

**Úloha mastných kyselin a
endogenních regulátorů apoptózy
v modulaci smrti nádorových
buněk tlustého střeva**

Přednáška 29.11.2005

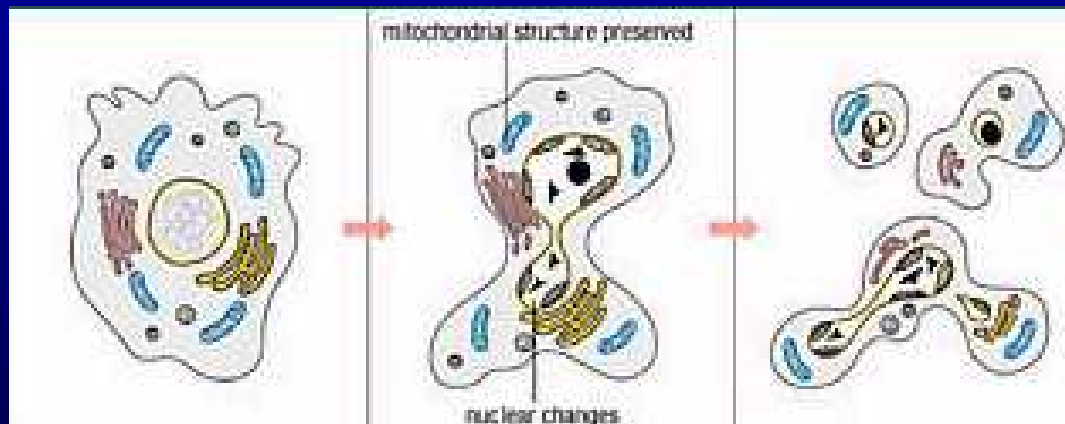
RNDr. Alena Vaculová, Ph.D.

**Laboratoř
cytokinety**

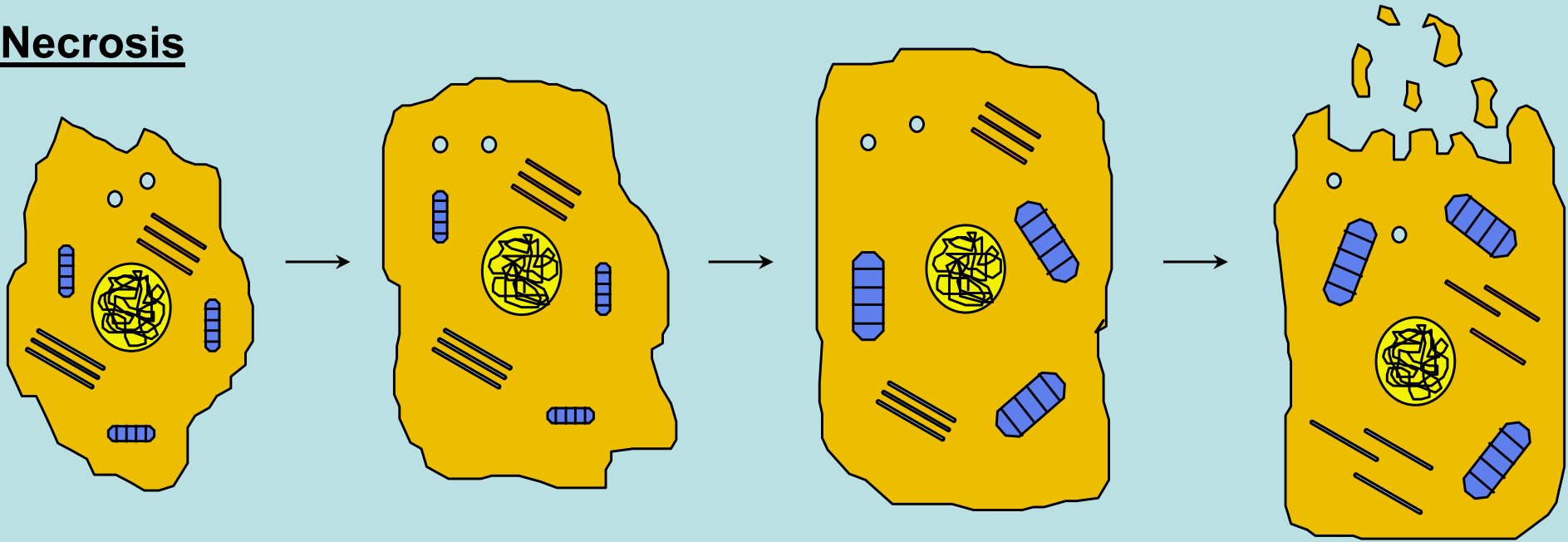
Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

APOPTÓZA – programovaná buněčná smrt:

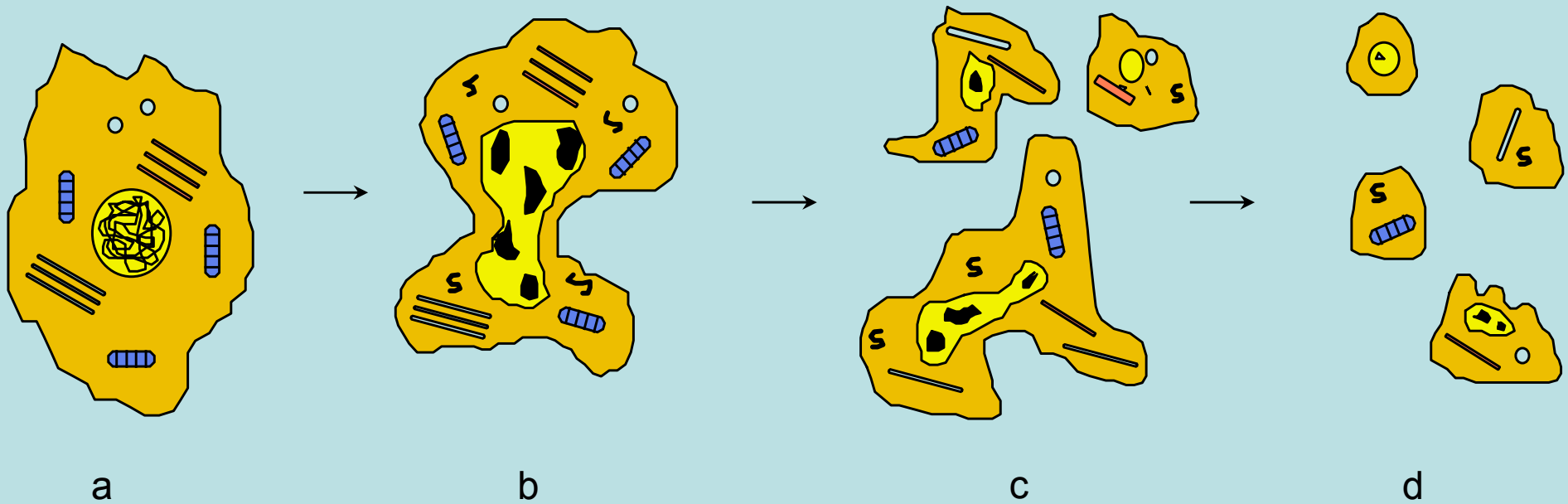
- bobtnání cytoplazmatické membrány
- kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu
- tvorba „apoptotických bodies“
- účast specifických molekul - kaspázy, nekaspázové proteázy, endonukleázy, ATP
- nevyvolává zánětlivé reakce



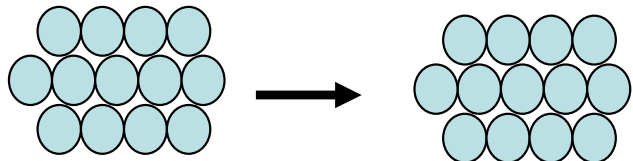
Necrosis



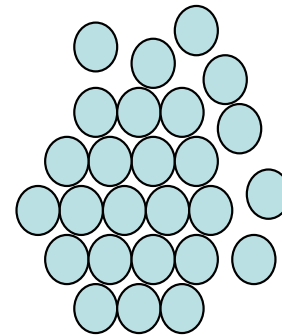
Apoptosis



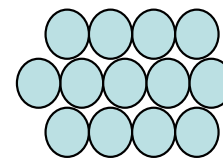
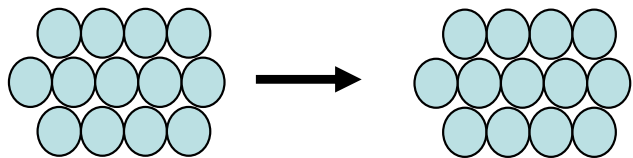
proliferace



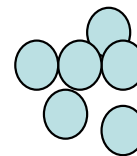
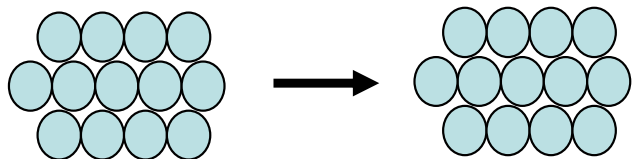
apoptóza



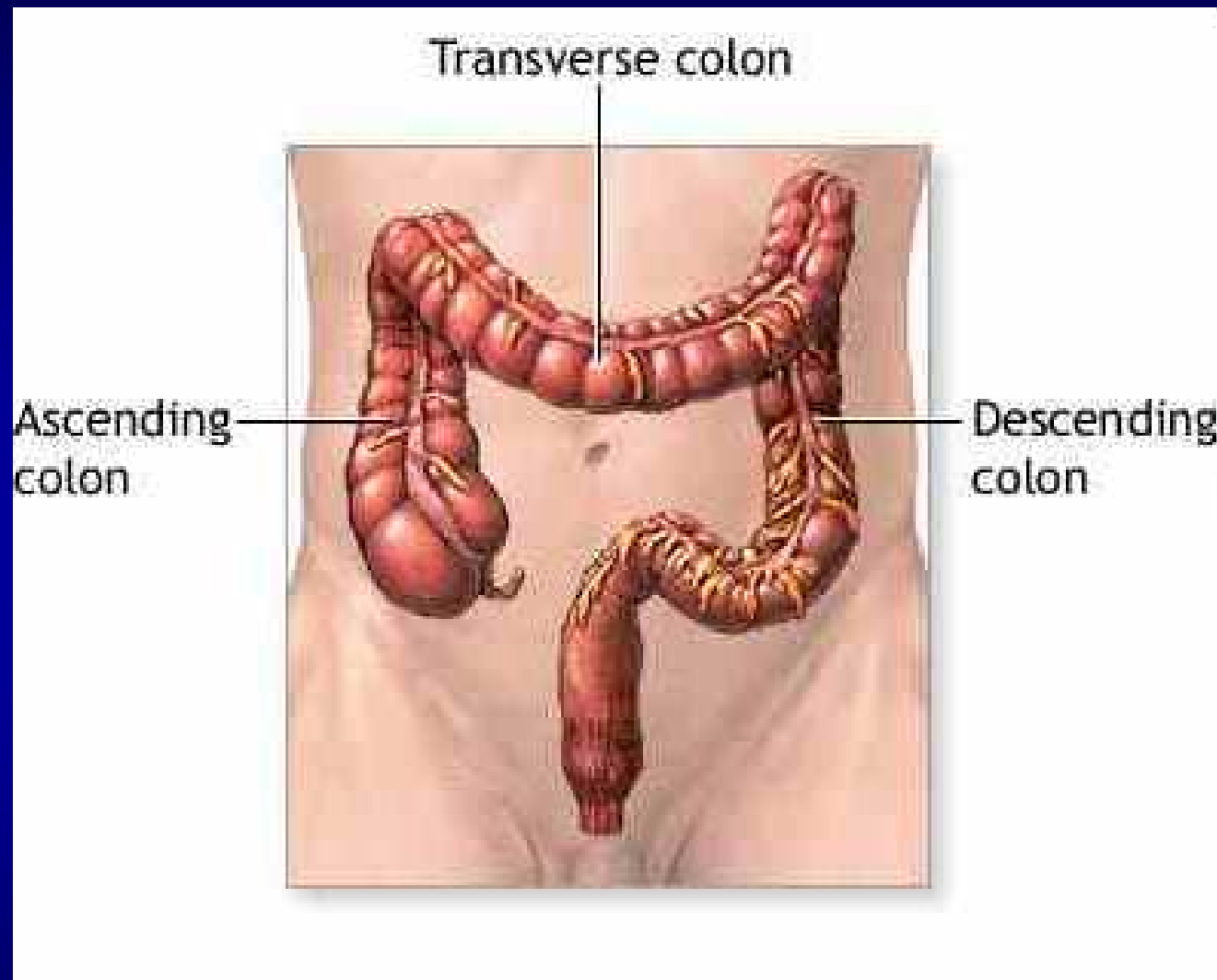
**Rakovina
AIO**



homeostáza



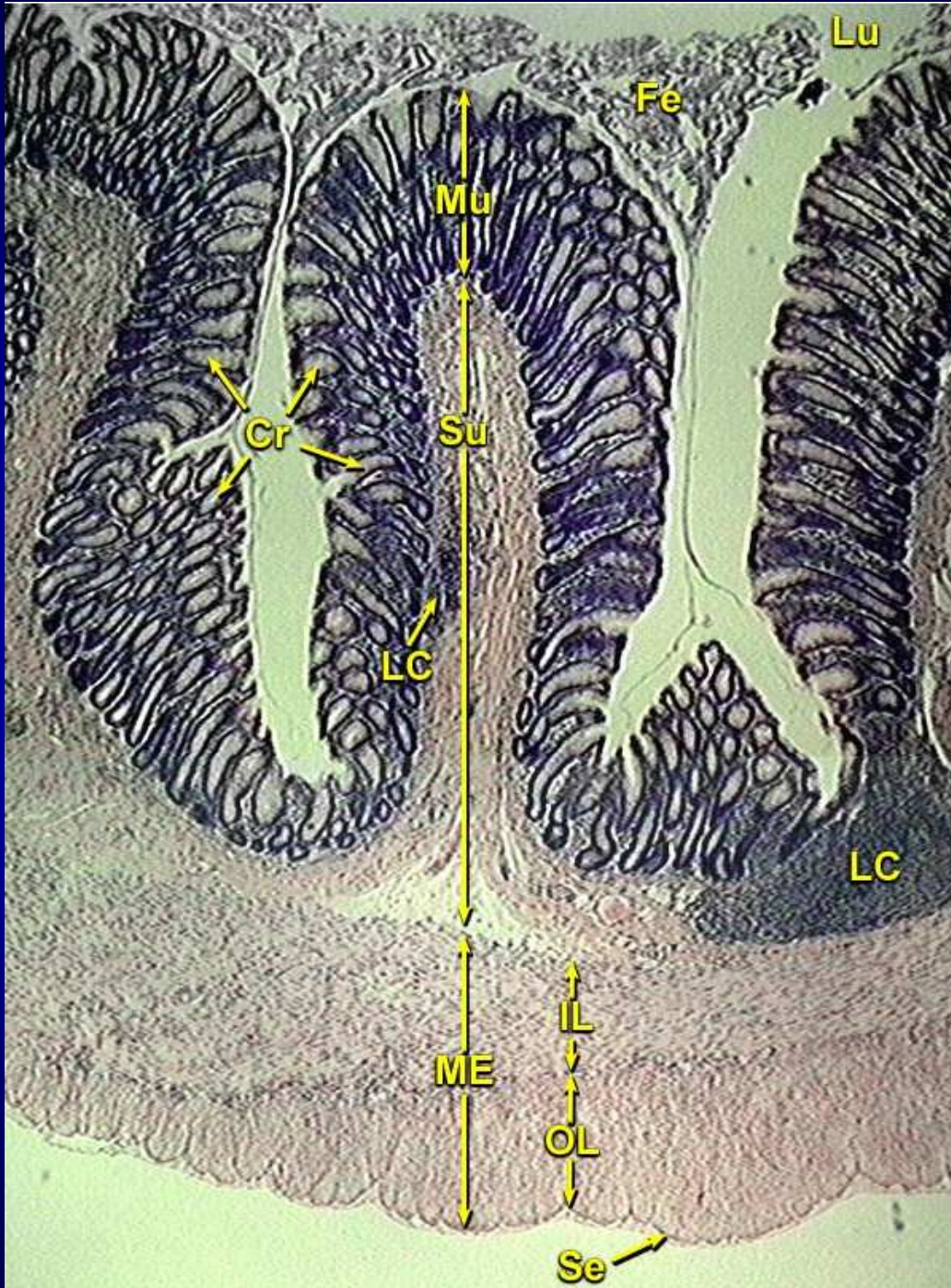
**AIDS
neurodegenerativní
onemocnění**



Tlusté střevo

+ HT-29

Krypta kolonu

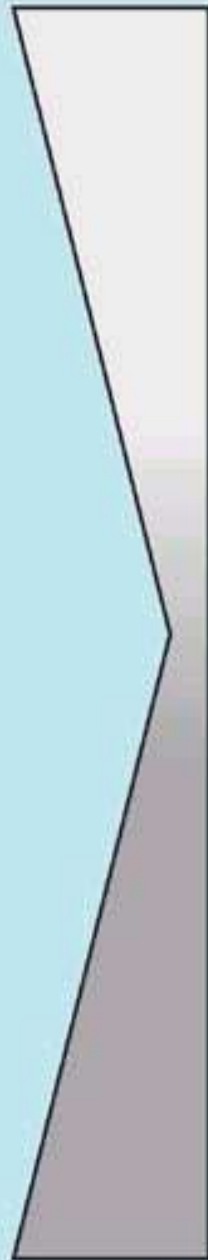


This low magnification view of the colon shows:

