickými procesy.
- Vznik rezistence buněk k anoikis představuje jeden z kritických momentů v karcinogenezi tlustého střeva.







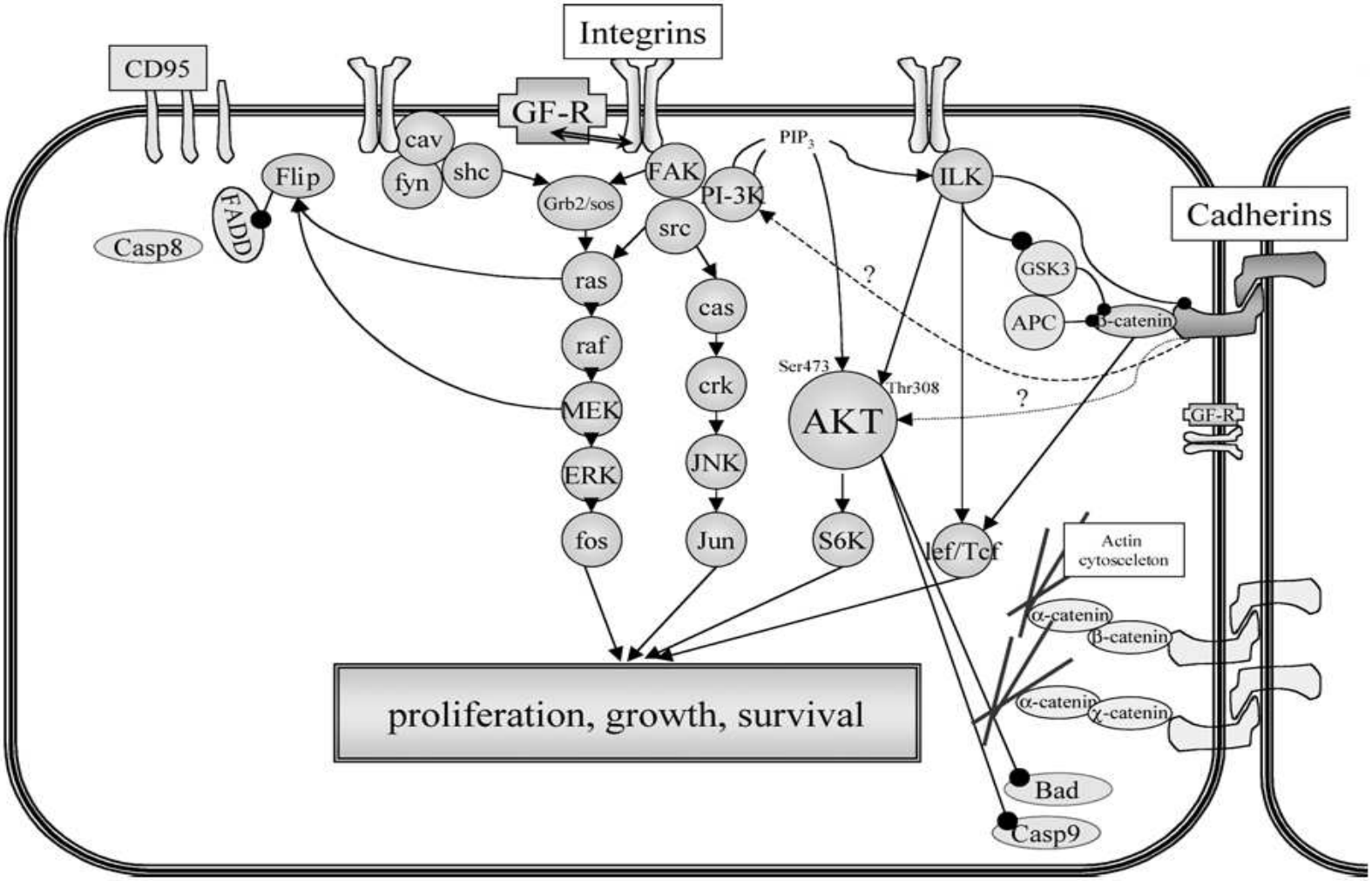
Signal transduction pathways associated with ANOIKIS

Laboratory of Cytokinetics

„Survival signalling pathways“ aktivované při kontaktu buňka-buňka a buňka - ECM

Figure 1. (a) Survival signaling pathways activated by cell-cell and cell-matrix anchorage. [Focal Adhesion-Kinase (FAK), Integrin-linked Kinase (ILK), caveolin (cav), phosphoinositide-3-OH kinase (PI-3K), phosphatidolinositide- (3,4,5) triphosphate 3 (PIP3), Protein kinase B (PKB/AKT), ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun-NH_2-terminal kinase (JNK) /mitogen activated protein kinase (MAPK), p70 ribosomal protein S6 kinase (S6K), lymphoid enhancer factor (LEF)/T-cell factor (TCF), Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), adenomatosis coli gene product (APC), caspase (Casp), growth-factor receptors (GF-R), FLICE-inhibitory protein (Flip), Fas-associated death domain protein (FADD)]. (b) Signal transduction following loss of cell anchorage leading to anoikis. [MAP/ERK Kinase Kinase 1 (MEKK-1), Caspase (casp), cytochrome c (cyt c), Fas-Ligand (Fas-L), FLICE-inhibitory protein (Flip), Fas-associated death domain protein (FADD), DNA fragmenting factor (DFF)].

