

**MECHANISMY PŮSOBENÍ  
MASTNÝCH KYSELIN VE STŘEVĚ A JEJICH  
VZTAH K ZÁNĚTLIVÝM A NEOPLASTICKÝM  
ONEMOCNĚNÍM**

# 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 diferenciací)

výměna epitelu (zránění 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

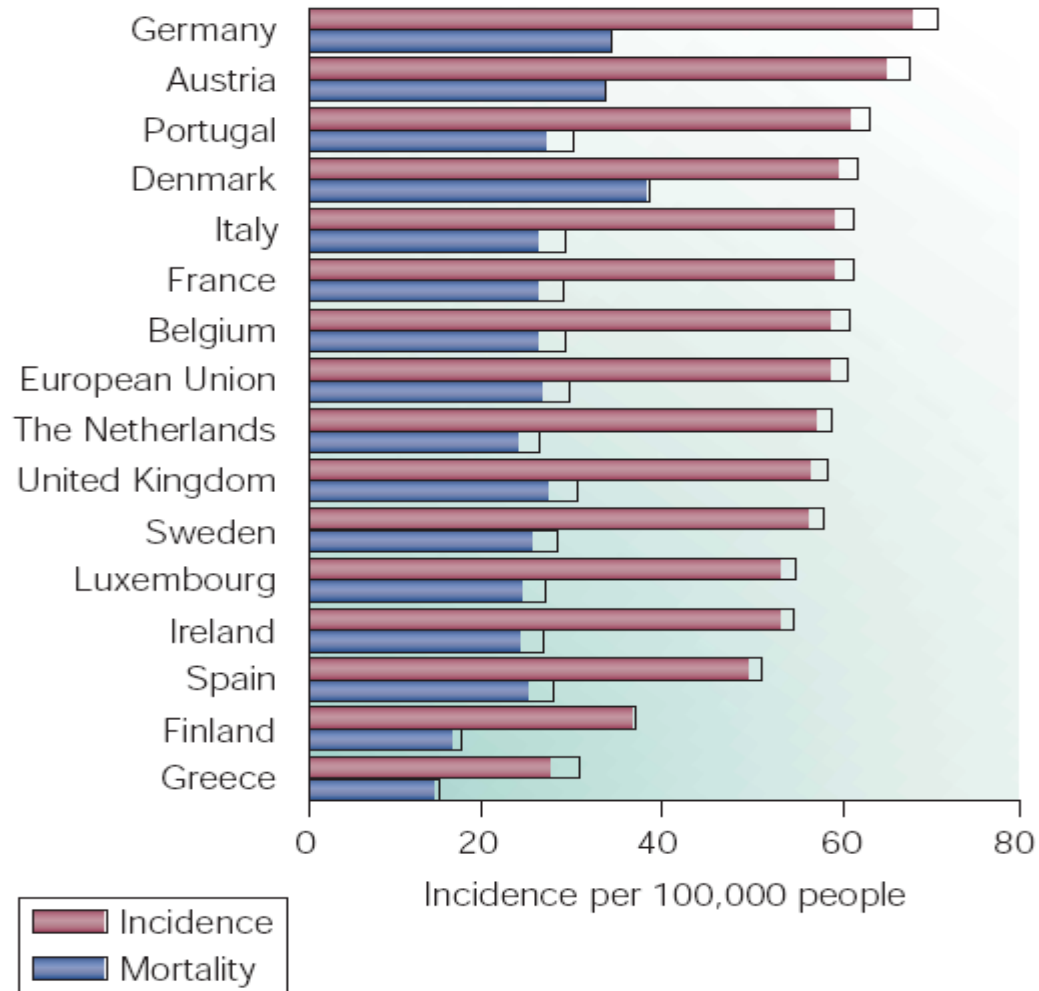