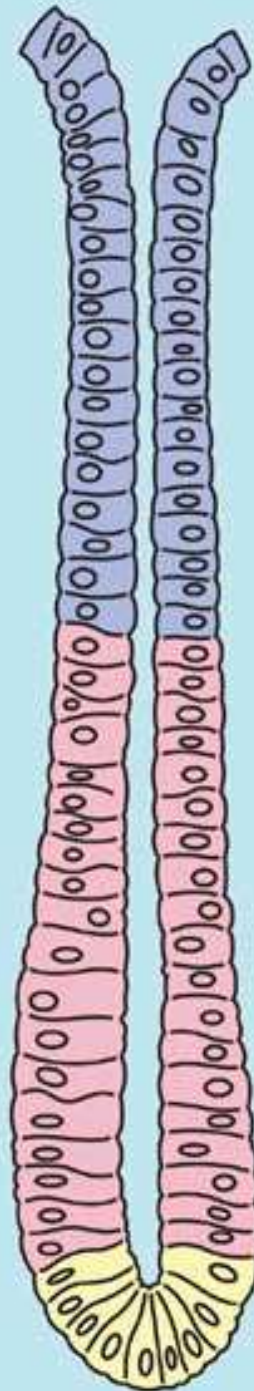
- 1) the **lumen** (Lu), containing fecal matter (Fe);
- 2) the **mucosa** (Mu), containing **crypts of Lieberkuhn** (Cr);
- 3) the **submucosa** (Su) containing **lymphoid cells** (LC);
- 4) the **muscularis externa** (ME) consisting of an inner layer (IL) and an outer layer (OL) of smooth muscle
- 5) the **serosa** (Se), consisting of a single layer of mesothelial cells, which covers the outer surface of the colon. The folding of the submucosa is normal for an empty colon.

Stain = H&E

DIFFERENTIATION



PROLIFERATION



- Fully differentiated terminal cells
- Proliferating/differentiating cells
- Stem cells



REPLICATION STAGES

Rakovina tlustého střeva

Nerovnováha mezi buněčnou proliferací, diferenciací a apoptózou – porušení homeostázy tkáně – podmínky pro rozvoj nádorového onemocnění - kolorektální karcinom

vyvíjí se pomalu – nejprve benigní polypy – pak akumulace mutací (díky vysoké míře proliferace) a maligní zvrát

počáteční stádia – dobře léčitelná (chirurgie, v raných fázích jedno z nejlépe léčitelných nádorových onemocnění)

polovina nádorů CRC však zjištěna až v pokročilém stádiu (nedostatečný screening)

vysoká incidence CRC v ČR – přední místo ve statistikách, neustálý alarmující nárůst

možnost významně ovlivnit vývoj onemocnění složením výživy

obrovský význam prevence!

Ovlivnění procesů proliferace, diferenciace a apoptózy ve střevě:

Exogenní faktory – látky přijímané v potravě – lipidové složky výživy (PUFAs)

Endogenní faktory – členové proteinové rodiny TNF (TNF- α , FasL, TRAIL)

Možné interakce ve střevě?

Význam těchto interakcí?

TNF- α , FasL, TRAIL

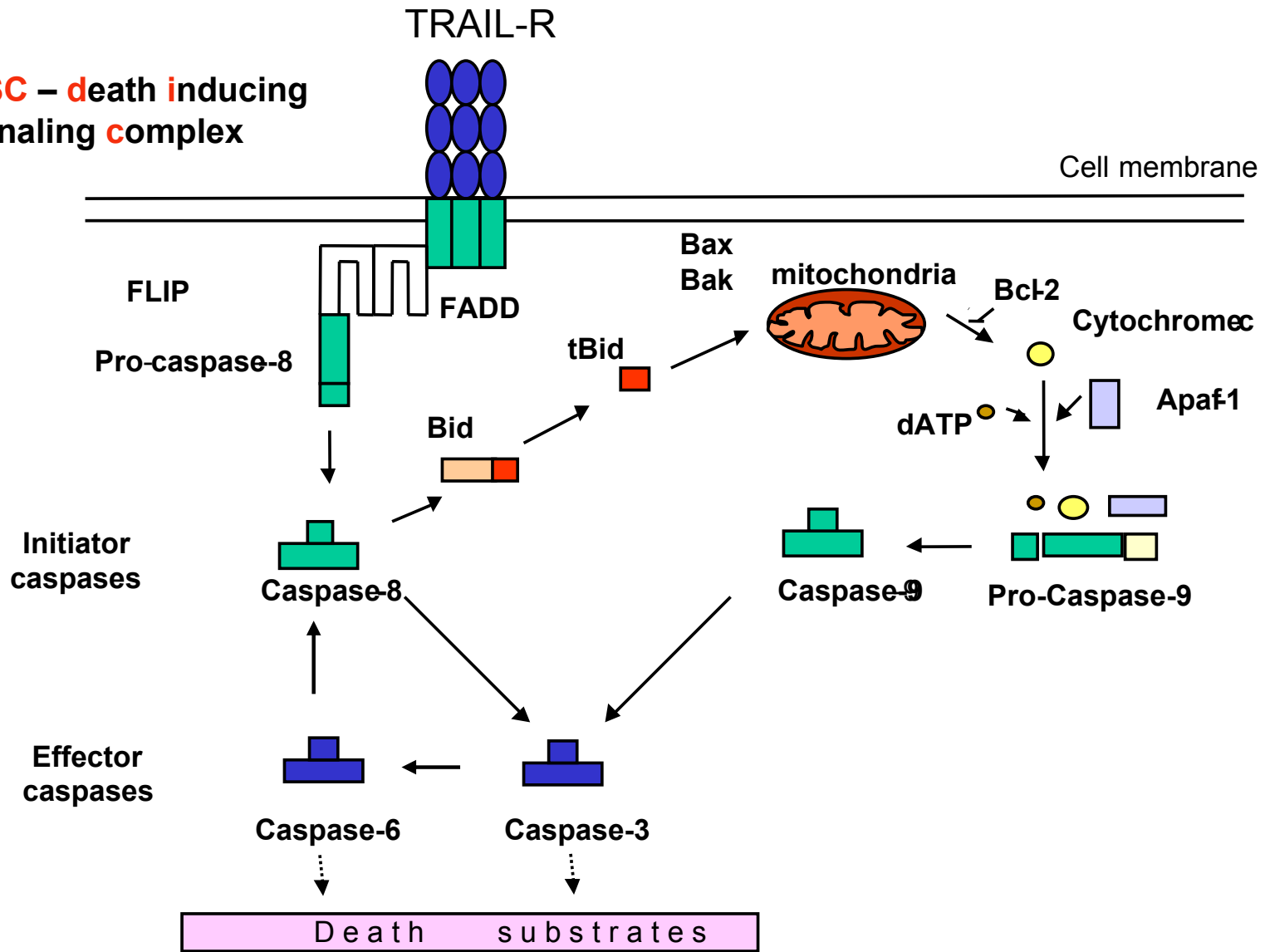
-členové rodiny TNF

-úloha v imunitních a zánětlivých reakcích organismu, v regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy

-podobnost apoptotických signálních drah (oligomerizace receptoru, adapterový protein, death doména, iniciační kaspáza)

- vazba na tzv „death receptory“ (TNFR1, Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2)

DISC – death inducing signaling complex



TNF- α , FasL, TRAIL

- využití v protinádorové terapii jako důležitá alternativa ke konvenčním léčebným postupům využívajícím chemoterapii a ionizující záření

- omezení: - vedlejší účinky, rezistence

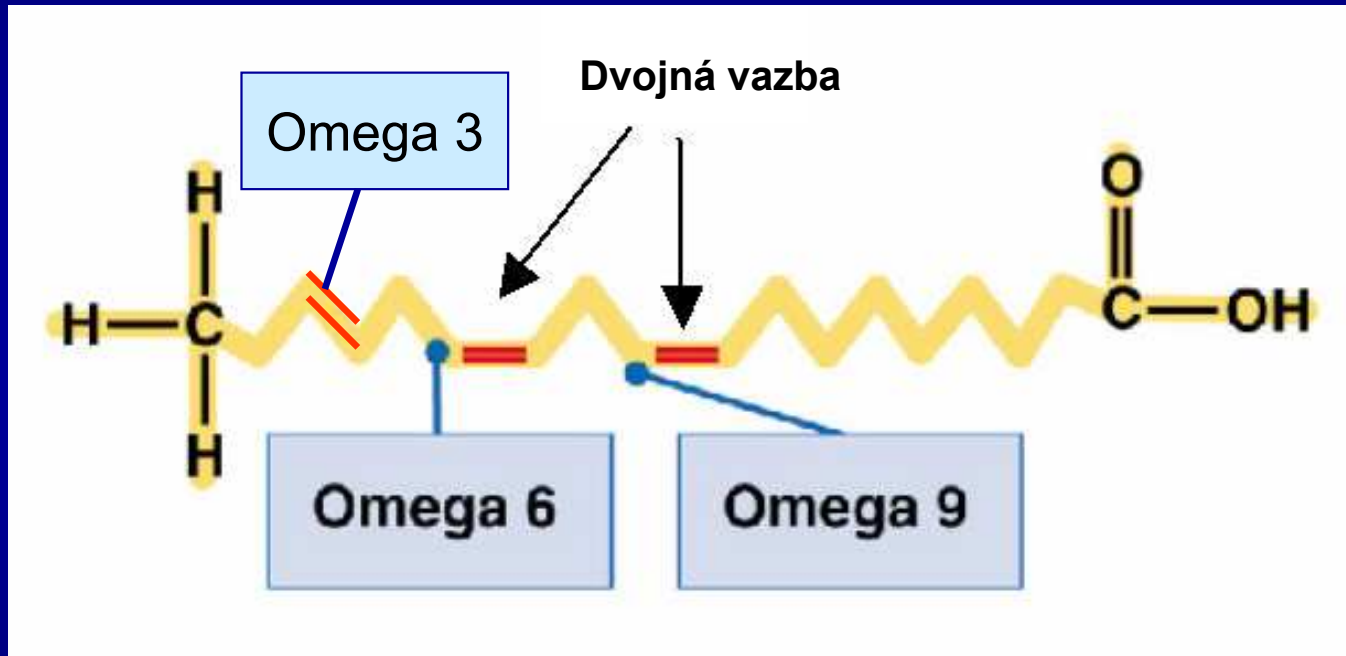
- hledání látek schopných zcitlivět nádorové buňky k účinkům TNF- α a Fas – kombinovaná terapie

-možný kandidát - **PUFAs**

Vysoce nenasycené mastné kyseliny

- mastné kyseliny obsahující 2 a více dvojných vazeb
- důležité složky lipidů přijímaných v potravě
- kvantitativní a kvalitativní zastoupení PUFA v potravě může hrát důležitou úlohu v etiologii některých nádorů (např. tlustého střeva a prsu)
- ovlivnění procesů buněčné proliferace a apoptózy