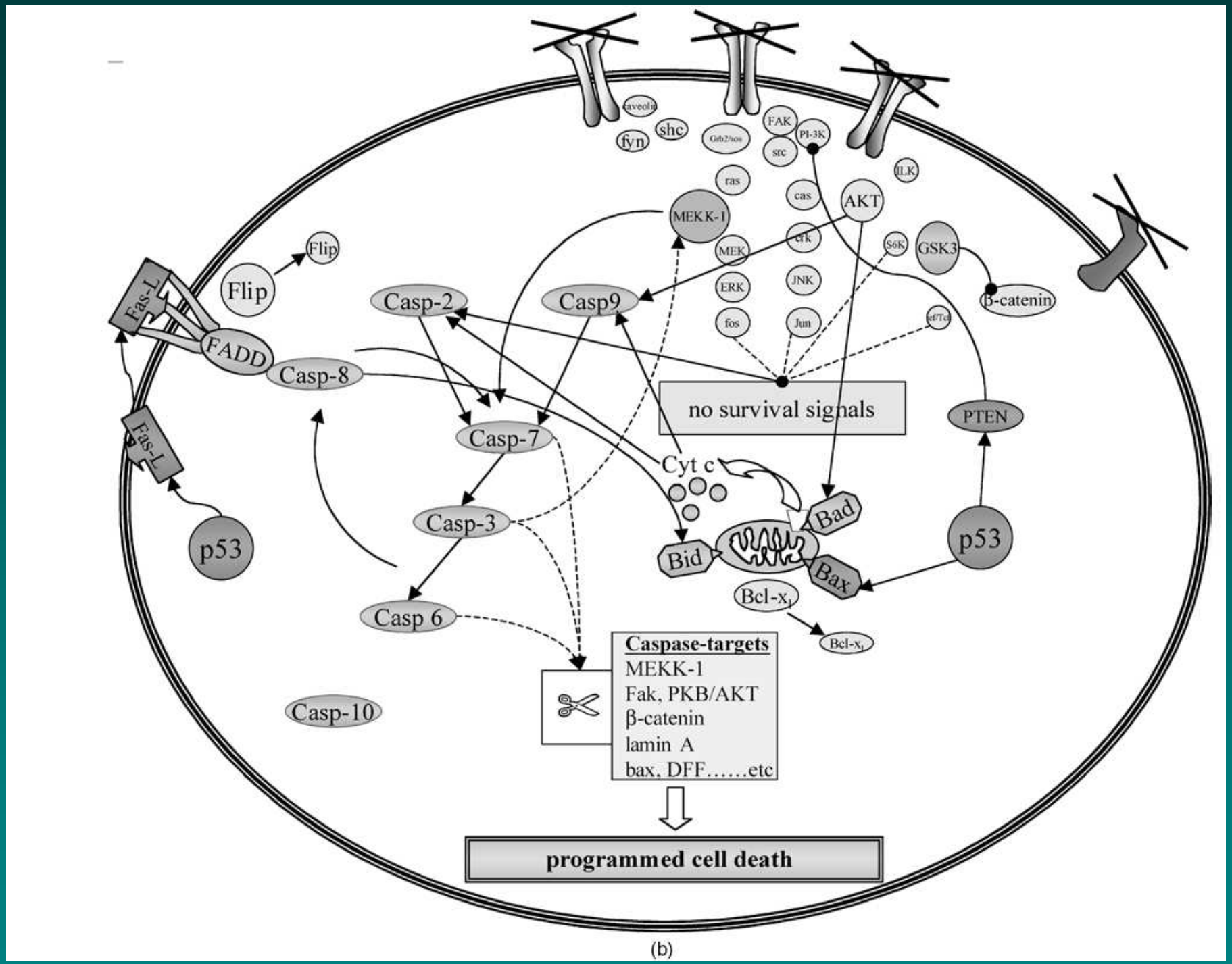
(*Continued on next page.*)



(a)

Grossmann J., Apoptosis 7, 2002

Přenos signálů po ztrátě kontaktu vedoucí k indukci anoikis

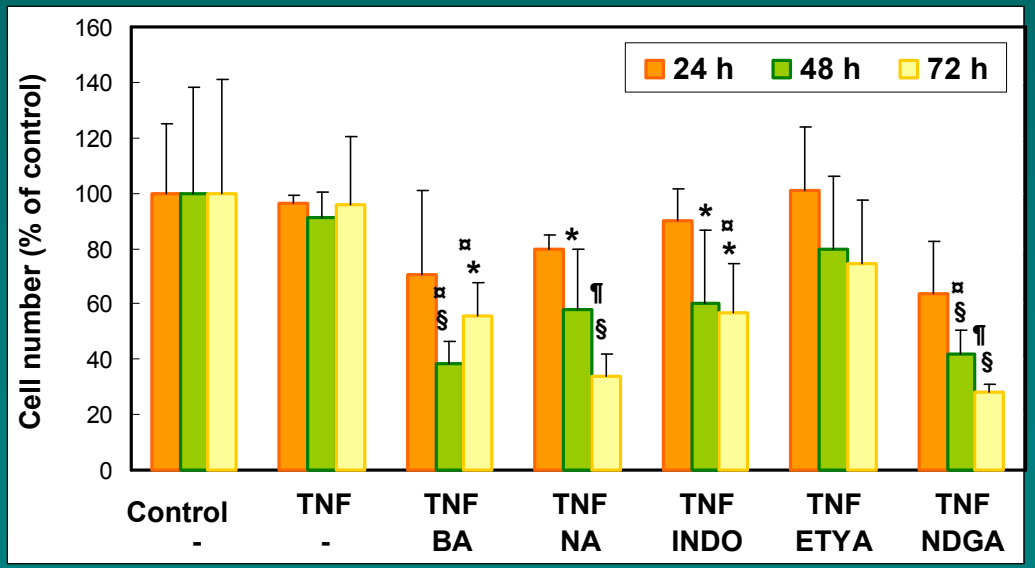


Inhibice metabolismu kyseliny arachidonové může ovlivnit citlivost epiteliálních buněk střeva k TNF-α

• Kyselina arachidonová (AA) může být v buňce metabolizována přes cyklooxygenázu (COX), lipoxygenázu (LOX) a cytochrom P450.
• Jednou z možností studia jednotlivých metabolických drah je použití inhibice příslušných enzymů:
• Baicalein (BA) – 12-LOX inhibitor
• NDGA - LOX inhibitor
• Niflumová kys. (NA) – COX inhibitor
• Indometacin (INDO) – COX inhibitor
• ETYA - kompetitor AA

Epiteliální buňky HT-29 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva jsou relativně rezistentní k působení TNF-α.

Inhibice metabolismu AA způsobuje jejich zcitlivění k účinkům tohoto cytokinu.