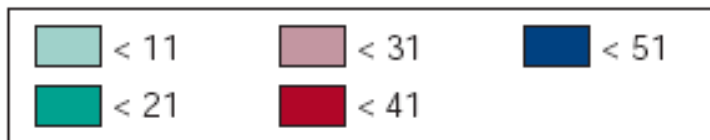
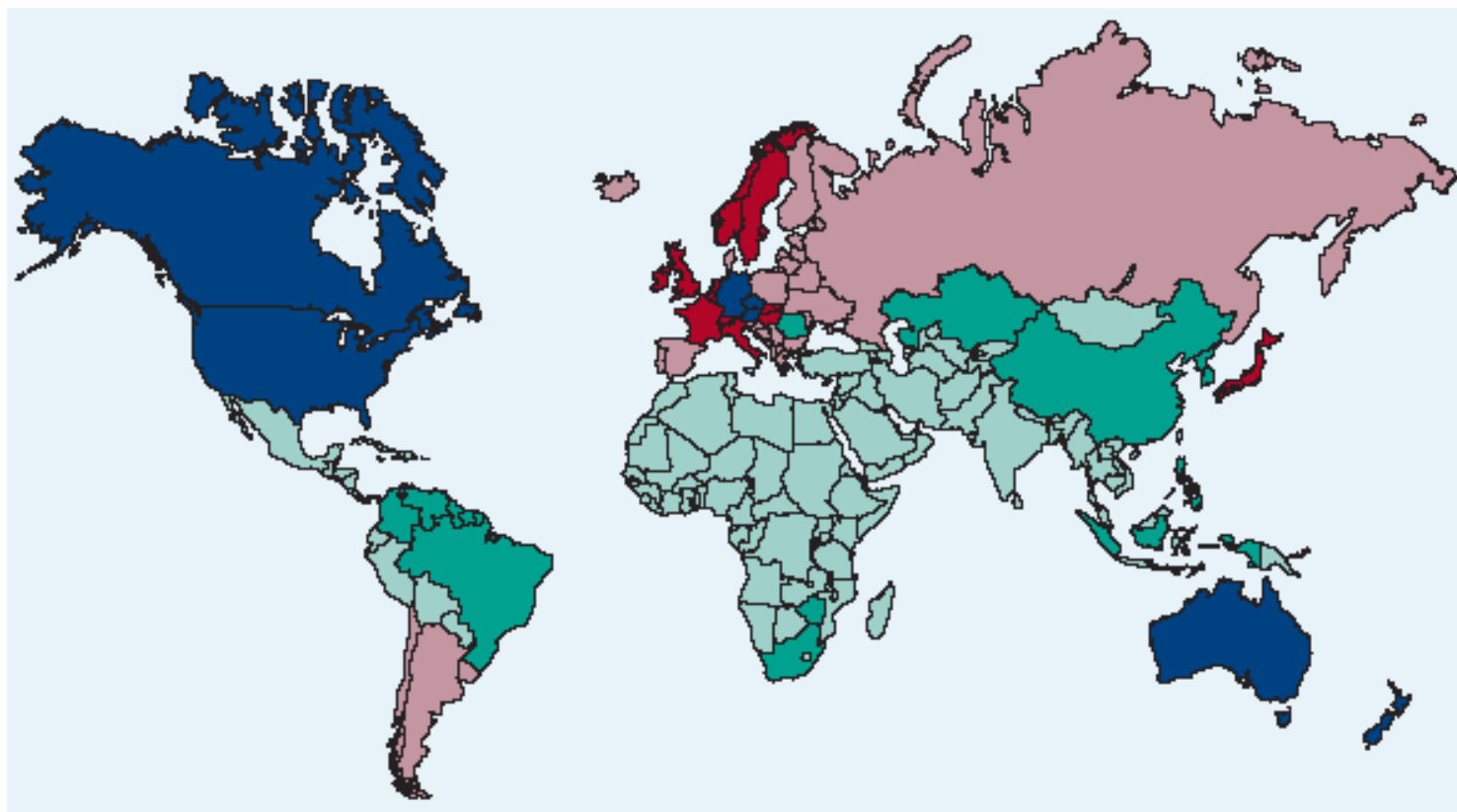
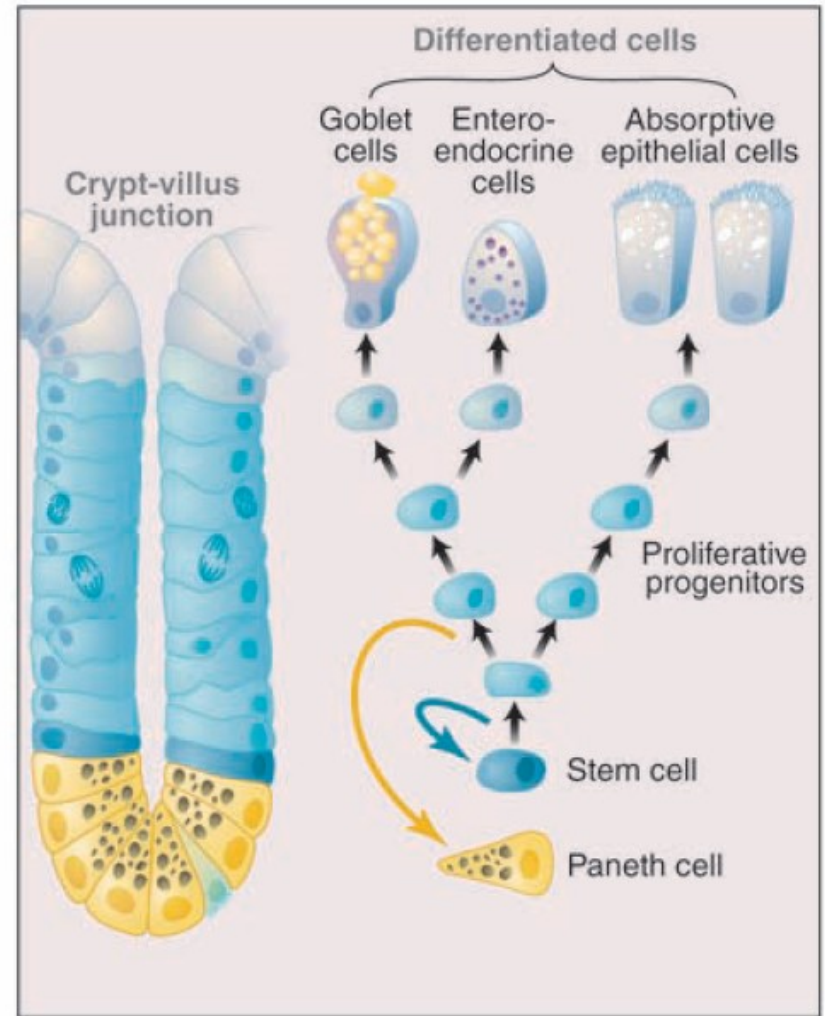
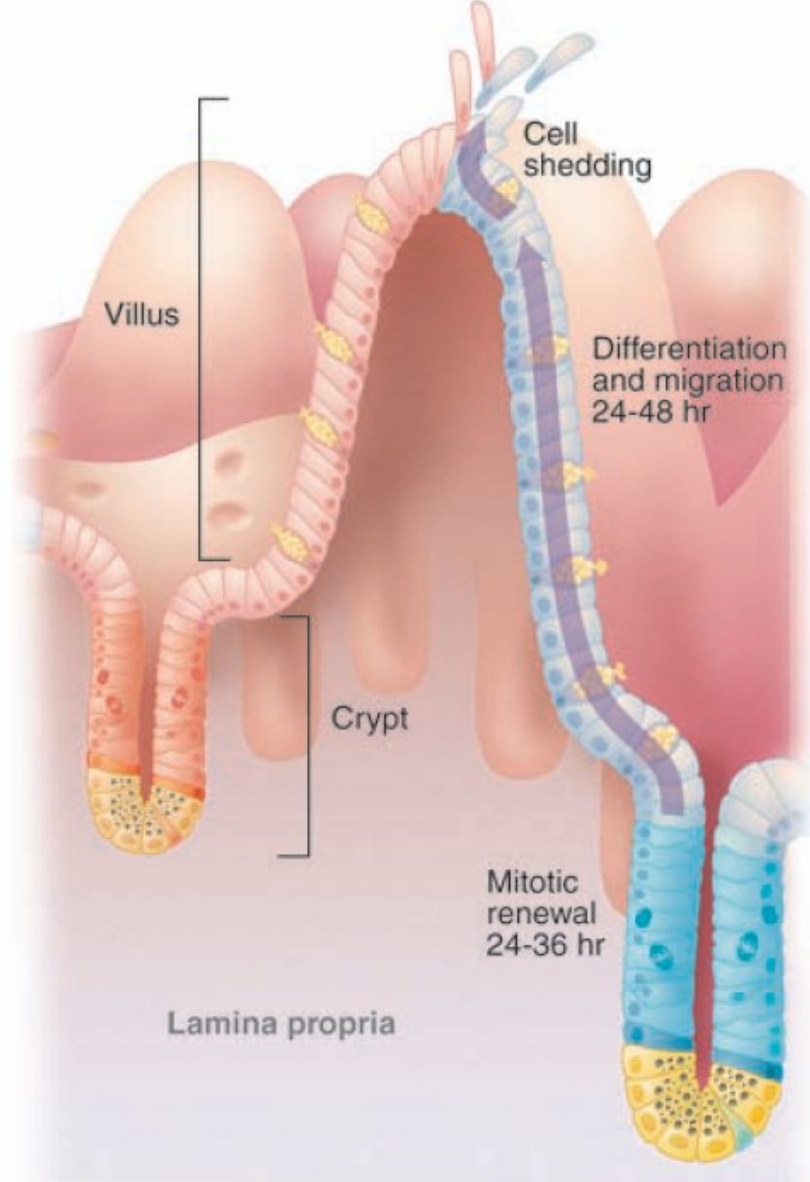