n-3 vs. n-6 PUFAs

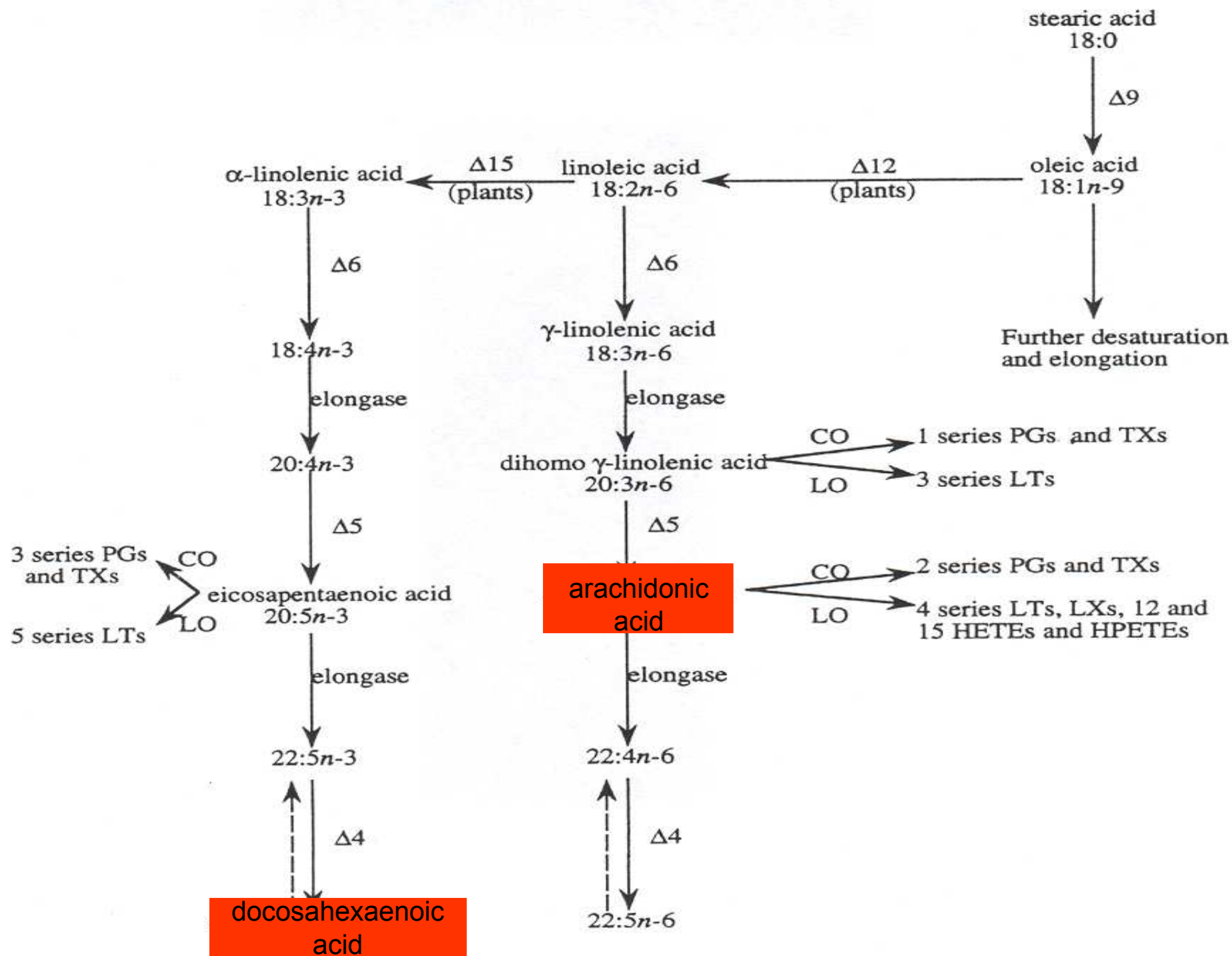


Zdroje PUFA v dietě

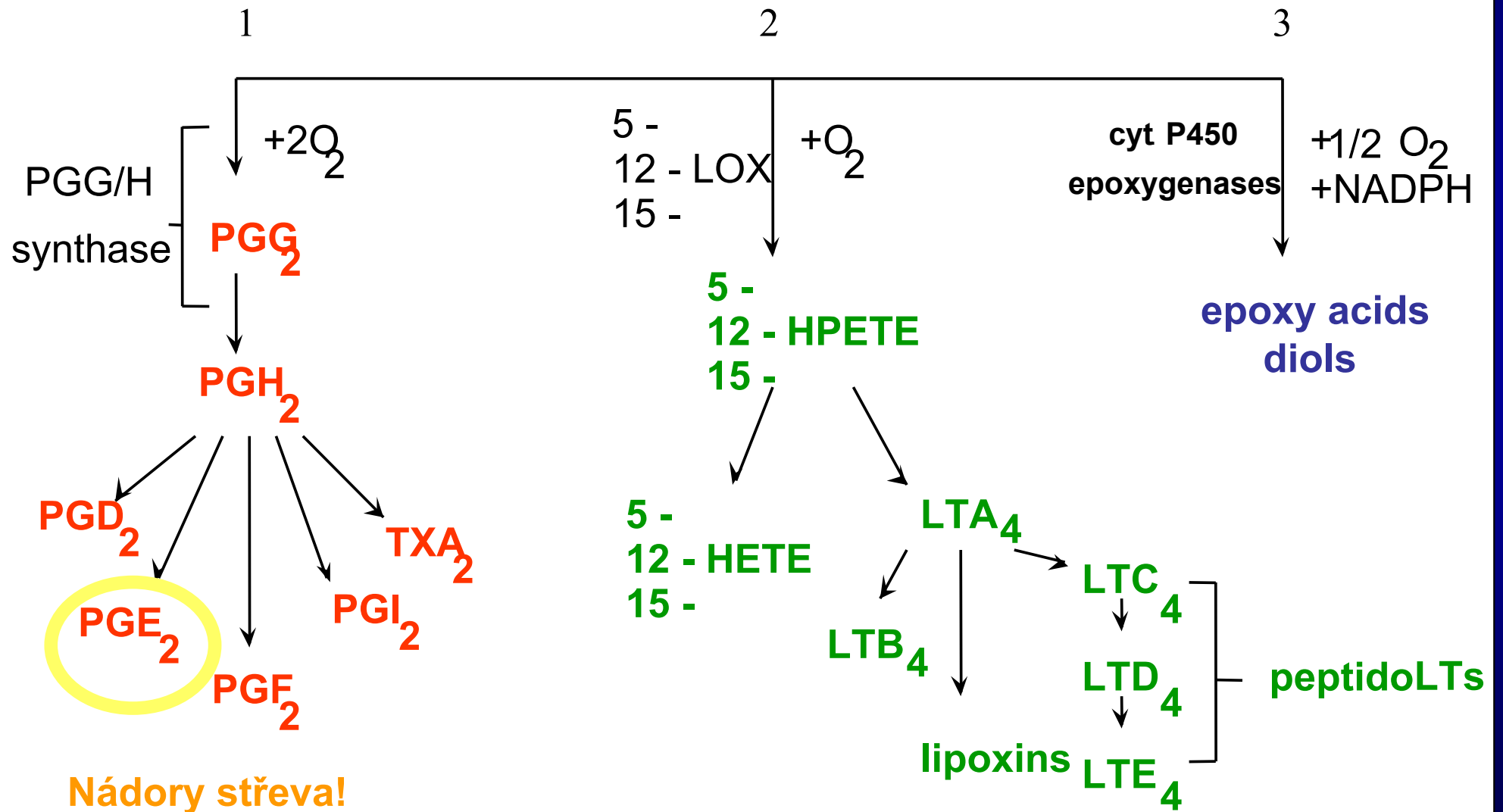
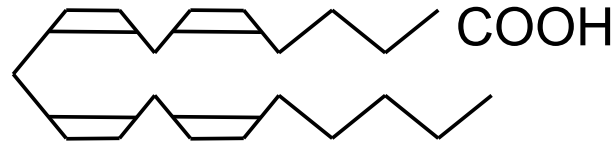
n-3 - rostlinné oleje (lněný, řepkový, sojový), rybí tuky, fytoplankton

n-6 - rostlinné oleje (slunečnicový, pupalkový, kukuřičný), živočišné tuky

- tzv. esenciální mastné kyseliny EFAs



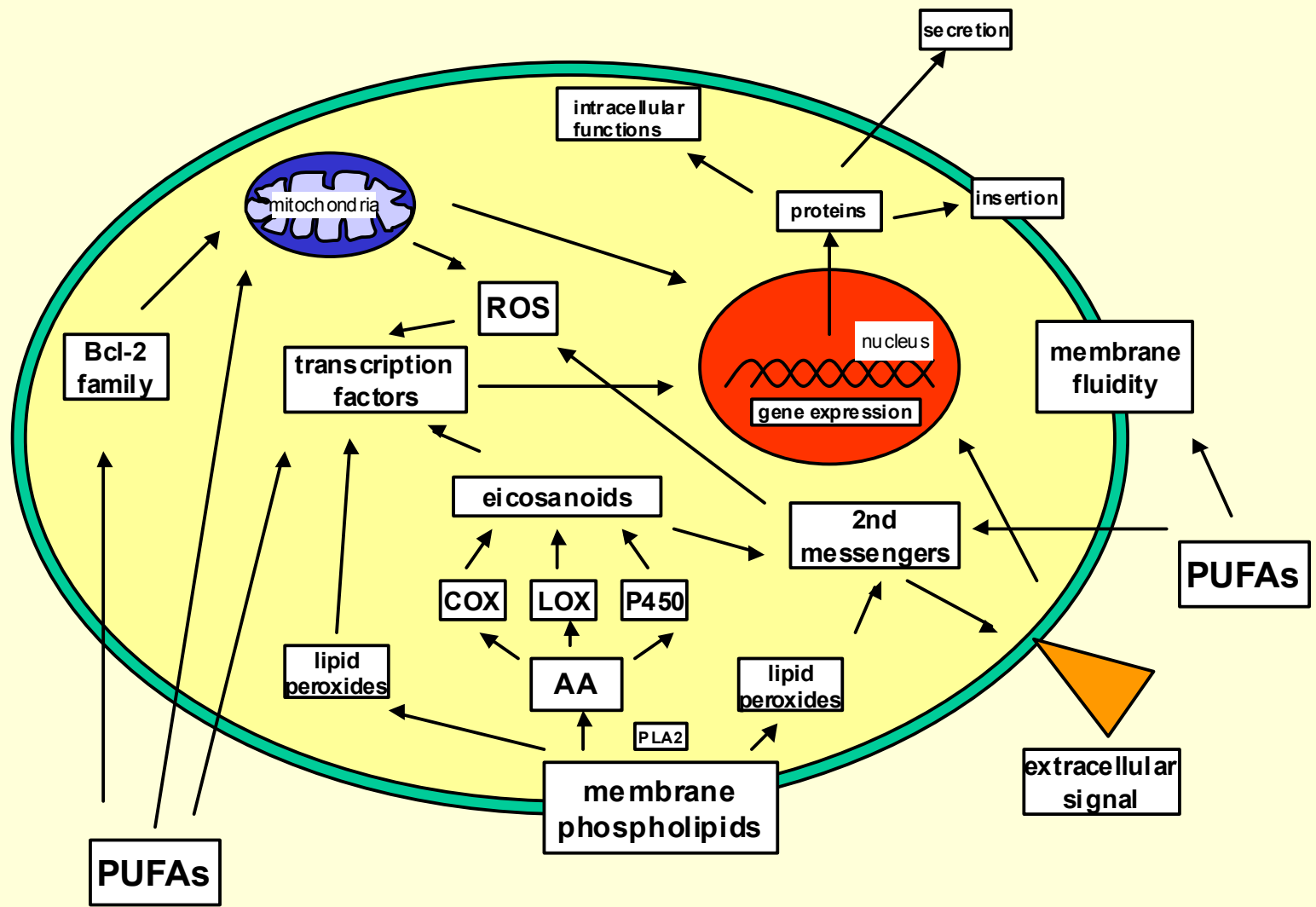
arachidonic acid



PUFAs v dietě

důležitost kvalitativního a kvantitativního zastoupení

- Epidemiologické studie (Eskymáci, Japonci, západní populace)
- Experimenty in vivo (myši, chemicky indukované nádory střeva a vliv PUFAs)
- In vitro studie – buněčné a tkáňové kultury – možné mechanismy....
- cíl experimentů – prokázat a objasnit působení PUFAs z potravy na proliferaci a smrt jak normálních, tak nádorových buněk (využití poznatků v prevenci a léčbě rakoviny tlustého střeva)



Mechanismy působení

n-3 PUFAs v buňce



-Inhibice aktivity enzymů

- COX-2 (funkce: CRC – PGE2 – posílení proliferace, blokace apoptózy, posílení invazivity a angiogeneze)
- PLA2, PLC
- PKC (zvýšená aktivita u CRC)
- iNOS (nádorová promoce, zvyšuje expresi COX-2, ovlivnění aktivity kaspáz, množství p53 atd)
- enzymy zodpovědné za transformaci primárních žlučových kyselin na sekundární (genotoxické působení)

Ovlivnění metastatického potenciálu buňky a angiogeneze

Experimentální
část

Studium proliferace a apoptózy nádorových buněk tlustého střeva (linie HT-29) po působení PUFAs a cytokinů TNF rodiny

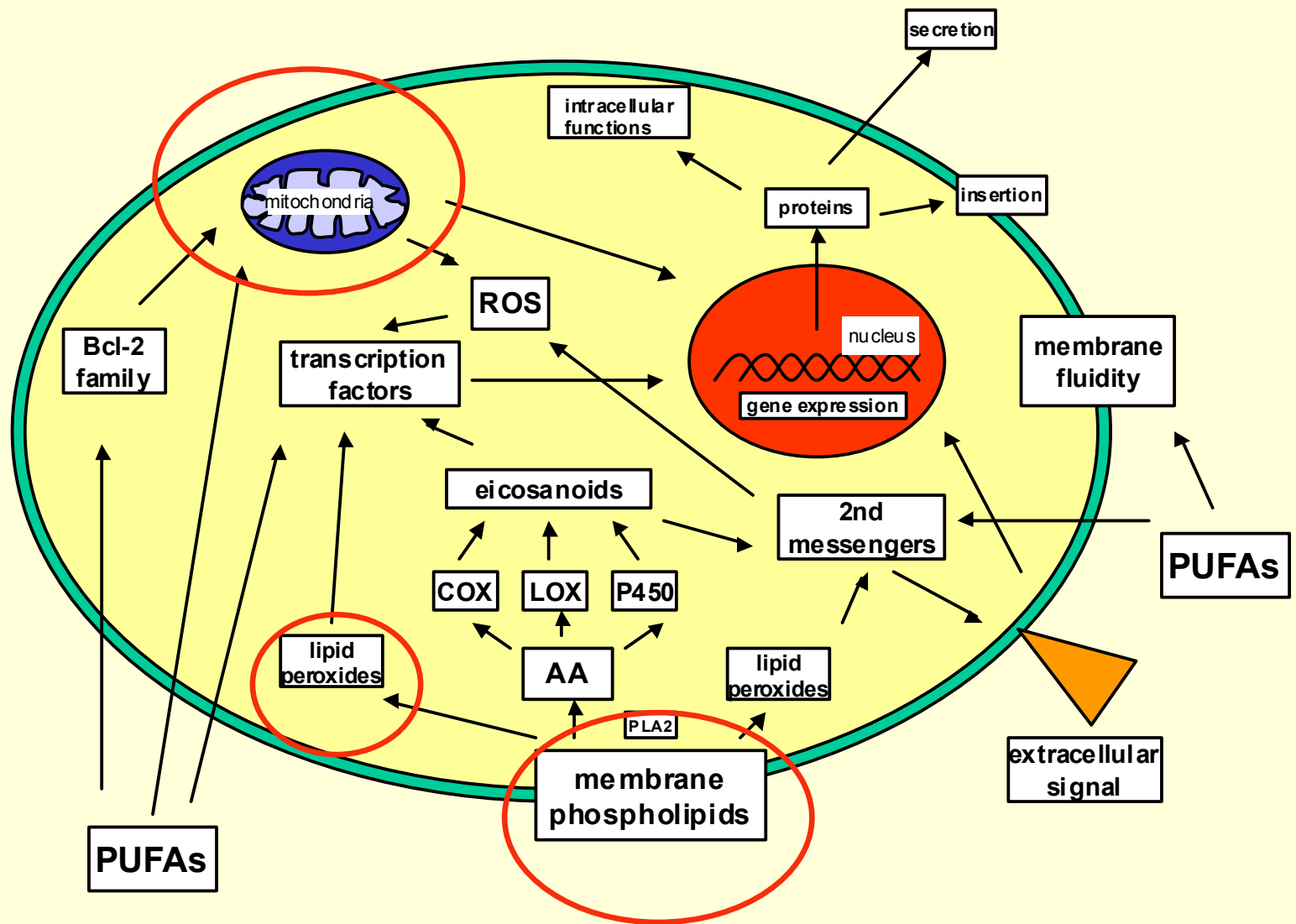
- Vaculová A., Hofmanová J., Souček K., Kovaříková M., Kozubík A.: Tumour necrosis factor- α induces apoptosis associated with poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in HT-29 colon cancer cells. *Anticancer Research* 22: 1635-1640, 2002
- Vaculová A., Hofmanová J., Souček K., Anděra L., Kozubík A.: Ethanol functions as a potent agent sensitizing the colon cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis, *FEBS Letters*, 577, 309-313, 2004
- Hofmanová J., Vaculová A., Kozubík A.: Polyunsaturated fatty acids sensitize human colon adenocarcinoma cells to the death ligand-mediated apoptosis. *Cancer Letters* 218, 33-41, 2005.
- Vaculová A., Hofmanová J., Anděra L., Kozubík A.: TRAIL and docosahexaenoic acid cooperate to induce HT-29 colon cancer cell death. *Cancer Letters*, 229, 43-48, 2005.

Cíle práce – otázky:

Je možné modulovat účinky endogenních regulátorů apoptózy (TNF- α , FasL a TRAIL) prostřednictvím PUFAs (AA a DHA) u buněk lidského adenokarcinomu kolonu HT-29?

Které mechanismy se uplatňují?

PUFAs

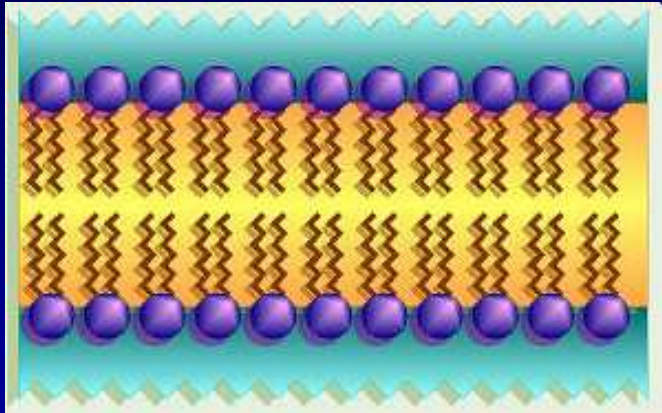


Prokázali jsme, že po inkubaci buněk HT-29 s PUFAs (AA, DHA) dochází k:

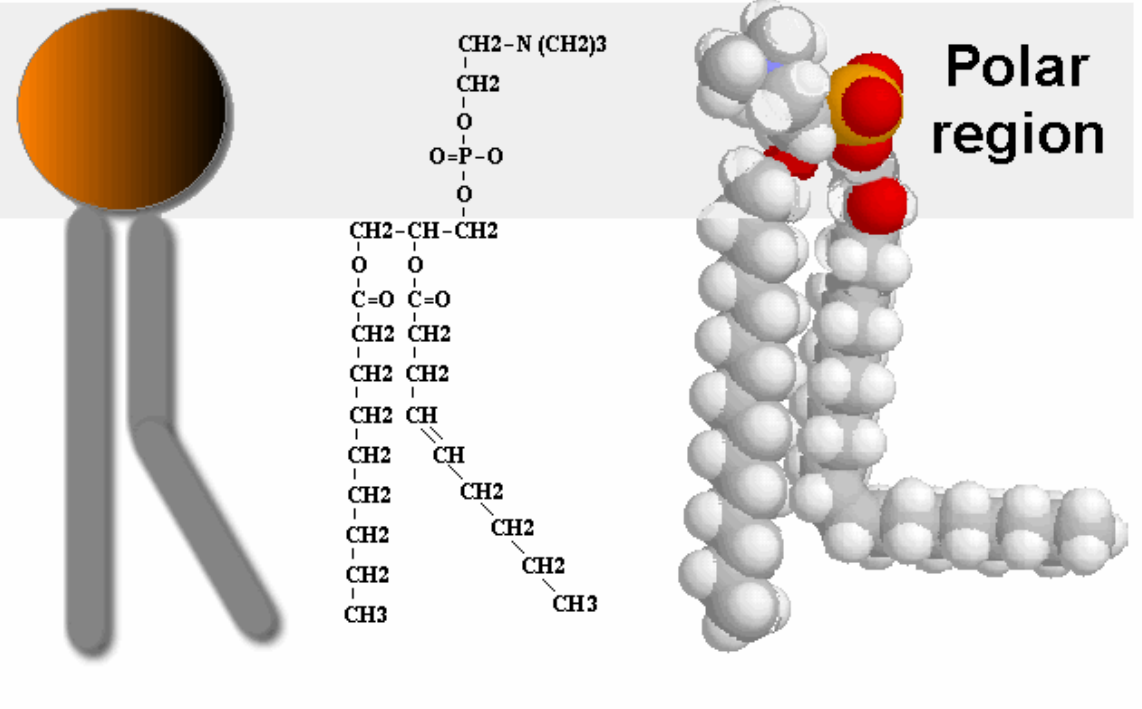
- zvýšené inkorporaci těchto kyselin do buněčných membrán**
- zvýšení produkce reaktivních metabolitů kyslíku**
- posílení lipidové peroxidace**
- změnám buněčného cyklu**