Laboratory of cytokinetics

INTERAKCE PROTEINŮ RODINY TNF S MASTNÝMI KYSELINAMI

Laboratoř cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

INTERAKCE TNF-α S BUTYRÁTEM

TNF-α posiluje apoptózu, ale potlačuje diferenciaci indukovanou NaBt u epiteliálních buněk tlustého střeva

PERGAMON

European Journal of Cancer 36 (2000) 1844–1852

European Journal of Cancer

www.ejconline.com

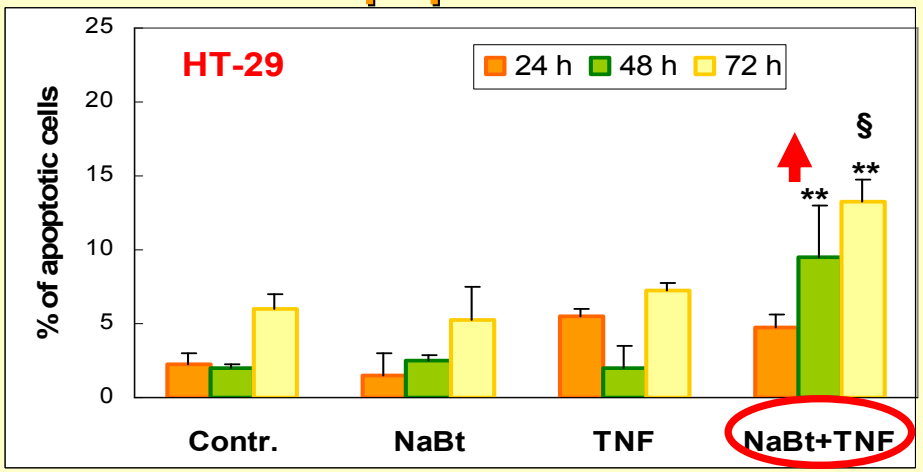
TNF-α modulates the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon adenocarcinoma cell line

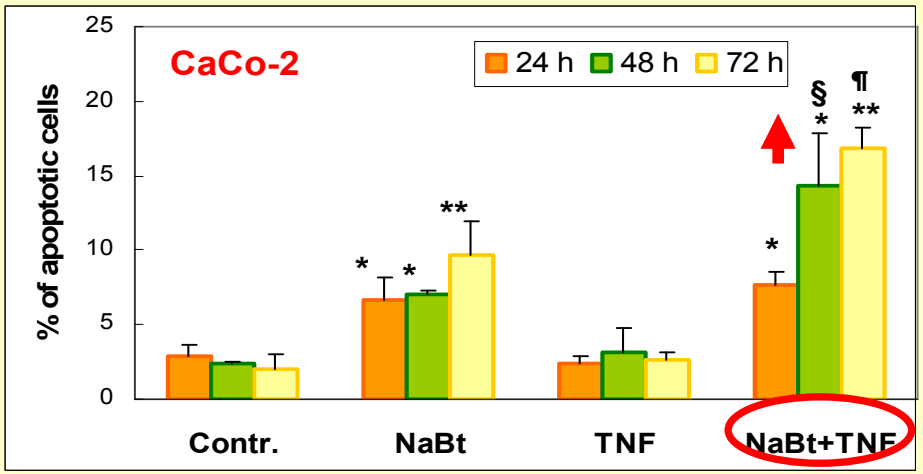
M. Kovaříková [a], J. Pacherník [a], J. Hofmanová [a], Z. Zadák [b], A. Kozubík [a,*]

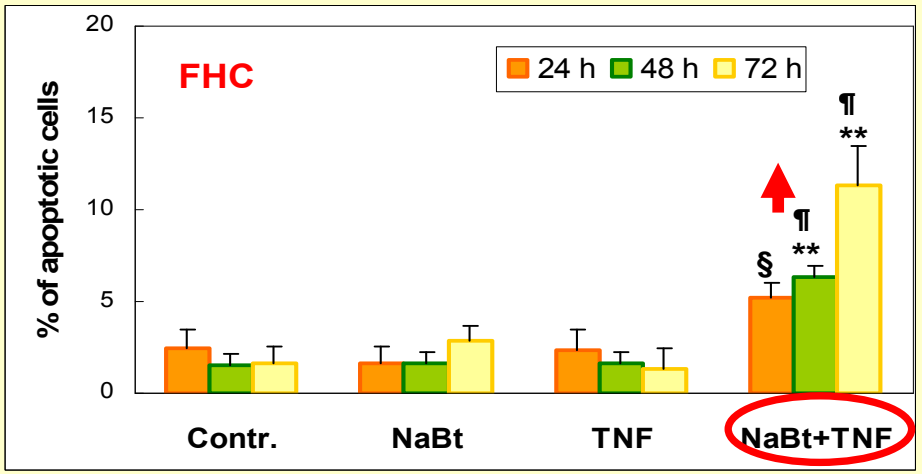
[a] *Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, CZ-612 65 Brno, Czech Republic*
[b] *Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University, Teaching Hospital, Hradec Králové, Czech Republic*