Figure 1 | **Colorectal cancer incidence in males in the European Union.** Rates of colorectal cancer by incidence, per 100,000 people, and mortality during 1996. Data were collected from Eucan — a service that provides data on the incidence and mortality of 24 key cancers in 15 member states of the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

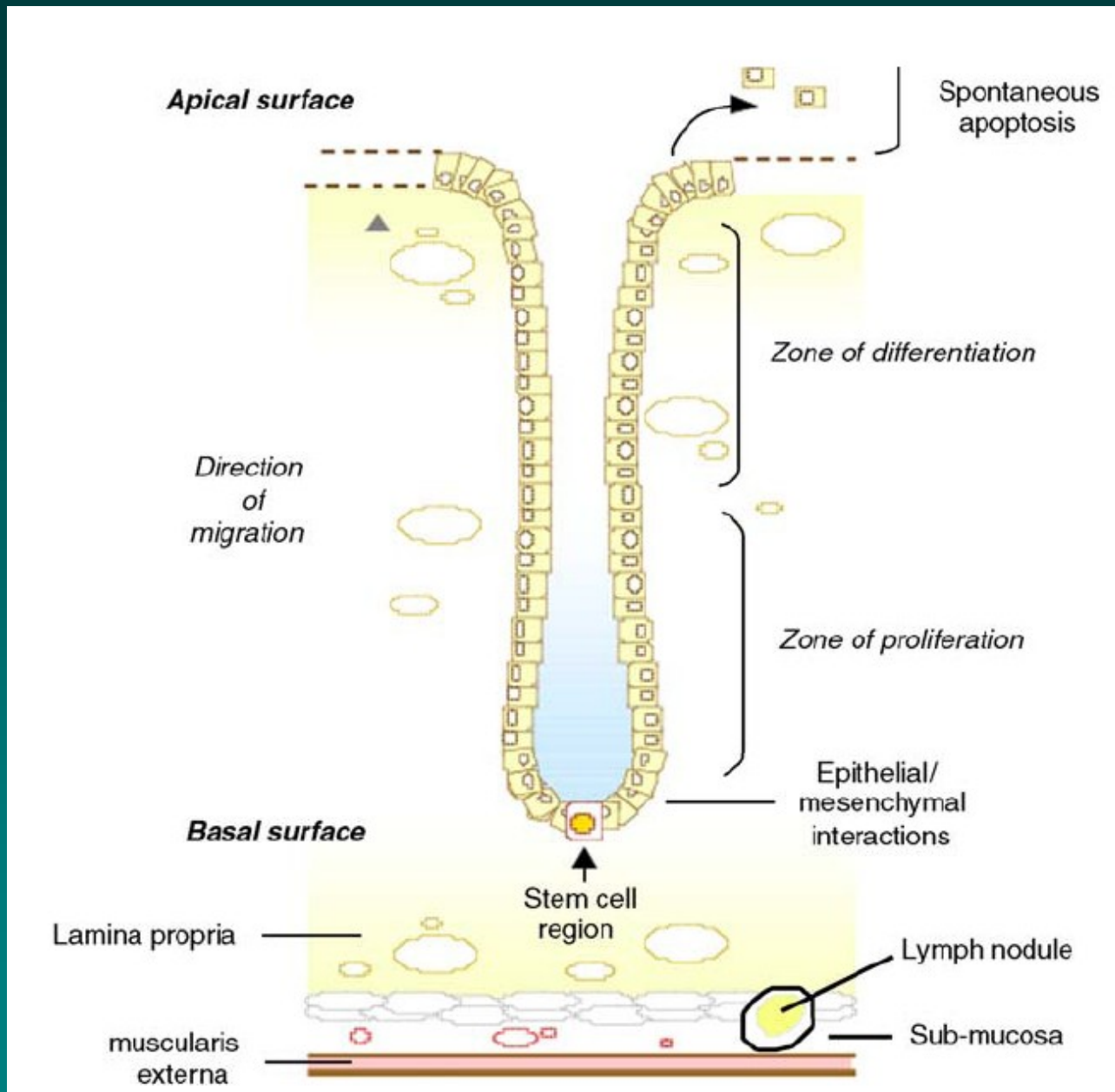
**a** Incidence rates of colorectal cancer