(Hofmanová J., Vaculová A., Lojek A., Kozubík A.: Interaction of polyunsaturated fatty acids and sodium butyrate during apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. European Journal of Nutrition 10, 1-12, 2004)

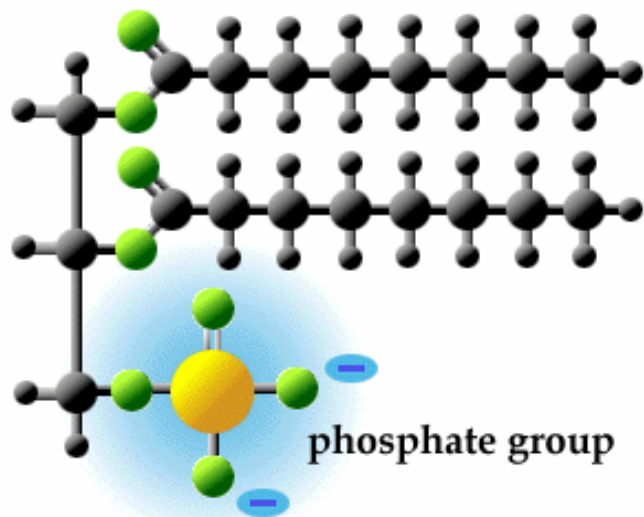
Inkorporace PUFAs do buněčných membrán



Phospholipids



Phospholipid



Typy fosfolipidů (PS, PCh, PE, PI)

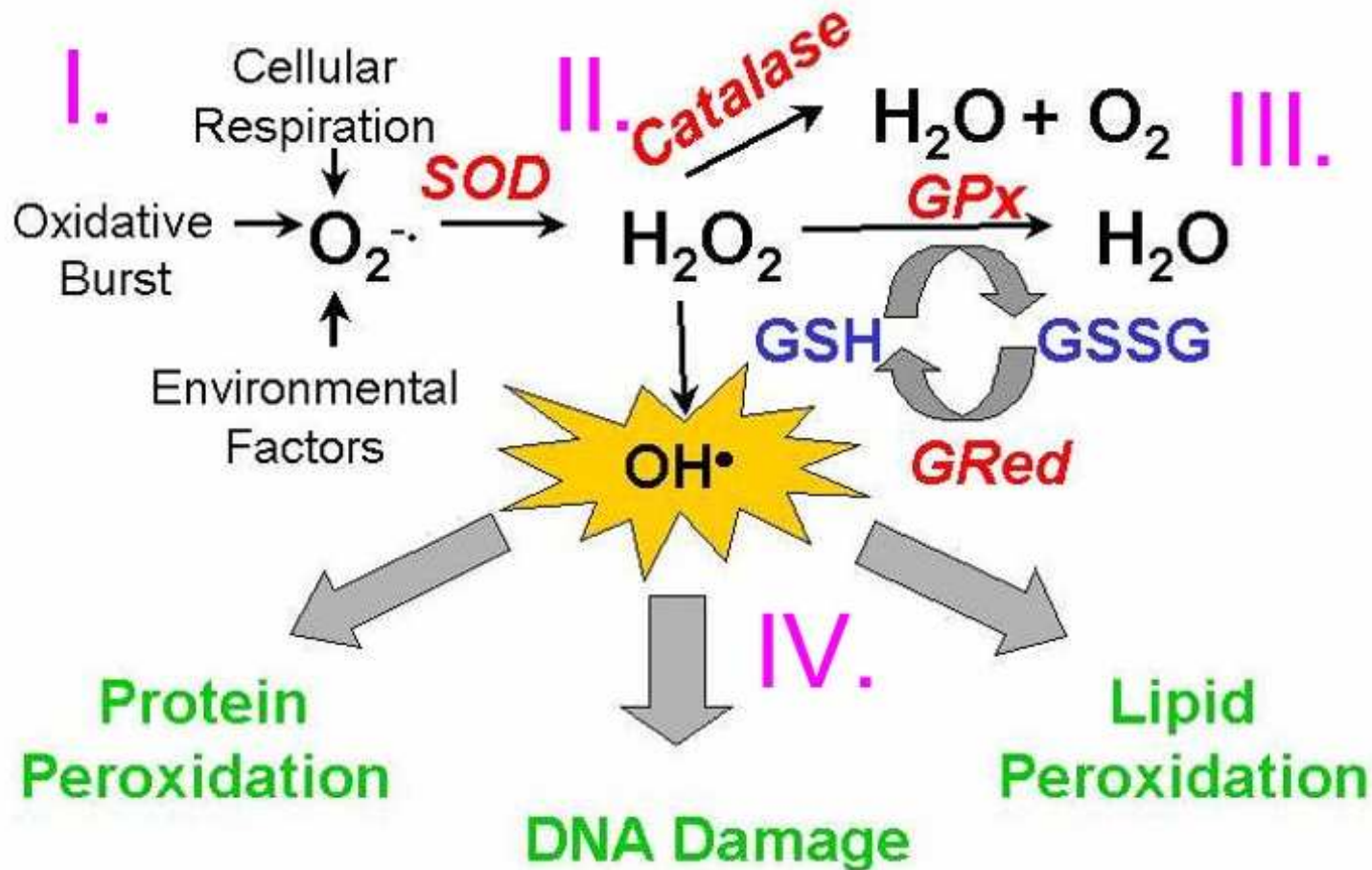
Ovlivnění signálních drah, vlastností membrány

Naše experimenty

Lipidová peroxidace (LP)

- oxidace PUFAs
- katalytická řetězová reakce iniciovaná a propagovaná pomocí volných radikálů
- fáze (iniciace, propagace a terminace)
- citlivé substráty lipidové peroxidace – mastné kyseliny se 2 a více dvojnými vazbami (více dvojných vazeb – více citlivé k oxidativnímu poškození)
- vysoká akumulace těchto PUFAs činí buňky velmi citlivé k peroxidaci, oxidativnímu poškození
- produkty LP: - primární (hydroperoxydy) a sekundární (aldehydy)
 - Vysoce cytotoxické, ovlivňují řadu procesů v buňce
 - MDA – malondialdehyd
 - Měření produkce MDA – TBA assay (TBA reaguje s MDA za vzniku růžového komplexu, kolorimetrický test; více MDA, intenzivnější peroxidace)

Oxidativní stres



by G.P.Eckert
www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html

- 2nd messengers vs. oxidativní poškození – rozlišovat!!!!

Měření produkce reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS) – průtokový cytometr

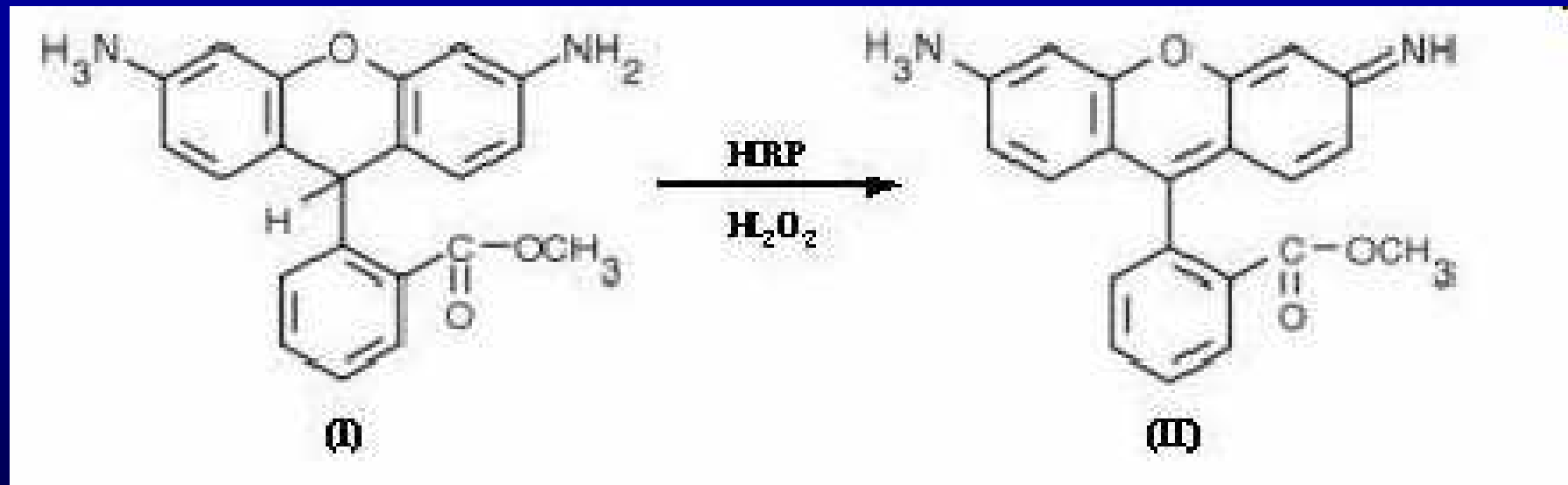
- Peroxid vodíku

- dihydrorhodamin-123 (DHR-123)

- dichlorofluorescein diacetát (DCFH-DA)

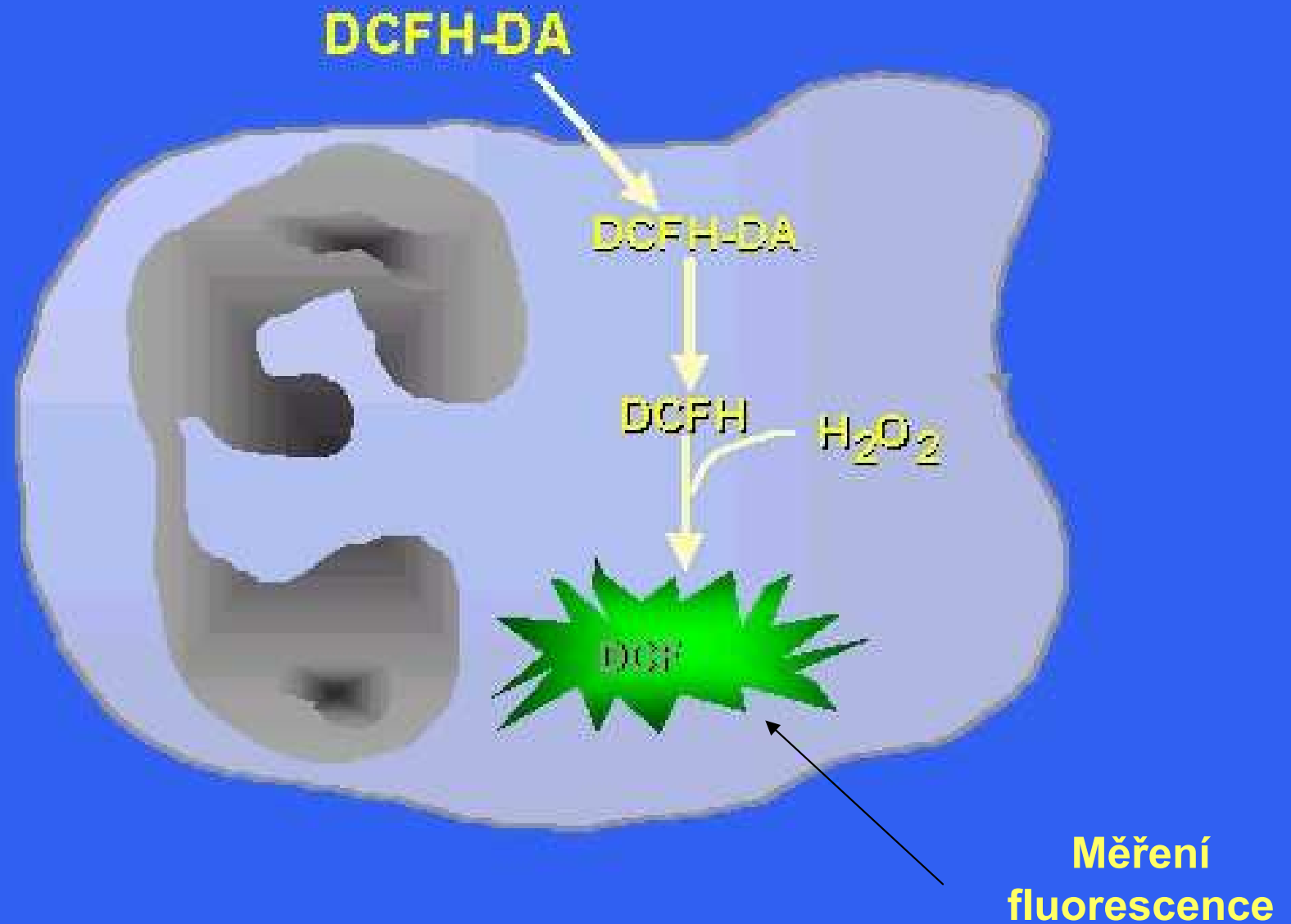
-Superoxid

- hydroethidin (HE)



+ naše experimenty

Oxidative Burst



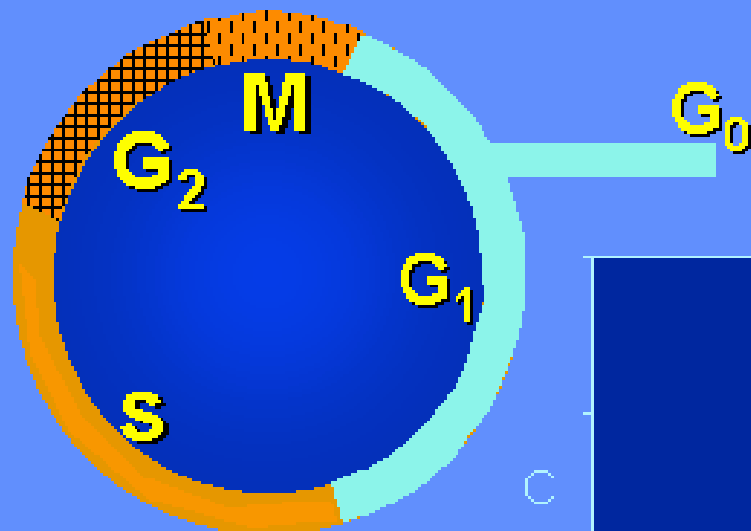
Modulace buněčného cyklu a proliferace prostřednictvím PUFAs

- významné ovlivnění proliferace nádorových buněk pomocí mastných kyselin
- silná závislost na typu PUFA, její koncentraci a době působení
 - paradox mastných kyselin (Cornwell, Morisaki, 1988)
 - nízké koncentrace – stimulace proliferace
 - vysoké koncentrace – inhibice proliferace

Studium proliferace buněk po působení PUFAs v našich experimentech:

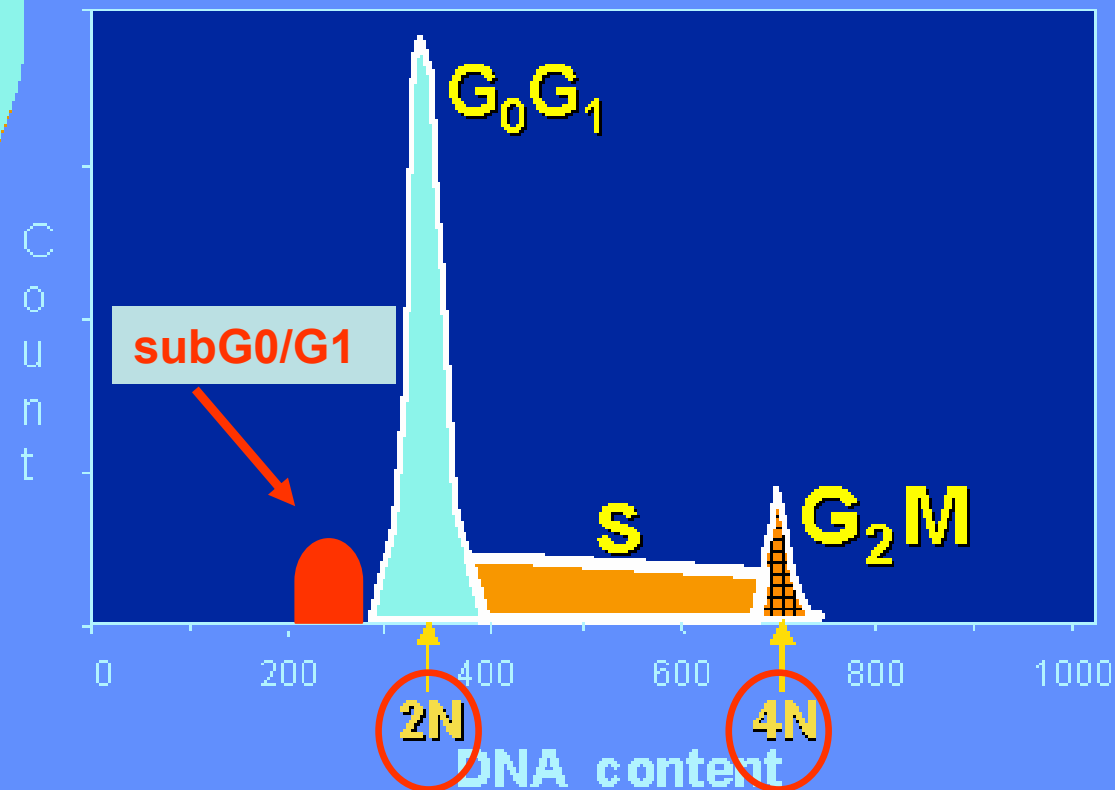
- stanovení počtu buněk (přisedlé, plovoucí, celkem), viability
- inkorporace 3H thymidinu
- měření buněčného cyklu (po obarvení DNA – propidium jodidem)
- studium proteinů zapojených v regulaci buněčného cyklu

Normal Cell Cycle



Vazba PI na DNA –
množství PI je úměrné
množství DNA

DNA Analysis



+ subdiploidní
populace

AA, DHA (10-50 uM – 48h působení – buněčná linie HT-29)

-v uvedených koncentracích a době působení neindukovaly PUFAs apoptózu u studované buněčné linie

-ale významné změny :

- oxidativní metabolismus buňky
- buněčný cyklus
- buněčná adheze
- inkorporace PUFAs do membrán

možné ovlivnění apoptotických signálních drah
(indukce apoptózy přes tzv. death receptory)

Otázky:

Jsou PUFAs schopné modulovat apoptotické signální dráhy TNF- α , FasL a TRAILu?