Laboratoř Cytokinetiky
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

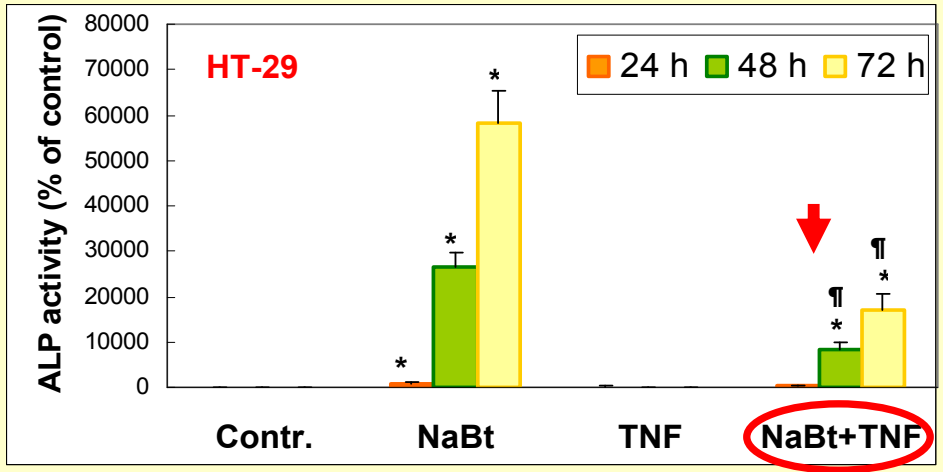
apoptóza

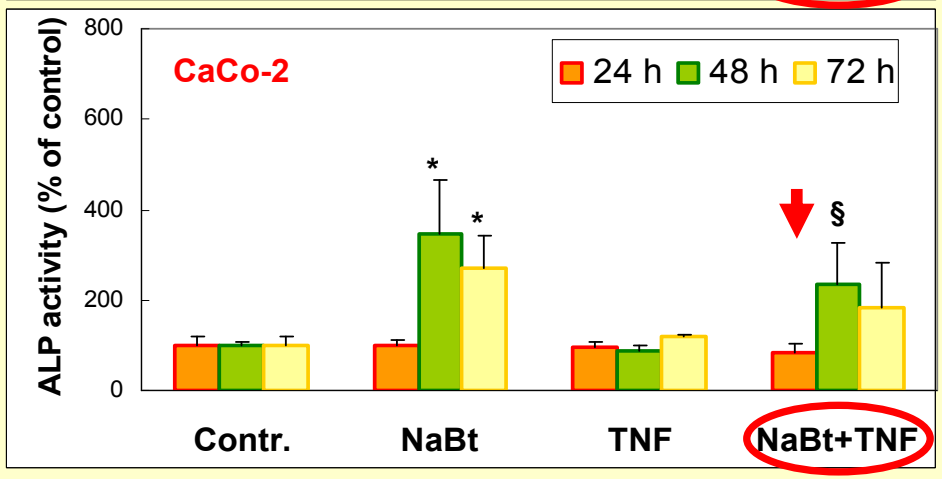


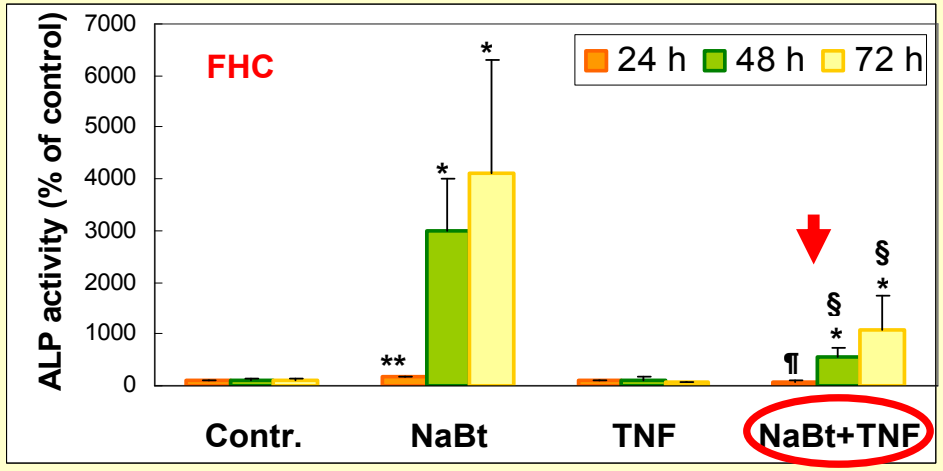




diferenciace







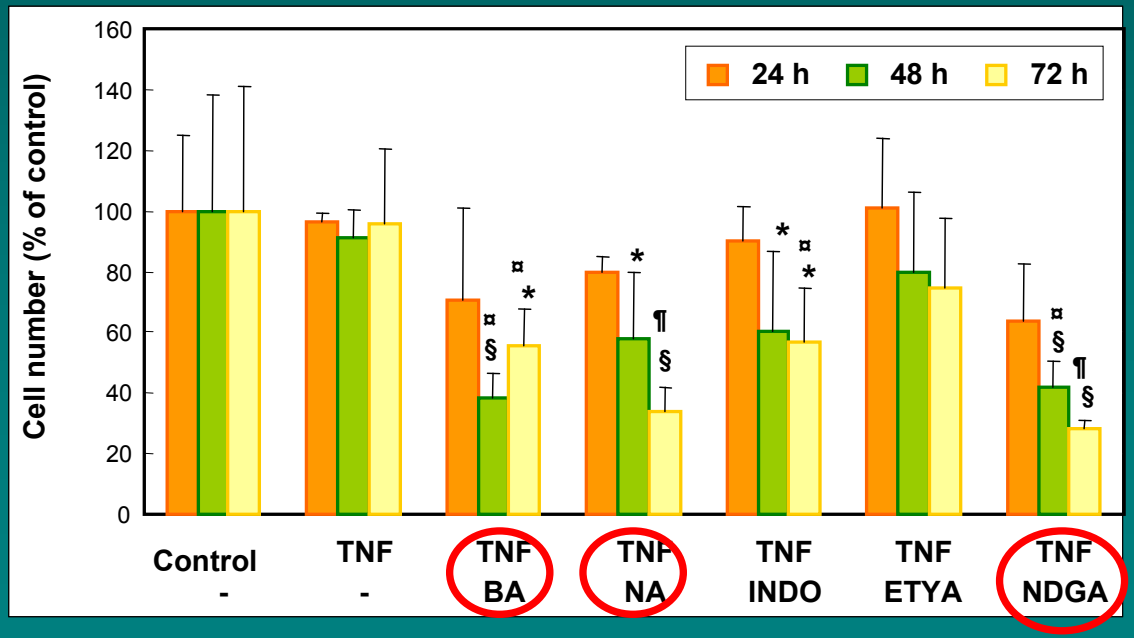
Citlivost nádorových buněk kolonu k TNF-α může být zvýšena inhibicí metabolismu kyseliny arachidonové a závisí na stupni diferenciace

Differentiation (2004) 72:23–31
© International Society of Differentiation 2004

ORIGINAL ARTICLE

Martina Kovaříková · Jiřina Hofmanová · Karel Souček · Alois Kozubík

The effects of TNF-α and inhibitors of arachidonic acid metabolism on human colon HT-29 cells depend on differentiation status



- Baicalein (BA) – 12-LOX inhibitor
- NDGA - LOX inhibitor
- Niflumová kys. (NA) – COX inhibitor
- Indometacin (INDO) – COX inhibitor
- ETYA - kompetitor AA

Laboratory of cytokinetics

Navozením diferenciace (působením NaBt) se buňky stávají citlivější k antiproliferačním a apoptickým účinkům TNFα a inhibitorů metabolismu AA