**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.

# Rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou ve střevní kryptě



# Homeostáza ve tkáních

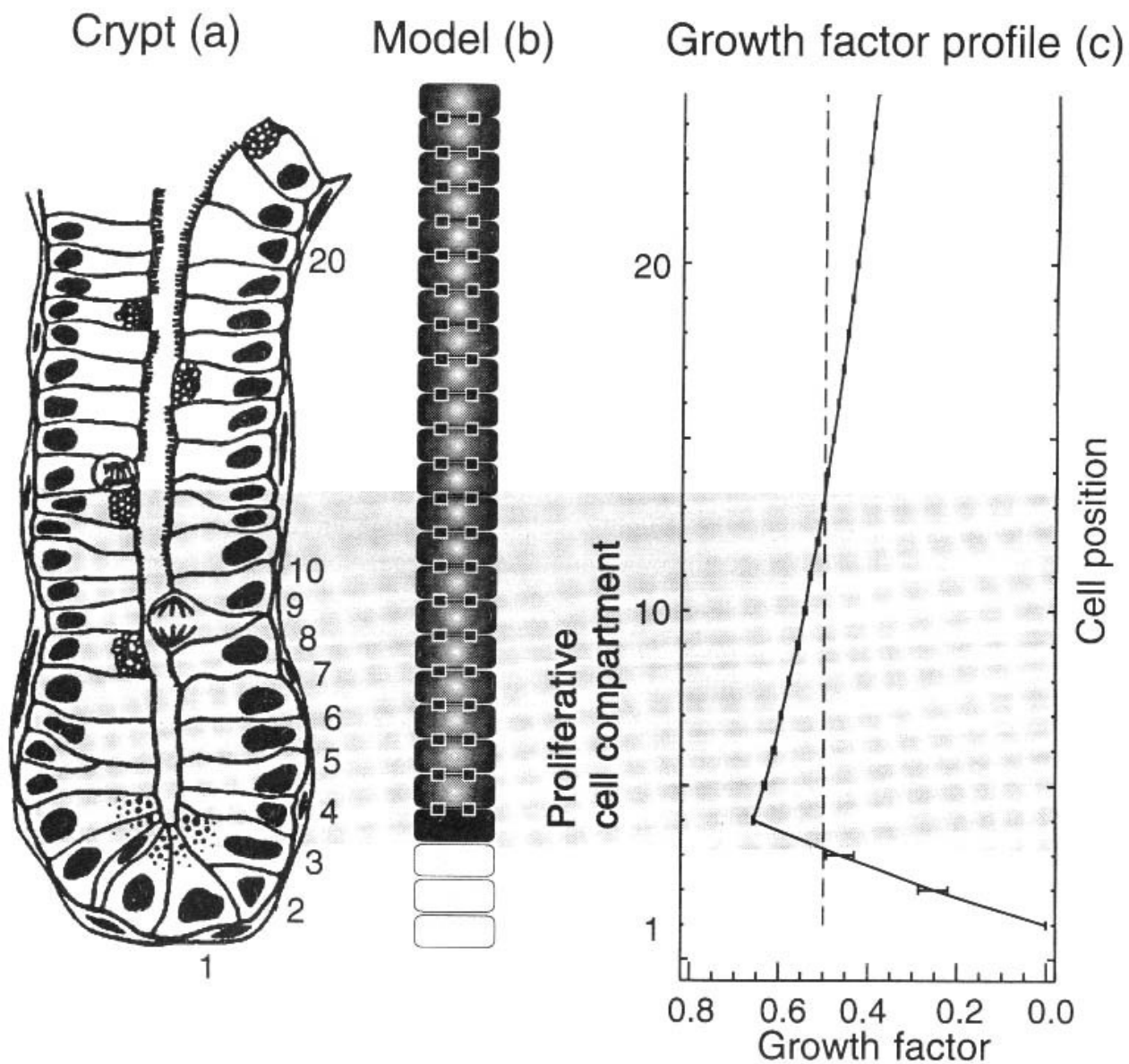
je udržována integrovaným systémem komunikačních mechanismů (mimo-, vnitro- a mezibuněčných) a reguluje chování buněk především s ohledem na schopnost proliferace, diferenciace, adaptivní odpovědi a apoptózy.

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.