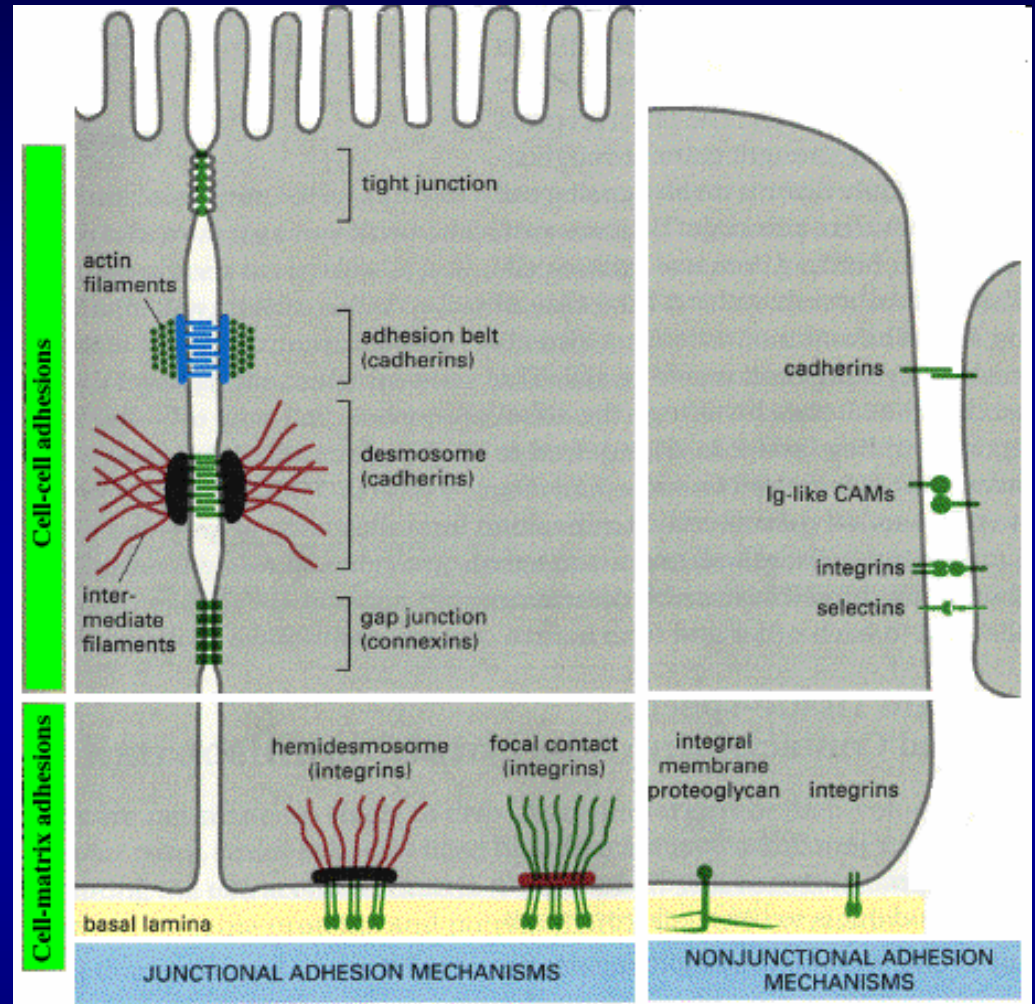
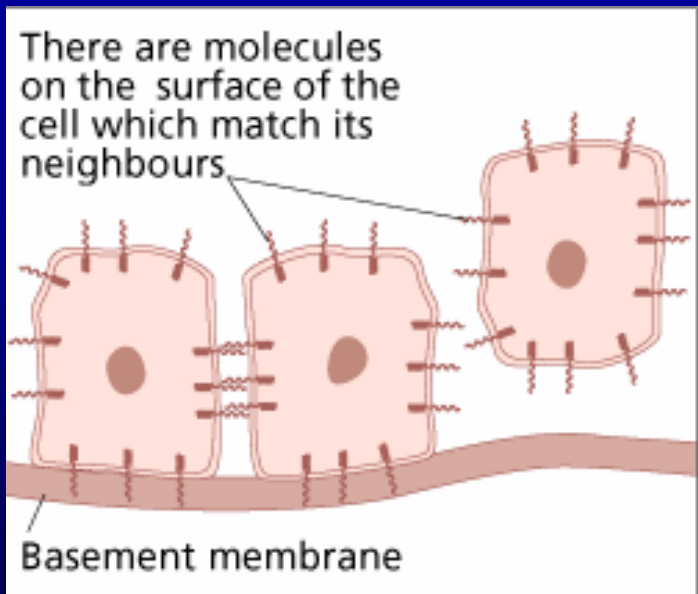
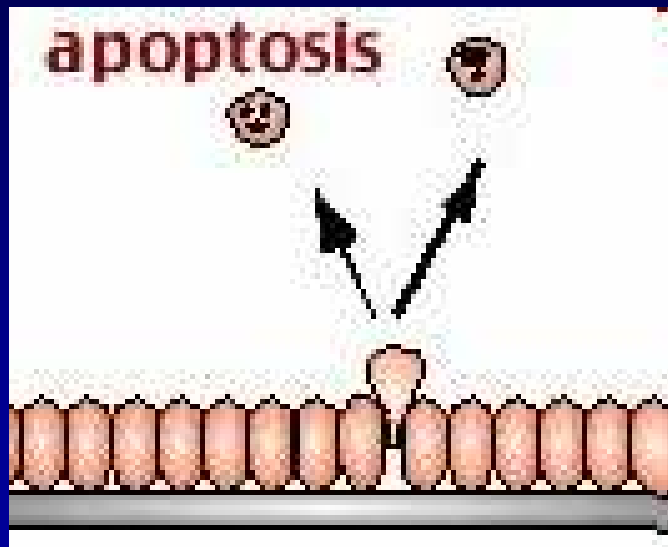
Pokud ano, jaké mechanismy se uplatňují a na jaké úrovni signální dráhy dochází k interferenci?

Na otázky odpoví následující experimenty:

AA a DHA

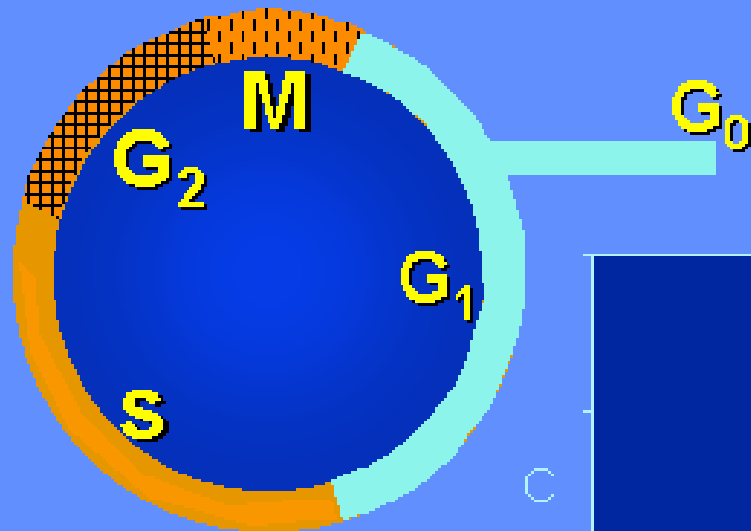
vs.