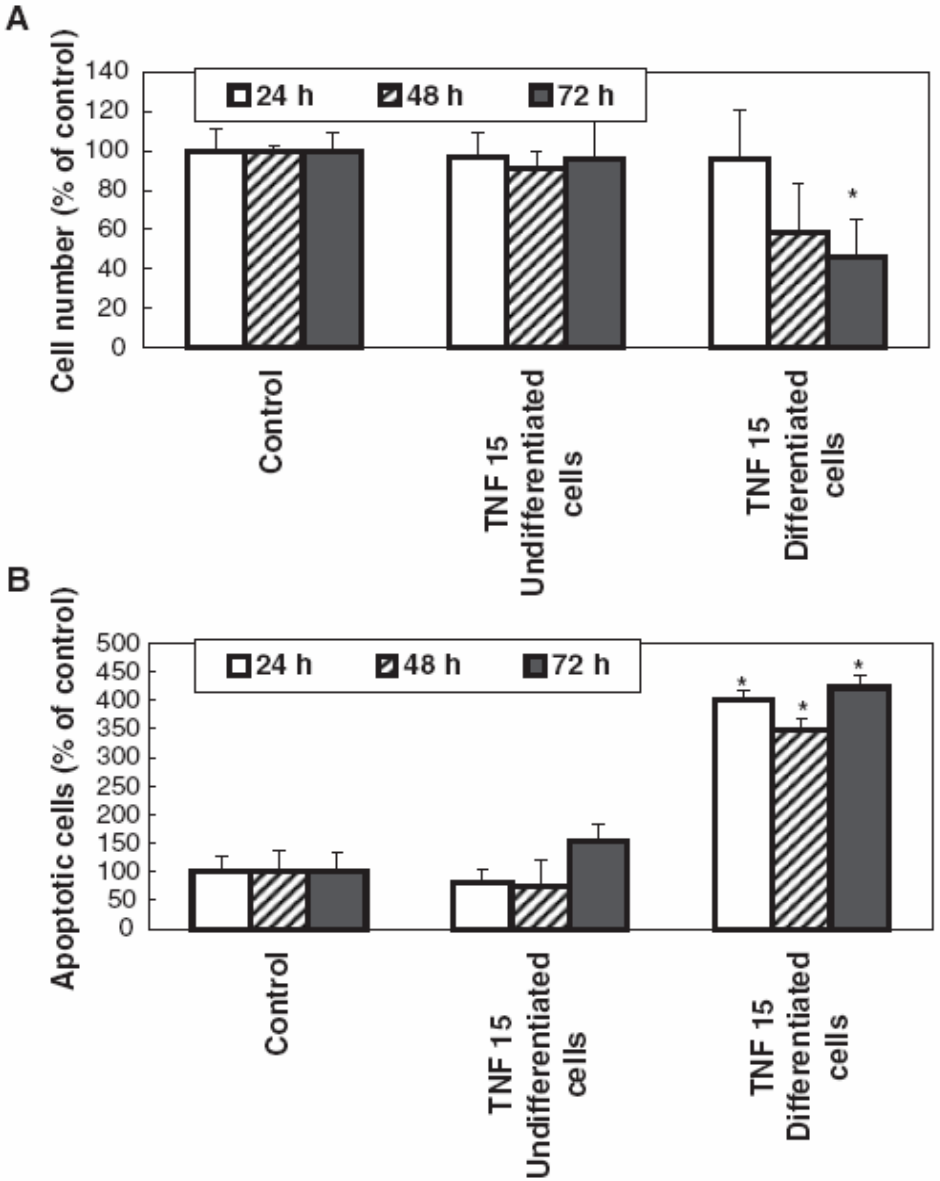


Fig. 2 Cell number (**A**) and apoptosis (**B**) (measured by fluorescence microscopy after DAPI staining) of undifferentiated and NaBt-differentiated HT-29 cells treated for 24, 48, or 72 hr (h) with TNF-α (15 ng/ml; TNF 15). $^{*}P<0.05$ versus TNF-α-untreated controls (considered as 100%).

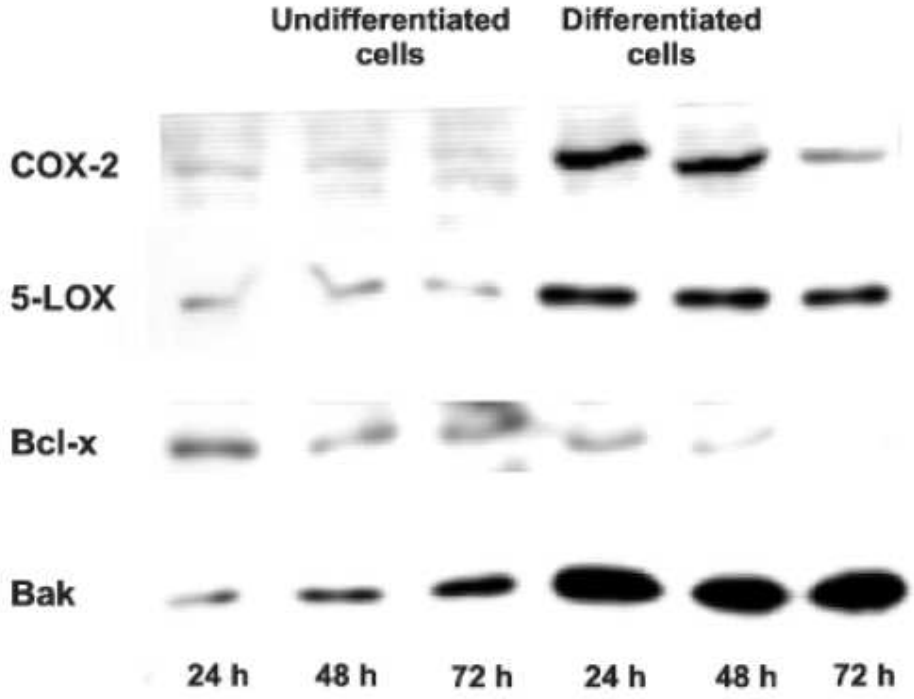


Fig. 1 Expression of COX-2, 5-LOX, Bcl-x, and Bak proteins in undifferentiated and NaBt-differentiated HT-29 cells cultivated for 24, 48, or 72 hr (h).