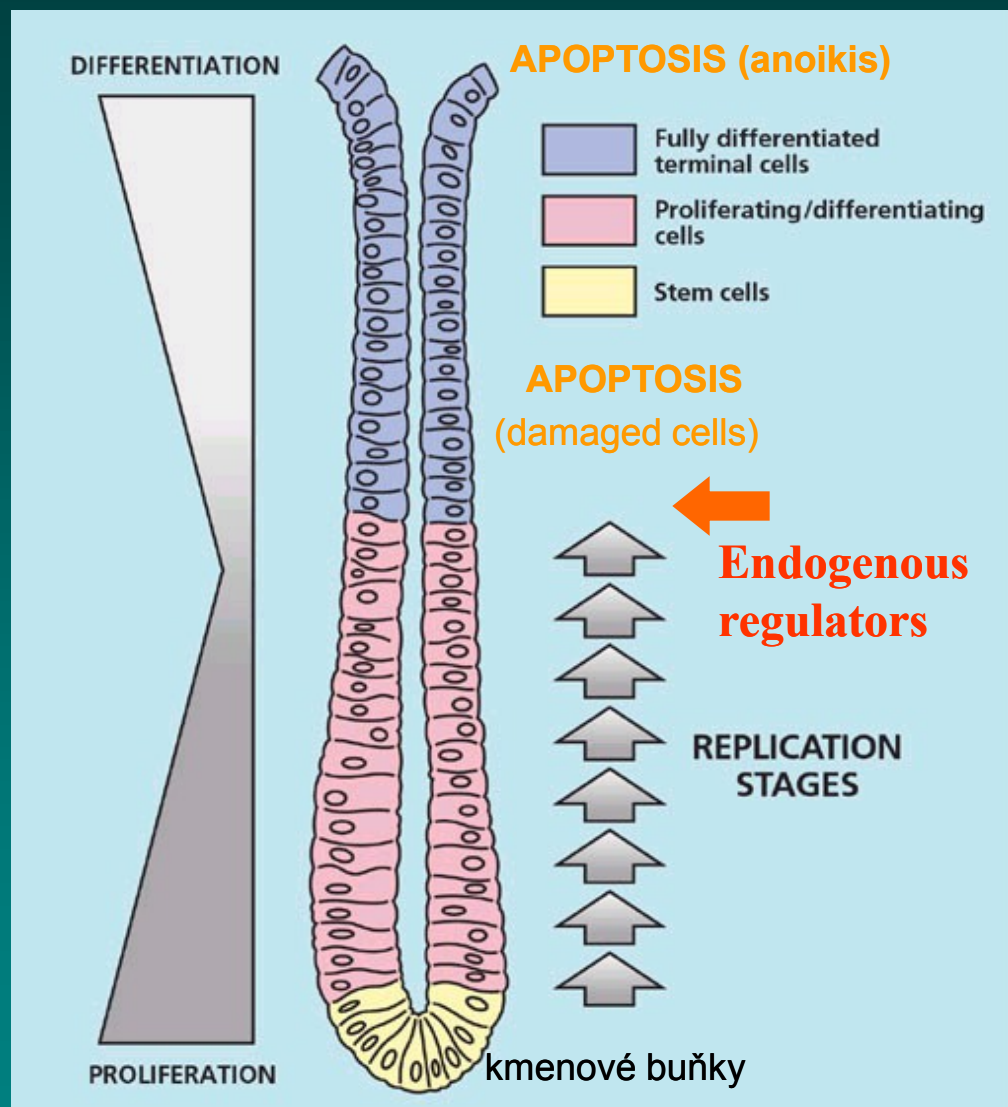
## Střevní krypta a profil růstových faktorů