TNF- α a anti-Fas

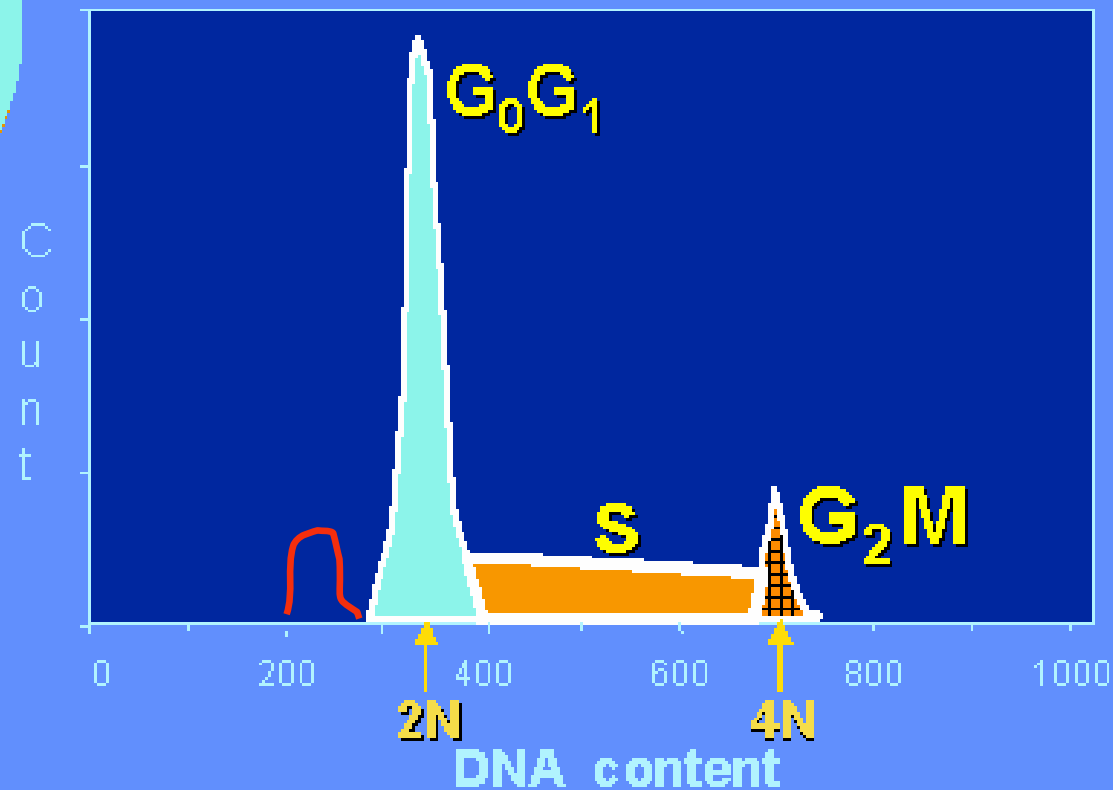


<http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/protein/adhesion.gif>

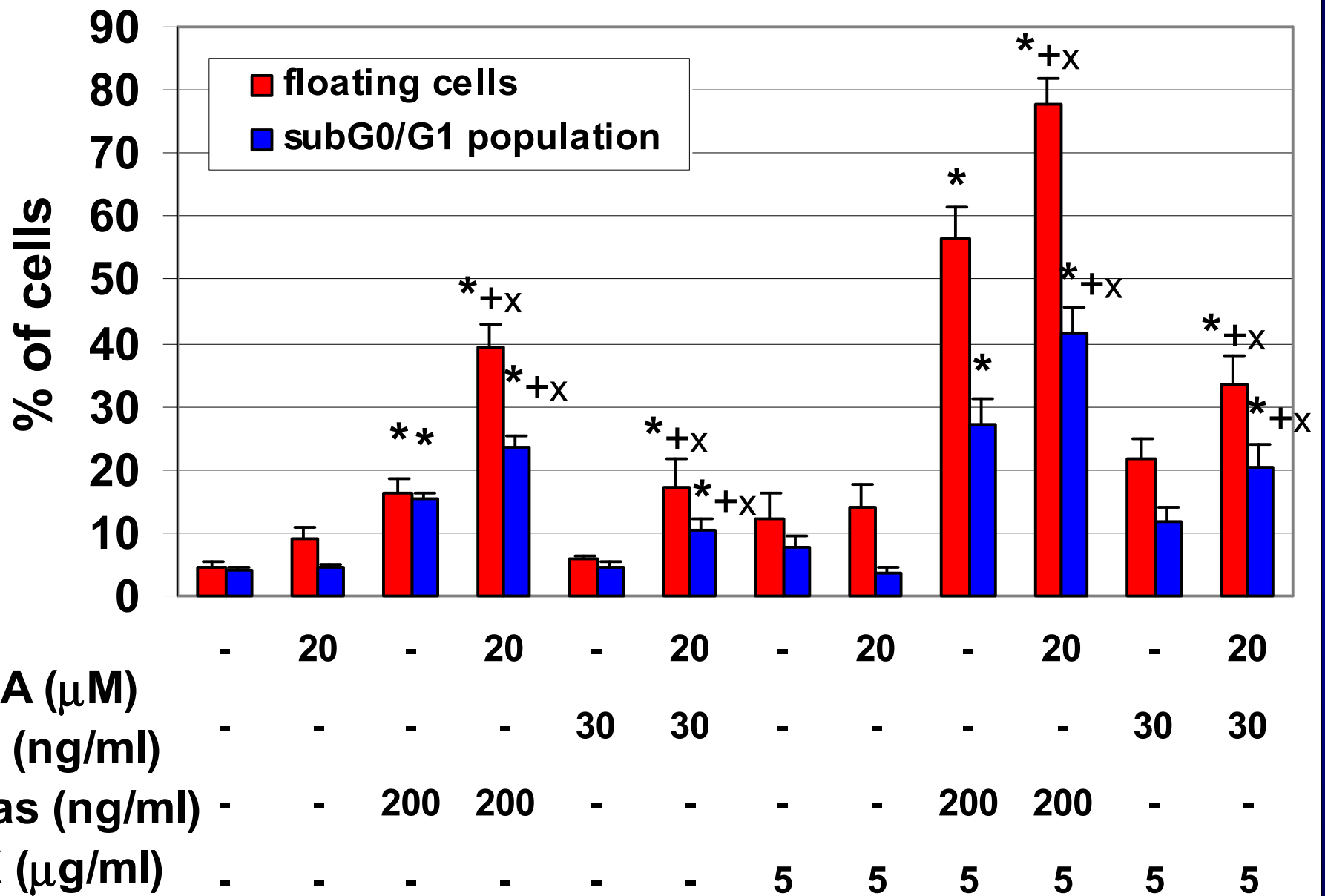
Normal Cell Cycle

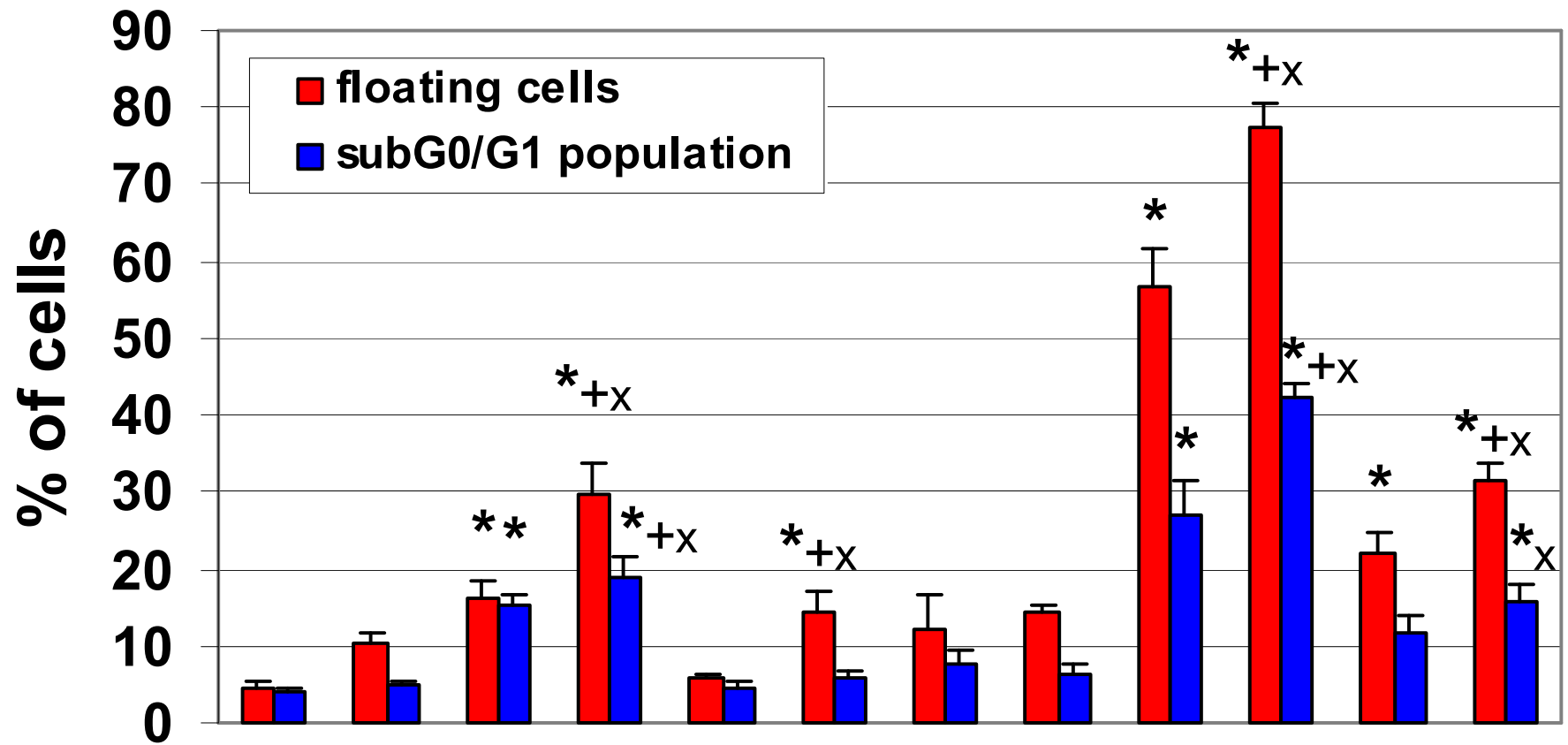


DNA Analysis



+ subdiploidní populace





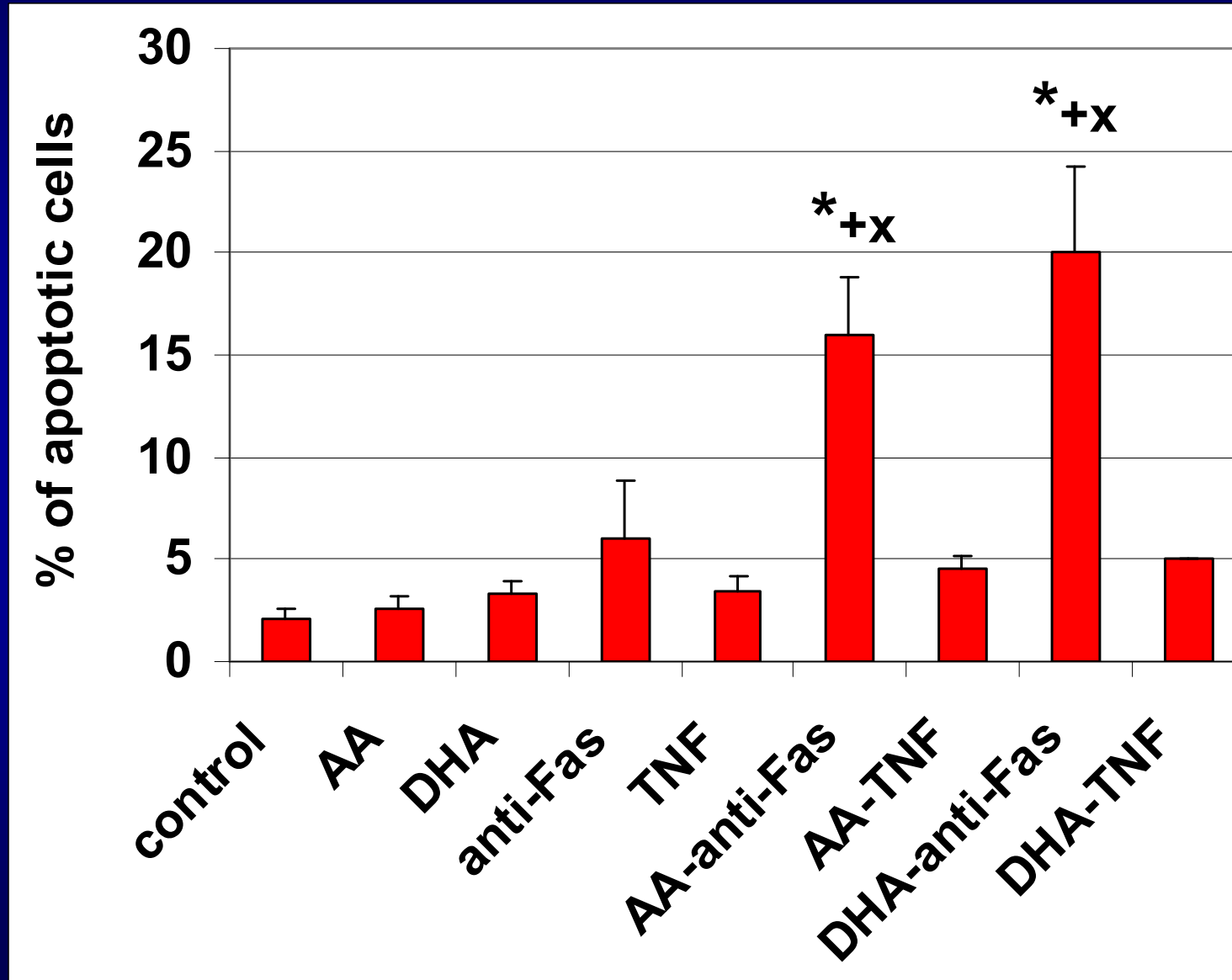
AA (μM)	-	50	-	50	-	50	-	50	-	50	-	50
TNF (ng/ml)	-	-	-	-	30	30	-	-	-	-	30	30
anti-Fas (ng/ml)	-	-	200	200	-	-	-	-	200	200	-	-
CHX ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5

Hodnocení jaderné morfologie buněk

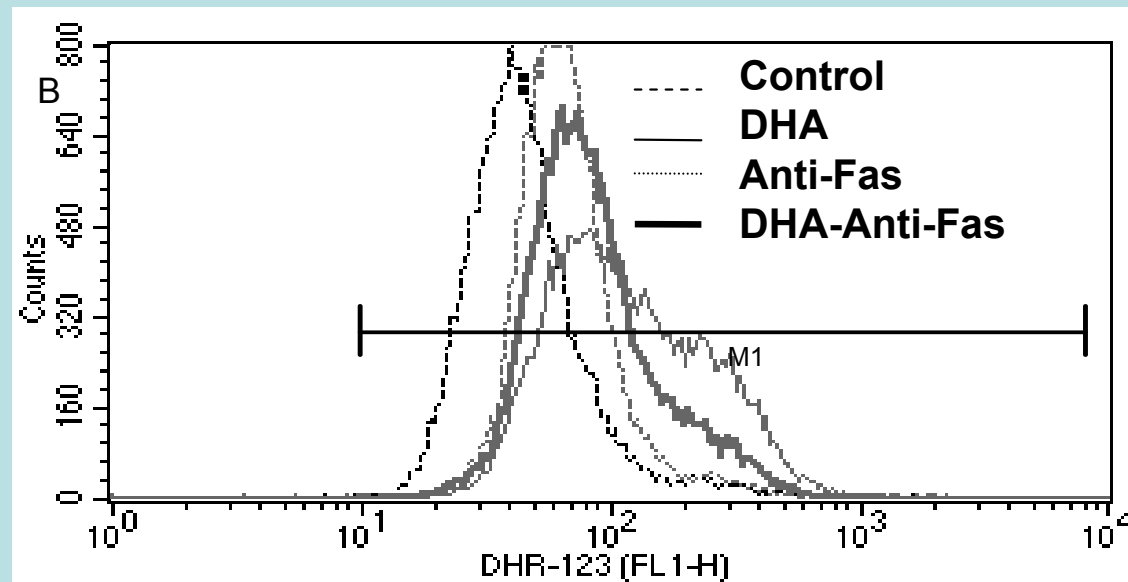
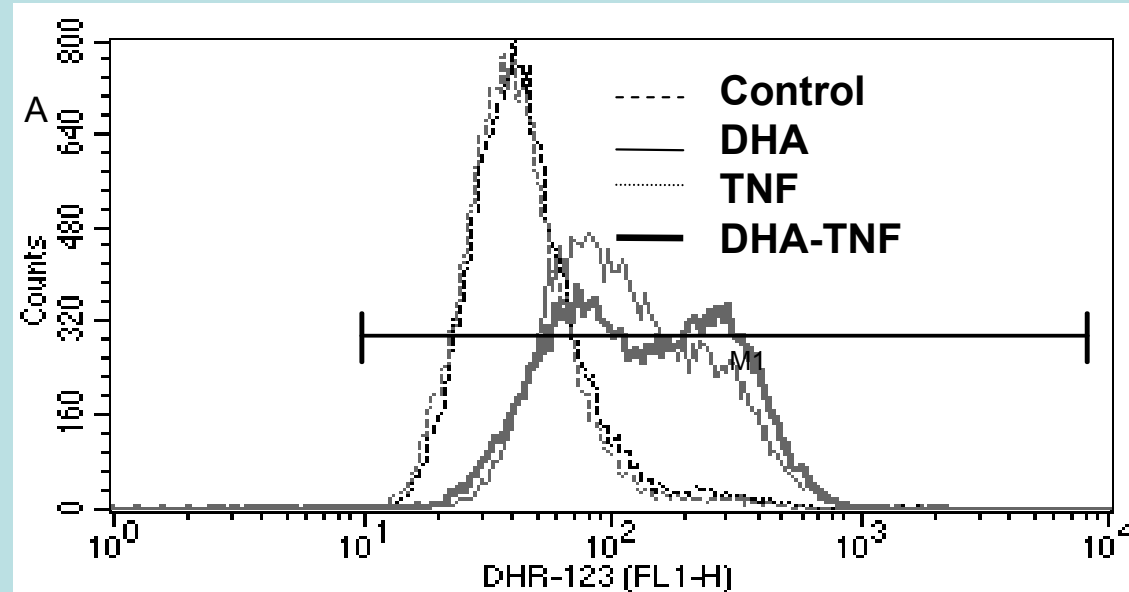
Barvení DNA – DAPI, pak hodnocení – fluorescenční mikroskop – charakteristická apoptotická morfologie jadra – kondenzace a fragmentace jaderného chromatinu)



Apoptotic cells (DAPI)