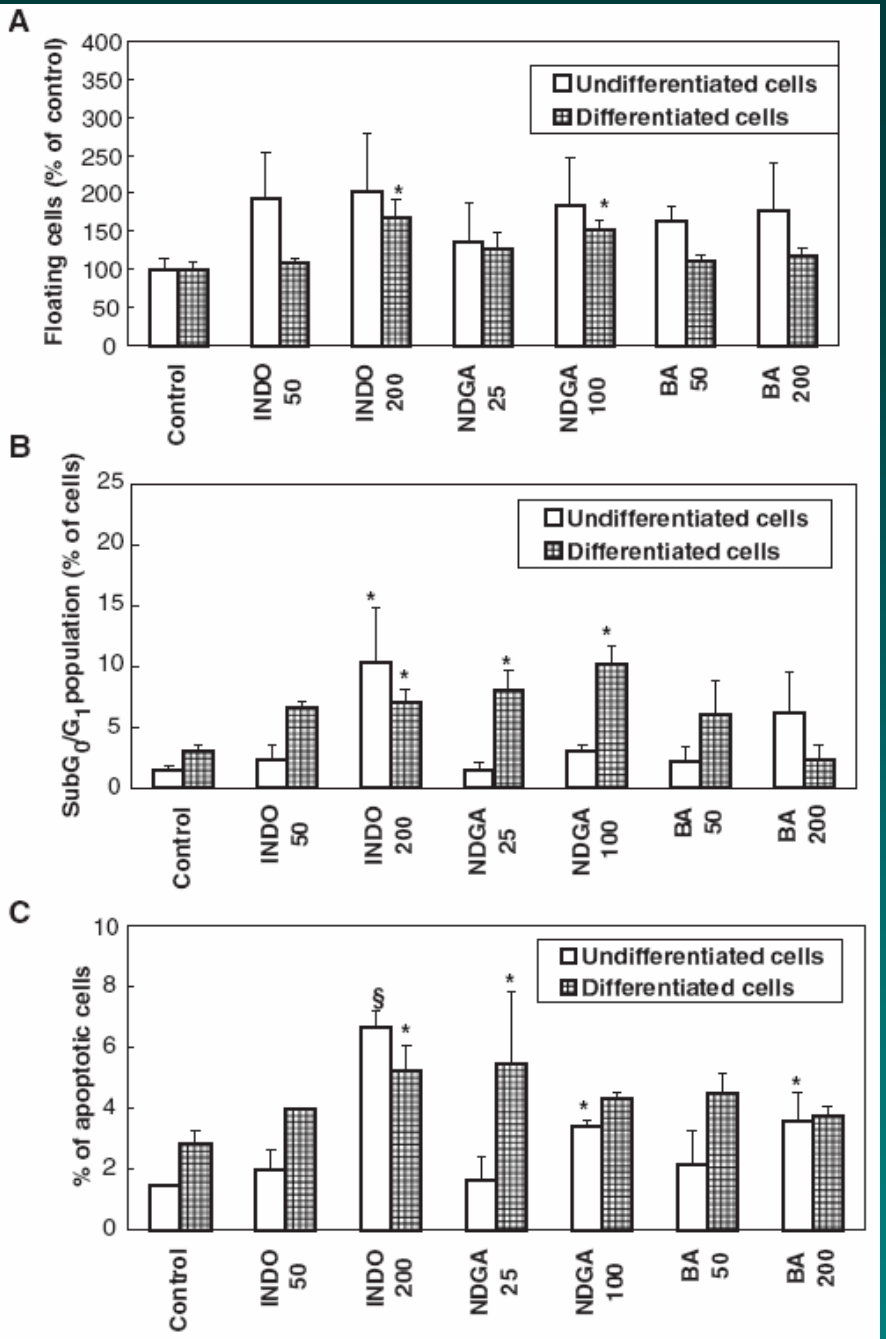


Fig. 4 Quantification of floating cells (**A**), sub-G_0/G_1 population (**B**), and morphologically detected apoptosis (**C**) in undifferentiated or NaBt-differentiated HT-29 cells treated for 48 hr with INDO (50 or 200 μM), NDGA (25 or 100 μM), or BA (50 or 200 μM). $^*P<0.05$ (§ $P<0.001$) versus inhibitor-untreated controls (considered as 100%).

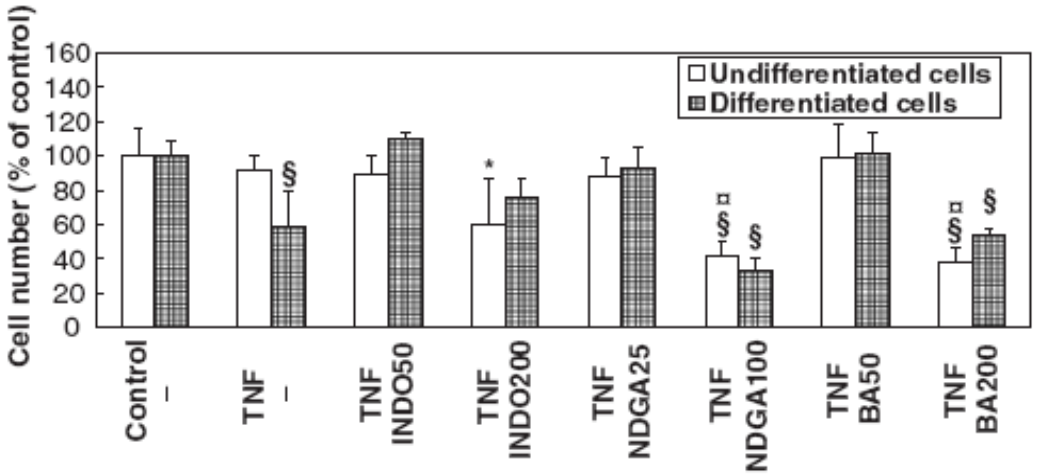


Fig. 5 Cell number of undifferentiated and NaBt-differentiated HT-29 cells treated for 48 hr with TNF-α (TNF; 15 ng/ml) or its combinations with INDO (50 or 200 μM), NDGA (25 or 100 μM), or BA (50 or 200 μM). $^*P<0.05$ (§ $P<0.001$) versus inhibitor- and TNF-α-untreated controls; ¤ $P<0.05$ versus TNF-α treatment.

Laboratory of Cytokinetics

AA a DHA zcitlivují nádorové buňky kolonu k působení apoptických induktorů rodiny TNF

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Cancer Letters 229 (2005) 43–48

CANCER Letters

www.elsevier.com/locate/canlet

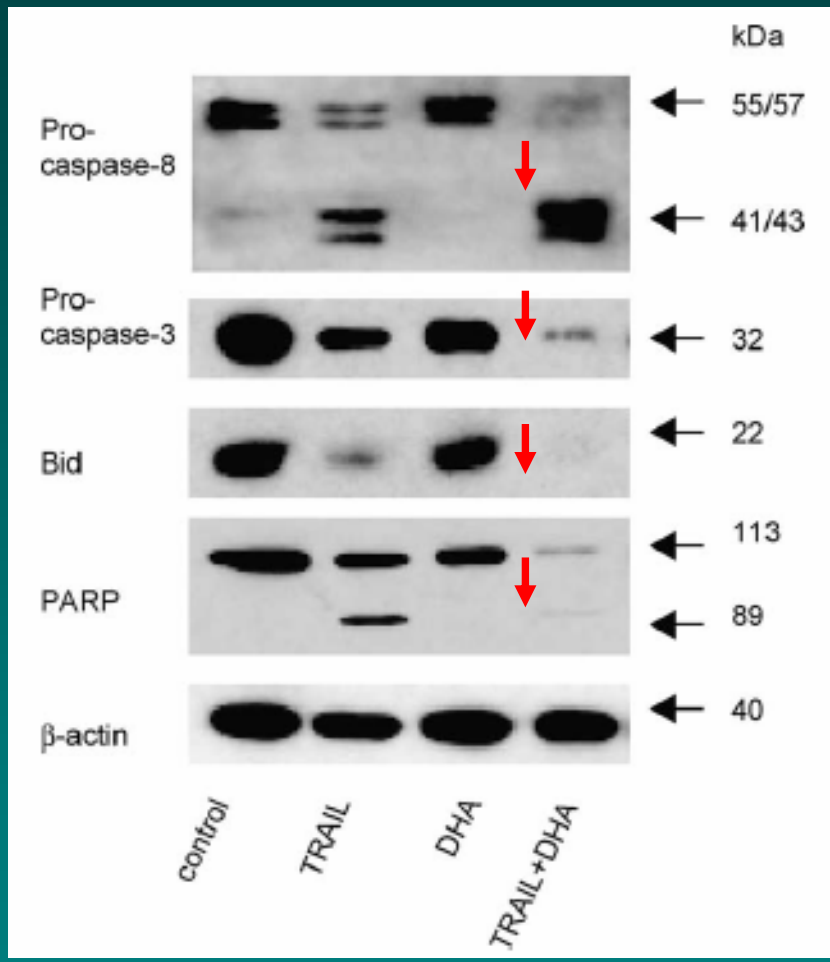
TRAIL and docosahexaenoic acid cooperate to induce HT-29 colon cancer cell death

Alena Vaculová[a], Jiřina Hofmanová[a], Ladislav Anděra[b], Alois Kozubík[a,*]

[a]*Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic*

[b]*Laboratory of Cell Signalling and Apoptosis, Institute of Molecular Genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic*

Received 6 November 2004; received in revised form 10 December 2004; accepted 13 December 2004



Laboratory of Cytokinetics

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Cancer Letters 218 (2005) 33–41
CANCER Letters
www.elsevier.com/locate/canlet

Polyunsaturated fatty acids sensitize human colon adenocarcinoma HT-29 cells to death receptor-mediated apoptosis

Jiøina Hofmanová*, Alena Vaculová, Alois Kozubík

Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

Received 15 June 2004; received in revised form 26 July 2004; accepted 29 July 2004

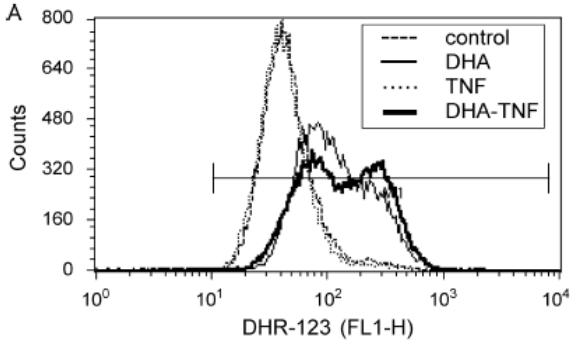


Fig. 4. Production of reactive oxygen species (ROS) in HT-29 cells non-pretreated or pretreated for 48 h with 20 μM of docosahexaenoic (DHA) acid and then incubated for 24 h in PUFA-free medium without or with TNF-α (30 ng/ml, panel A) or anti-Fas (200 ng/ml, panel B). ROS were measured by FCM as dihydrorhodamine-123 (DHR-123) fluorescence (FL1-H). The figure is a representative result of three independent experiments.