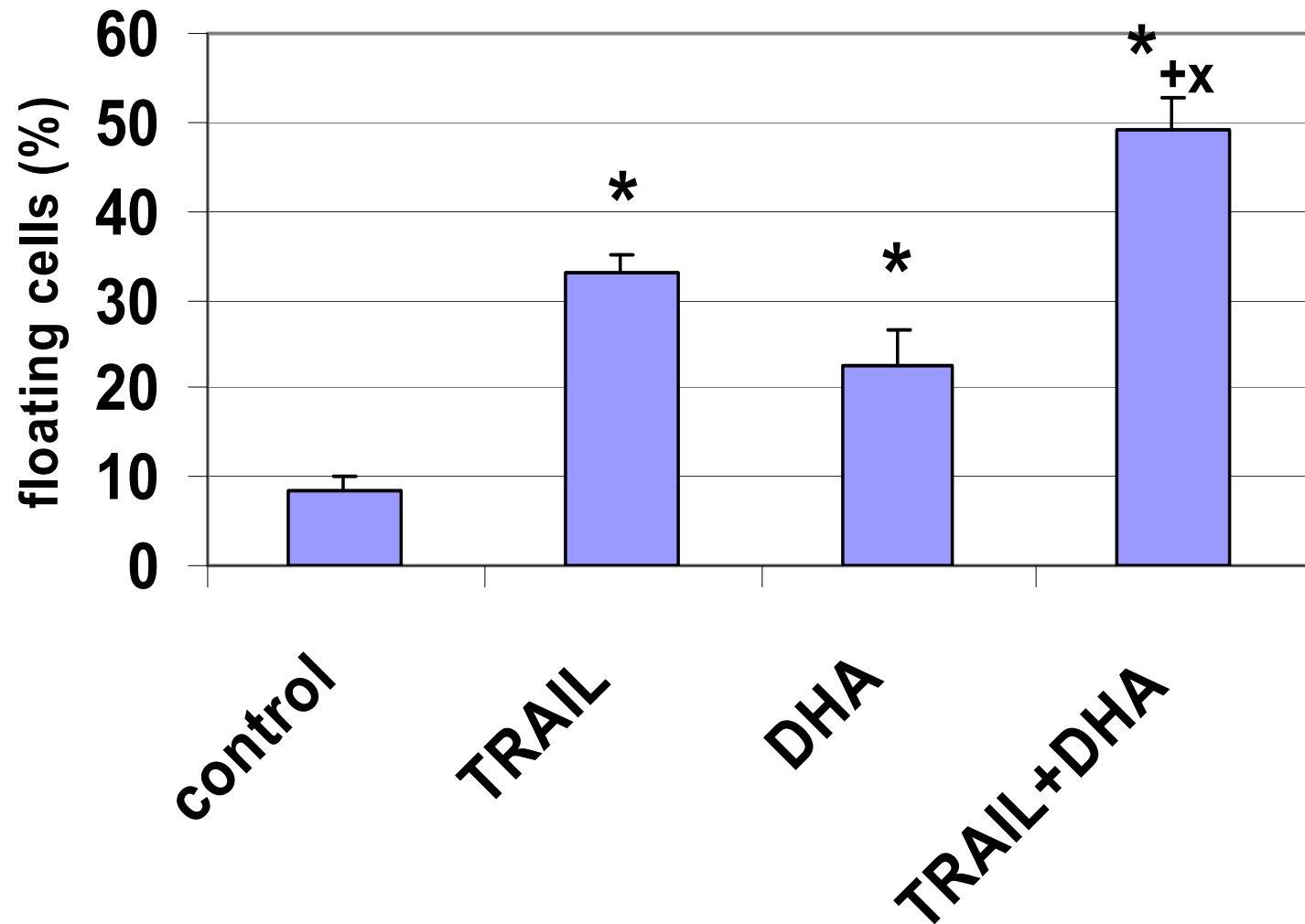


ROS

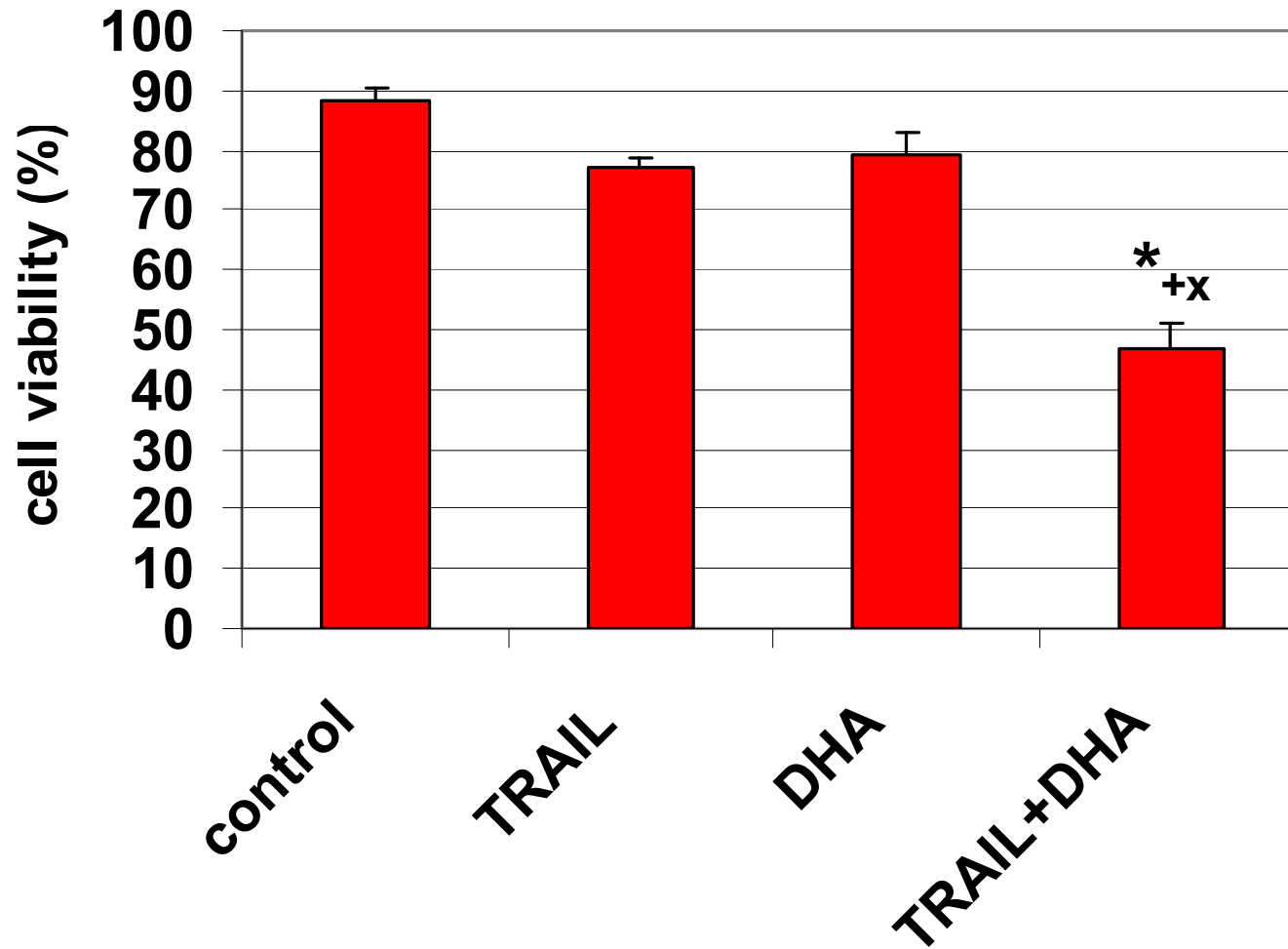


TRAIL + DHA

Plovoucí buňky

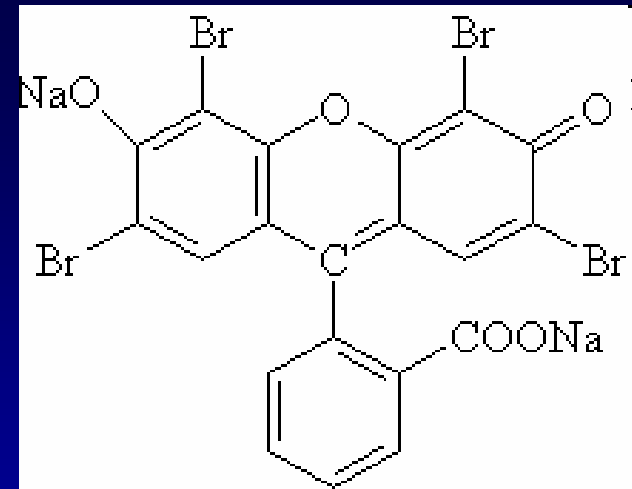


Viabilita (eosin)



Viabilita

Obarvení buněk eosinem

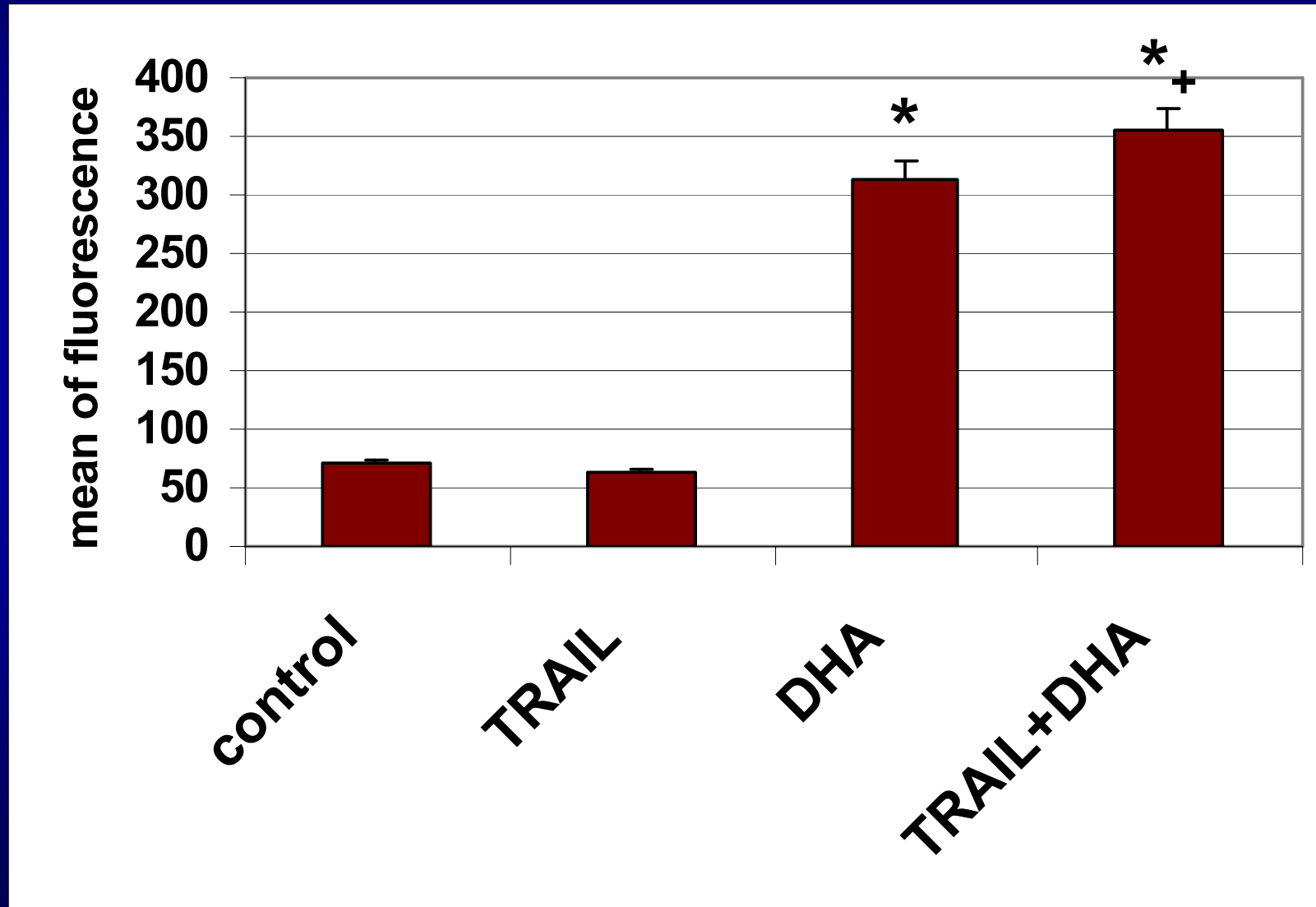


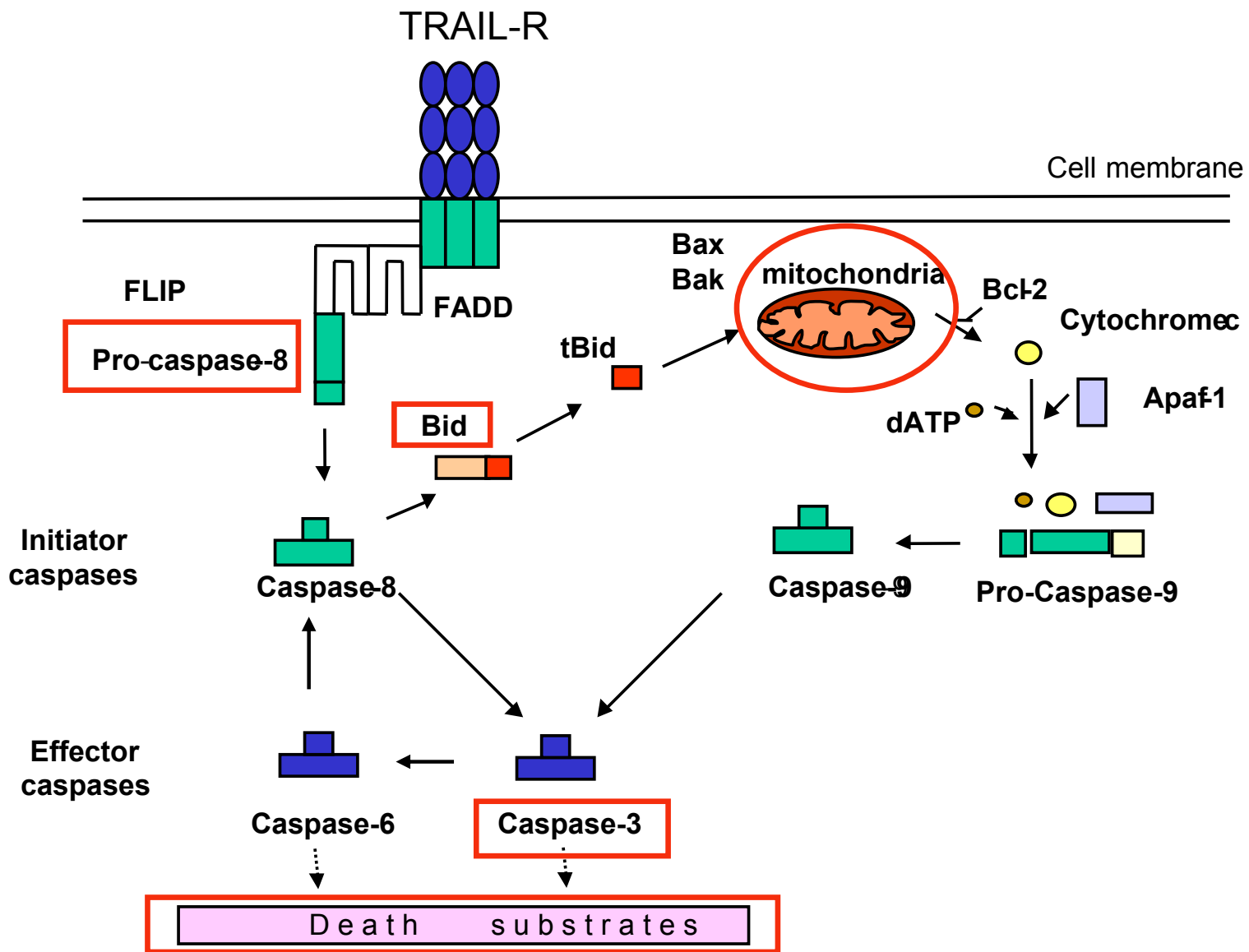
eosin

Test integrity plazmatické membrány

(obarví se mrtvé buňky s porušenou integritou plazmatické membrány, živé zůstanou beze změn)

Produkce ROS (DHR-123)





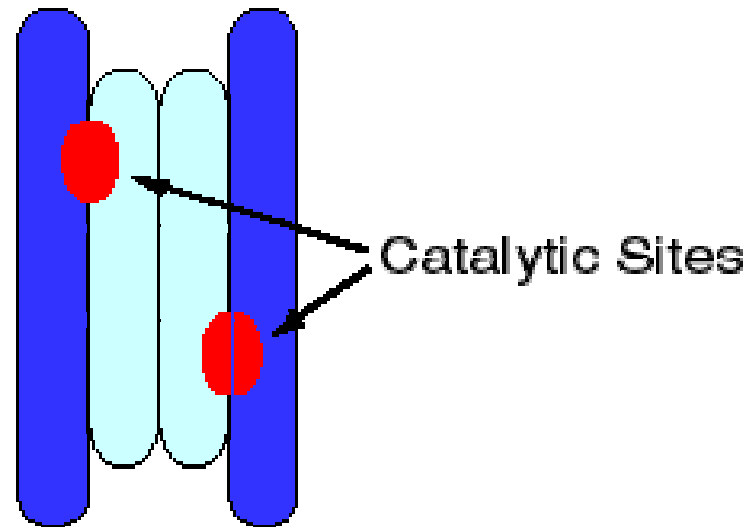
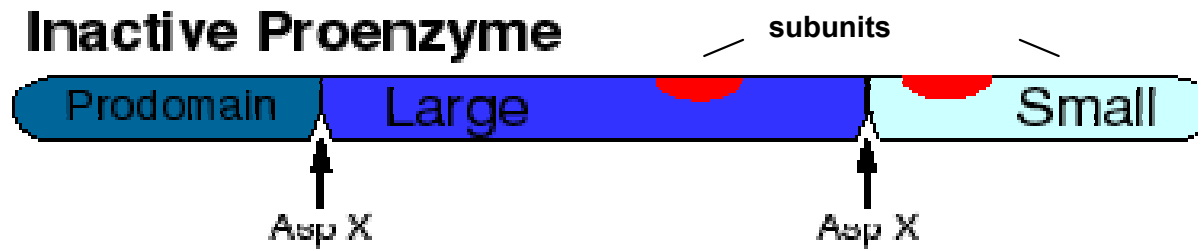
Kaspázy

- Cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové
- Klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy), štěpení – aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“
- struktura:
 - Prodoména
 - Katalytické podjednotky – velká a malá (heterotetramer)
- dělení:
 - Iniciační kaspázy (dlouhá prodoména) - kaspázy-8, -9
 - Efektorové (krátká prodoména) – kaspáza-3

-Substráty kaspáz:

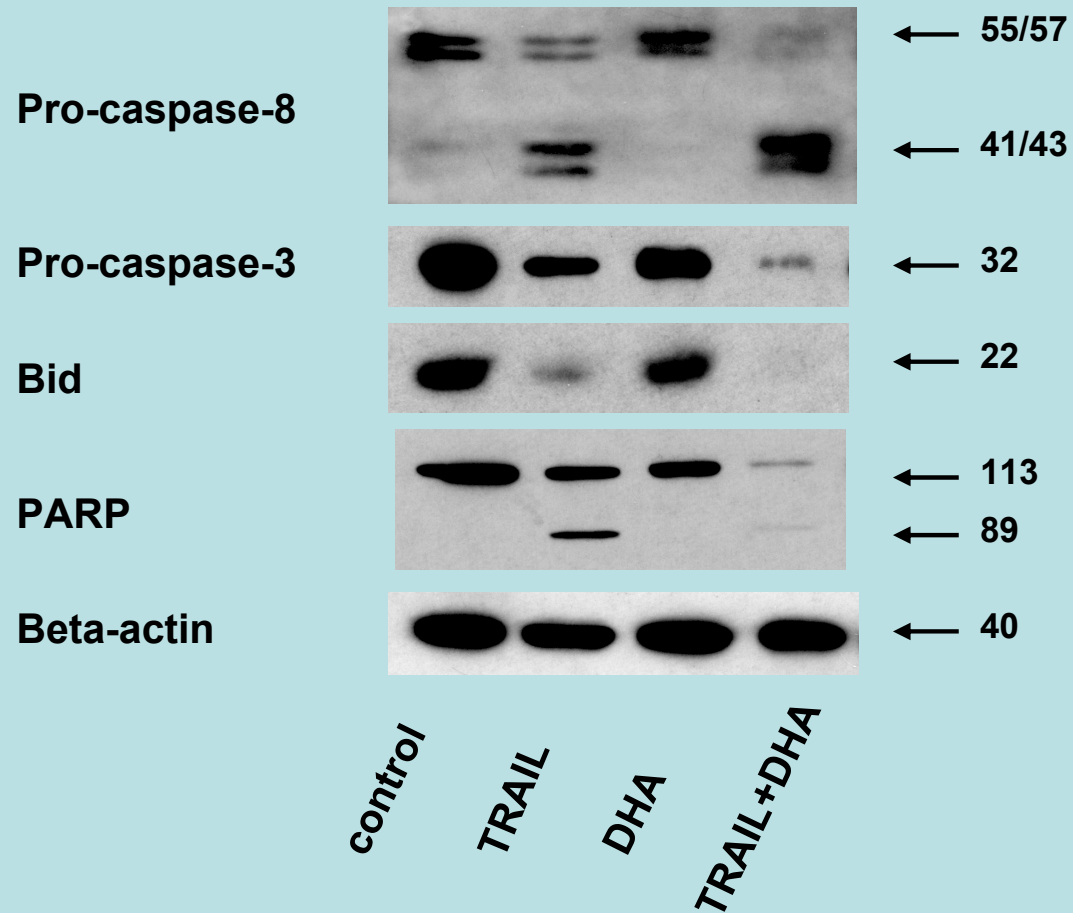
- PARP**
- Kaspázy**
- Proteiny Bcl-2 rodiny – Bid**
- actin, fodrin, lamin**
- Kinázy (PKC)**
- atd.**