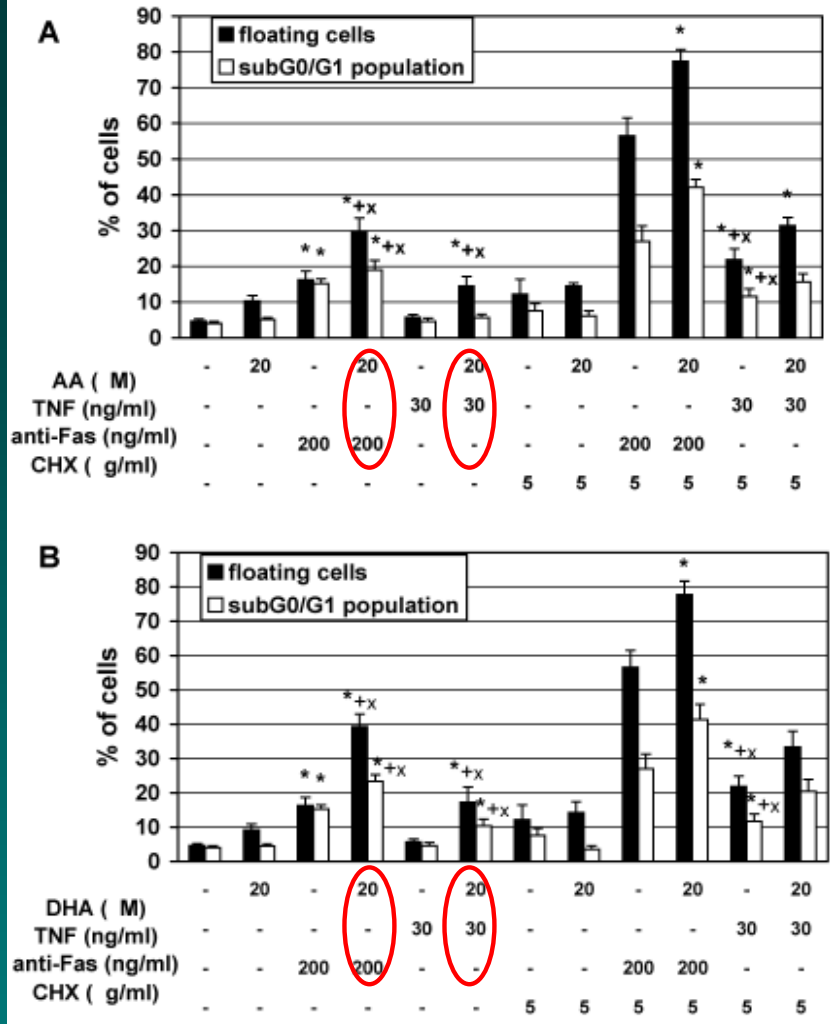
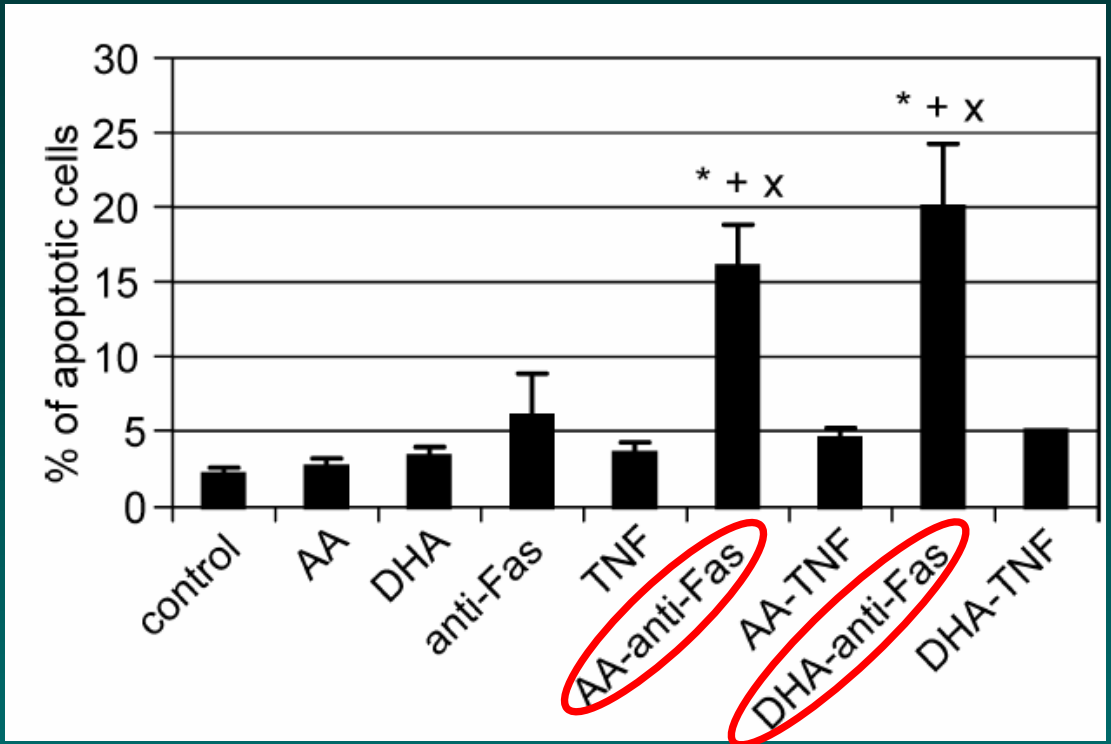


Fig. 2. The percentage of floating cells and subG0/G1 population of HT-29 cells non-pretreated or pretreated for 48 h with arachidonic (AA; panel A) or docosahexaenoic (DHA; panel B) acid and then incubated for 24 h in PUFA-free medium without or with TNF-α or anti-Fas. Experiments with cycloheximide (CHX) added to the cells for the last 27 h are presented in the right parts of panels. The values are means + SEM; $n=4$; statistical significance: $P<0.05$ (*) compared to non-treated control; (+) compared to TNF-α or anti-Fas and/or (×) to AA or DHA as single factors.



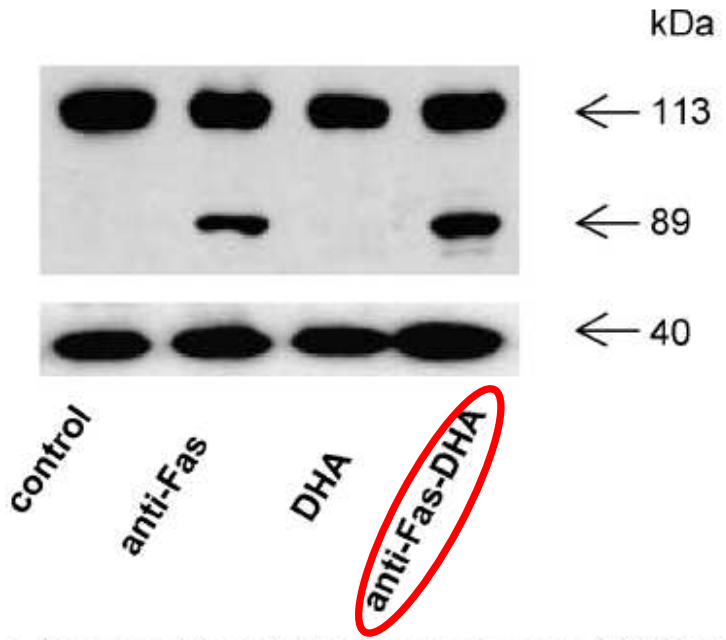


Fig. 5. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) to its 89 kDa fragment detected by Western blotting. An equal was verified using β-actin (40 kDa) antibody. HT-29 cells were non-pretreated or pretreated for 48 h with 20 μM of docosahexaenoic (DHA) acid and then incubated for 24 h in PUFA-free medium without or with anti-Fas (200 ng/ml). The figure is a representative result of three independent experiments.

Laboratory of Cytokinetics