Inactive Proenzyme



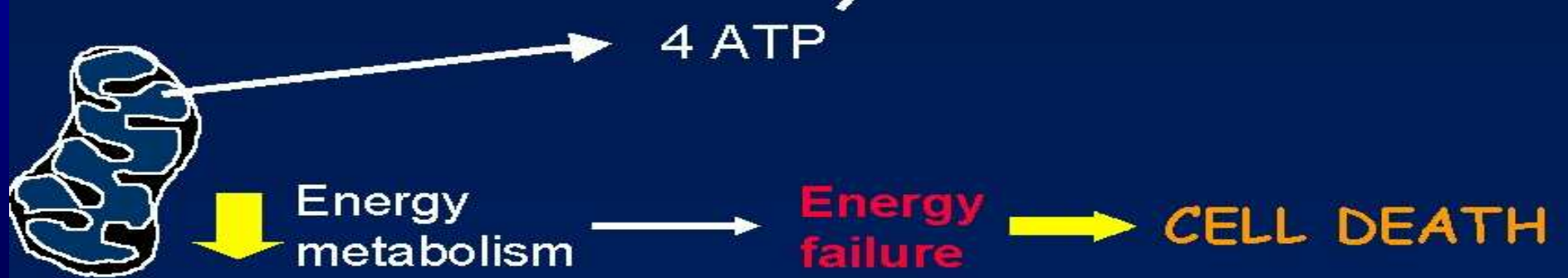
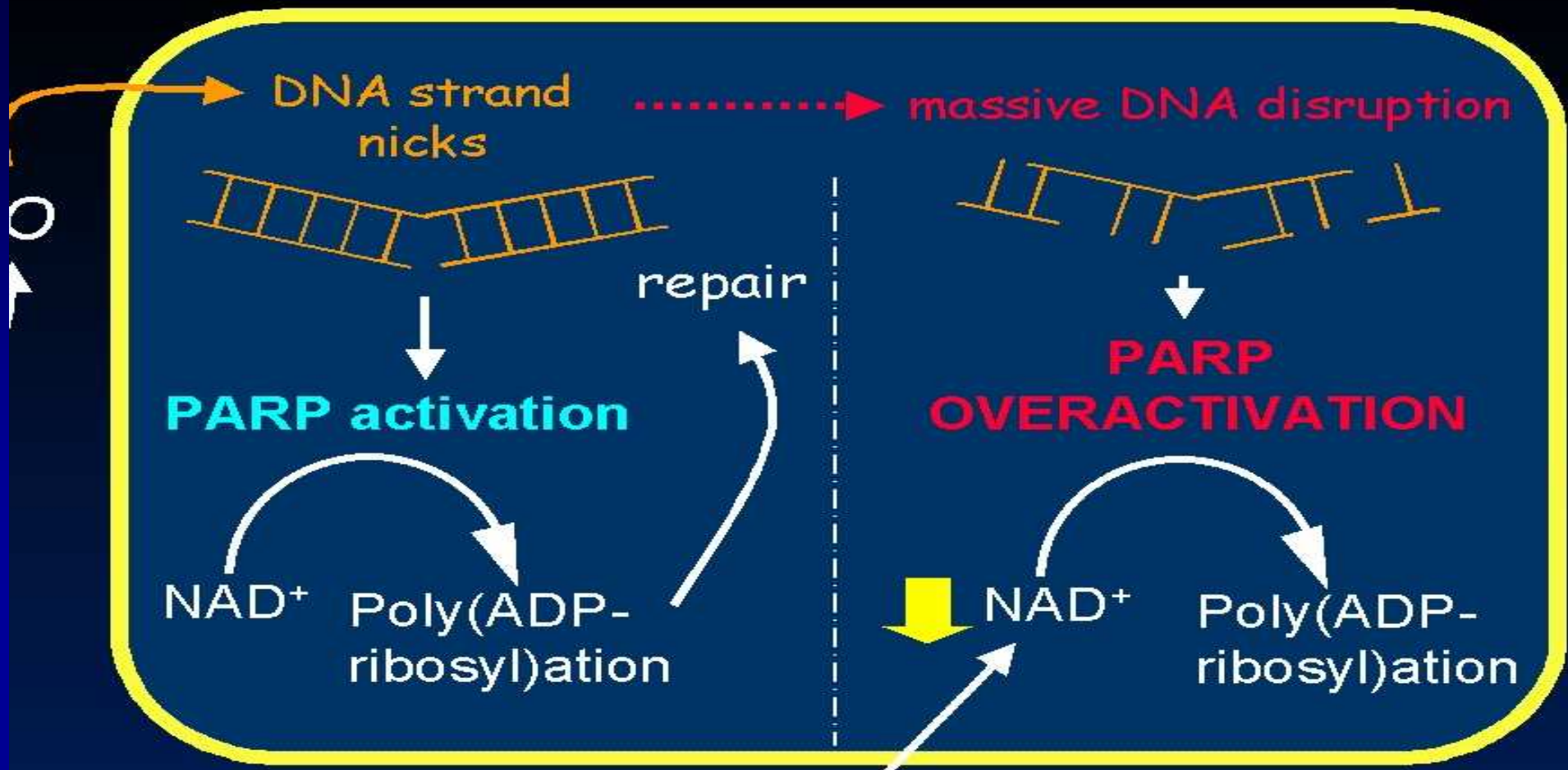
Active Caspase

Proteiny v regulaci apoptózy



Poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP)

- **Jaderný protein (113 kDa), opravy DNA**
- **Během apoptózy specificky štěpený na fragmenty 89 a 24 kDa**
 - **citlivý marker pro detekci apoptózy**
- **Inaktivace PARP blokuje opravu DNA, posílení fragmentace DNA**



Mitochondrie

centra buněčného dýchání, energetická centra buňky

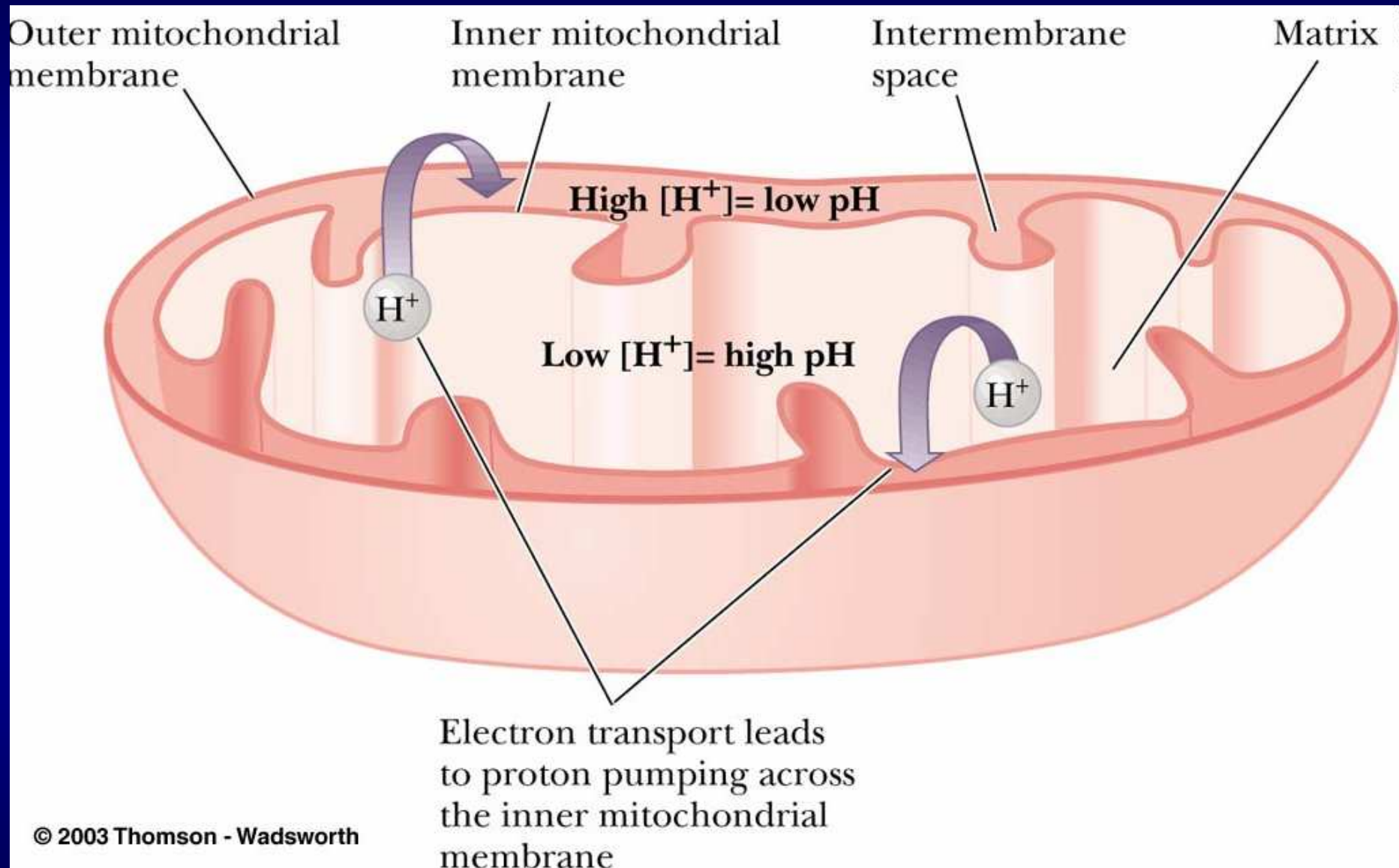
složení:

vnější membrána – semipermeabilní (5 kDa) , kanálky (porin)

vnitřní membrána – nepropustná, pouze selektivní transport, bohatě členěná (kristy – zvětšení povrchu – syntéza ATP), zde ukotveny proteiny – součásti elektron-transportního řetězce, transport elektronů a syntéza ATP

intermembránový prostor (enzymy, proapoptotické proteiny)

matrix – vysoce koncentrovaná směs enzymů, DNA, ribozomy, citrátový cyklus



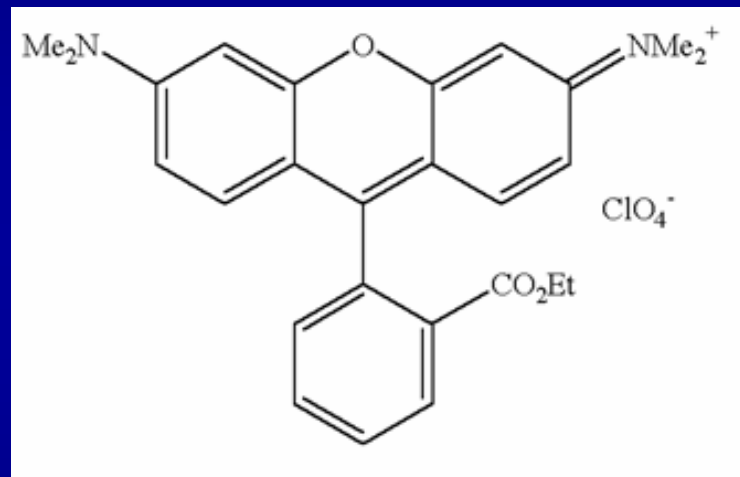
MMP normální buňka vs.
apoptotická

Úloha mitochondrií v apoptóze

- Změny v transportu elektronů
- Změny energetického metabolismu buňky
- Změny v produkci ROS
- Změny mitochondriálního membránového potenciálu
- Účast proteinů rodiny Bcl-2 (Bid, Bak, Bax...)
- Uvolnění proapoptických proteinů

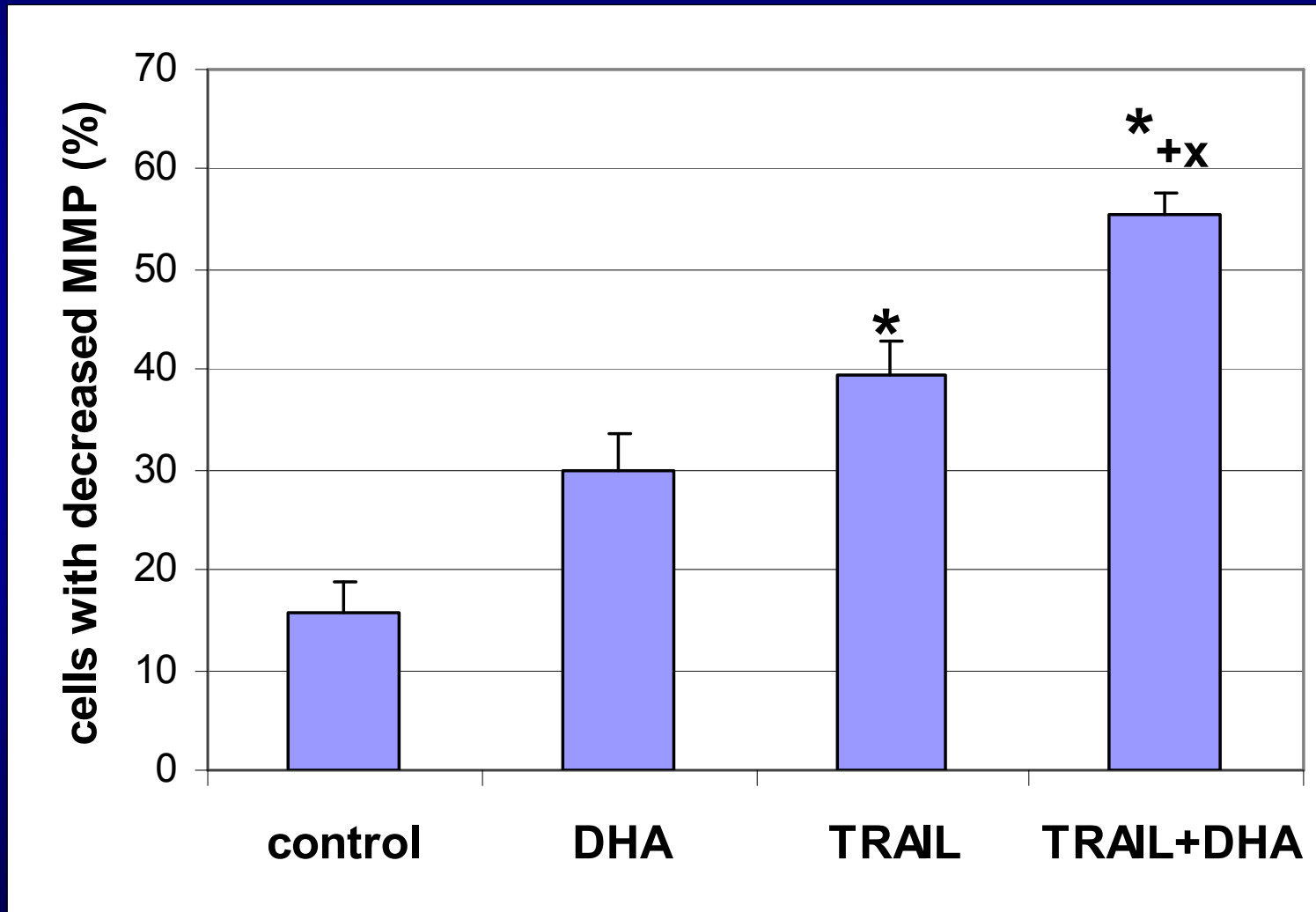
Měření mitochondriálního membránového potenciálu

Flowcytometr – po obarvení TMRE



Hodnocení % buněk se sníženým MMP

Mitochondriální membránový potenciál (TMRE)



ZÁVĚRY:

PUFAs (AA a DHA) mohou významně posilovat apoptózu buněk HT-29 indukovanou TNF- α , FasL a TRAILem u lidských nádorových buněk tlustého střeva

Důsledky a aplikace:

Zásadní význam diety v prevenci/rozvoji nádorového onemocnění střeva, především obsahu PUFAs v lipidech přijímaných v potravě

Možné využití PUFAs v protinádorové terapii (významná modulace účinků některých protinádorových terapeutik)