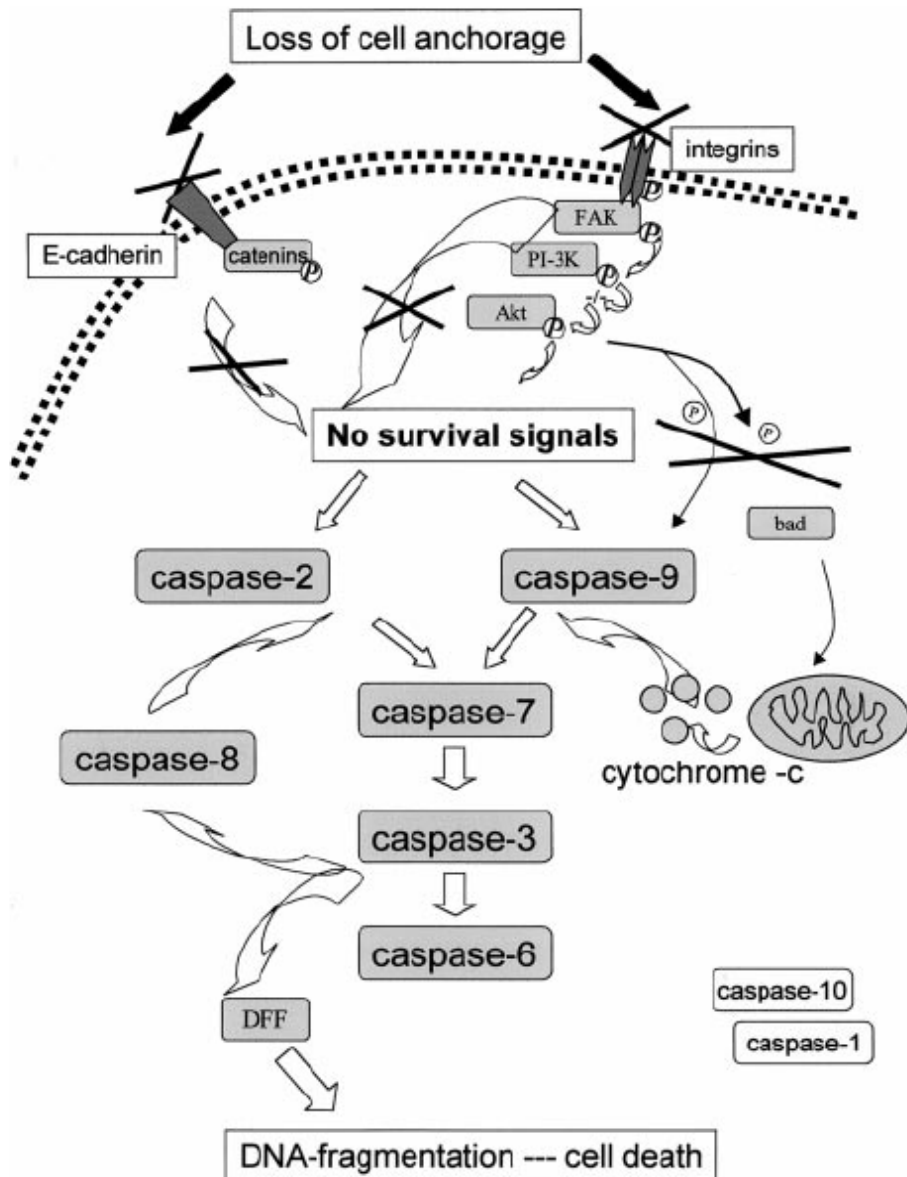




# EPITEL TLUSTÉHO STŘEVA (kolonu)

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



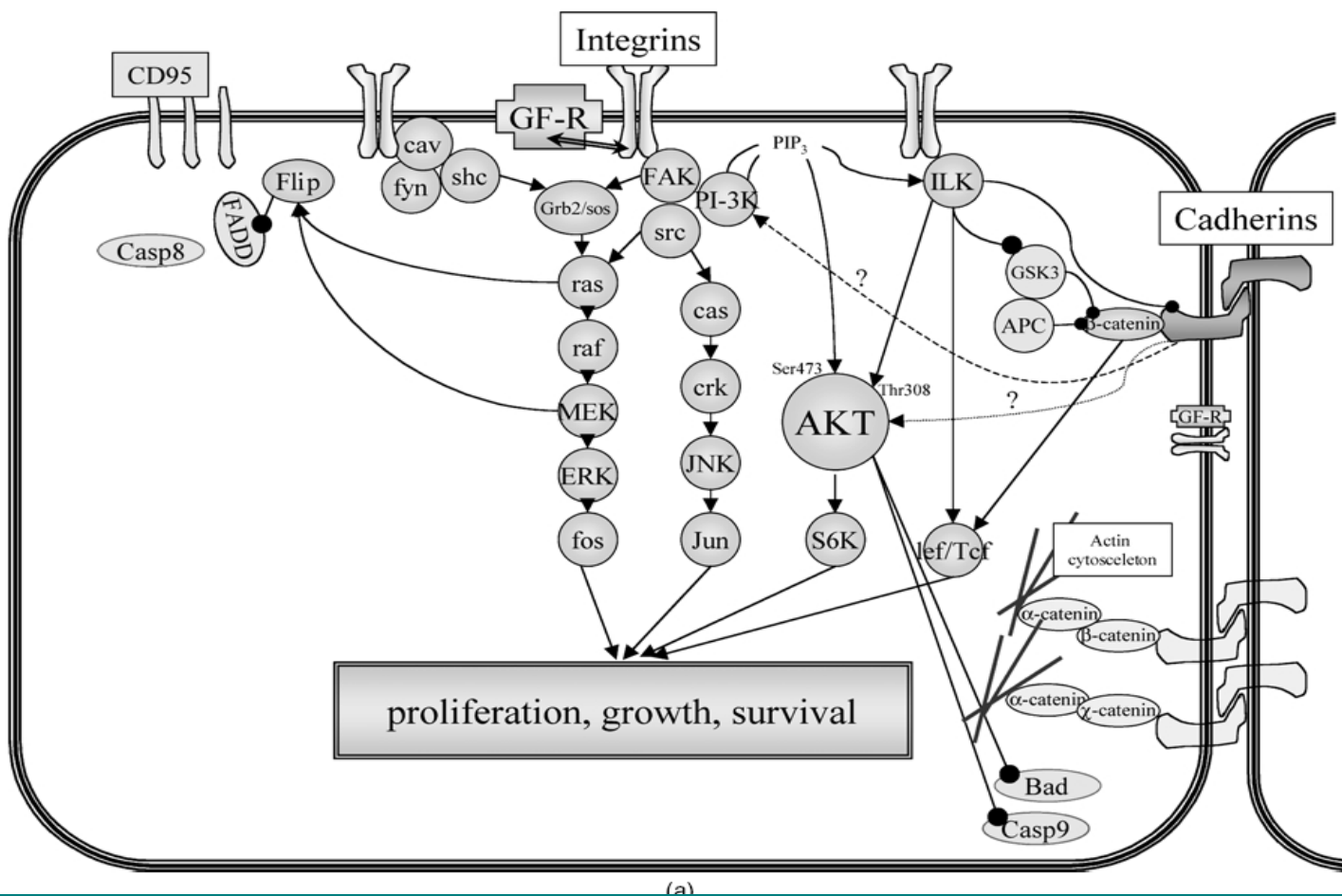


## Signal transduction pathways associated with ANOIKIS

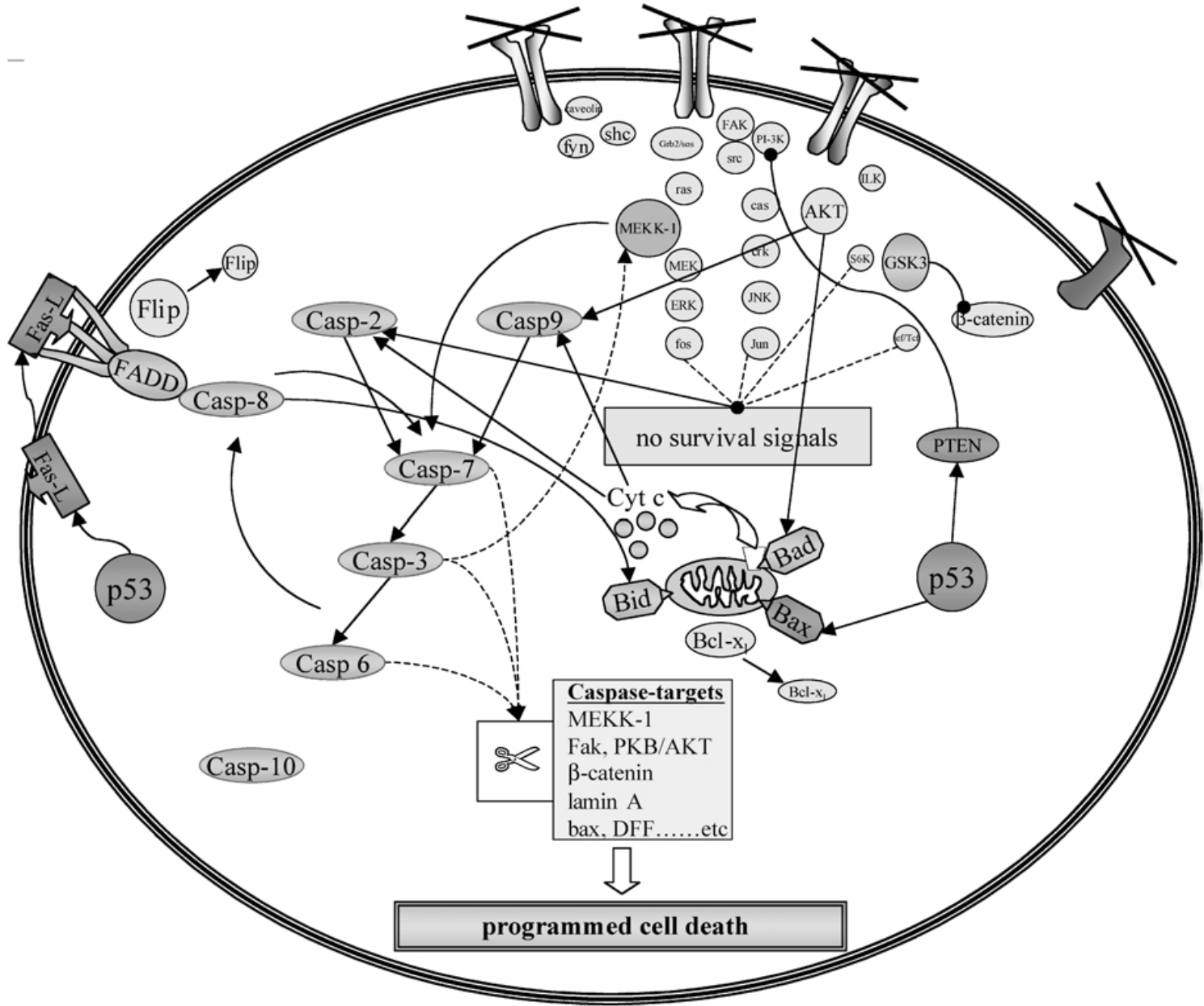
# „Survival signalling pathways“ aktivované při kontaktu buňka-buňka a buňka - ECM

**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), phosphatidylinositide- (3,4,5) triphosphate 3 (PIP3), Protein kinase B (PKB/AKT), ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun-NH<sub>2</sub>-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)].

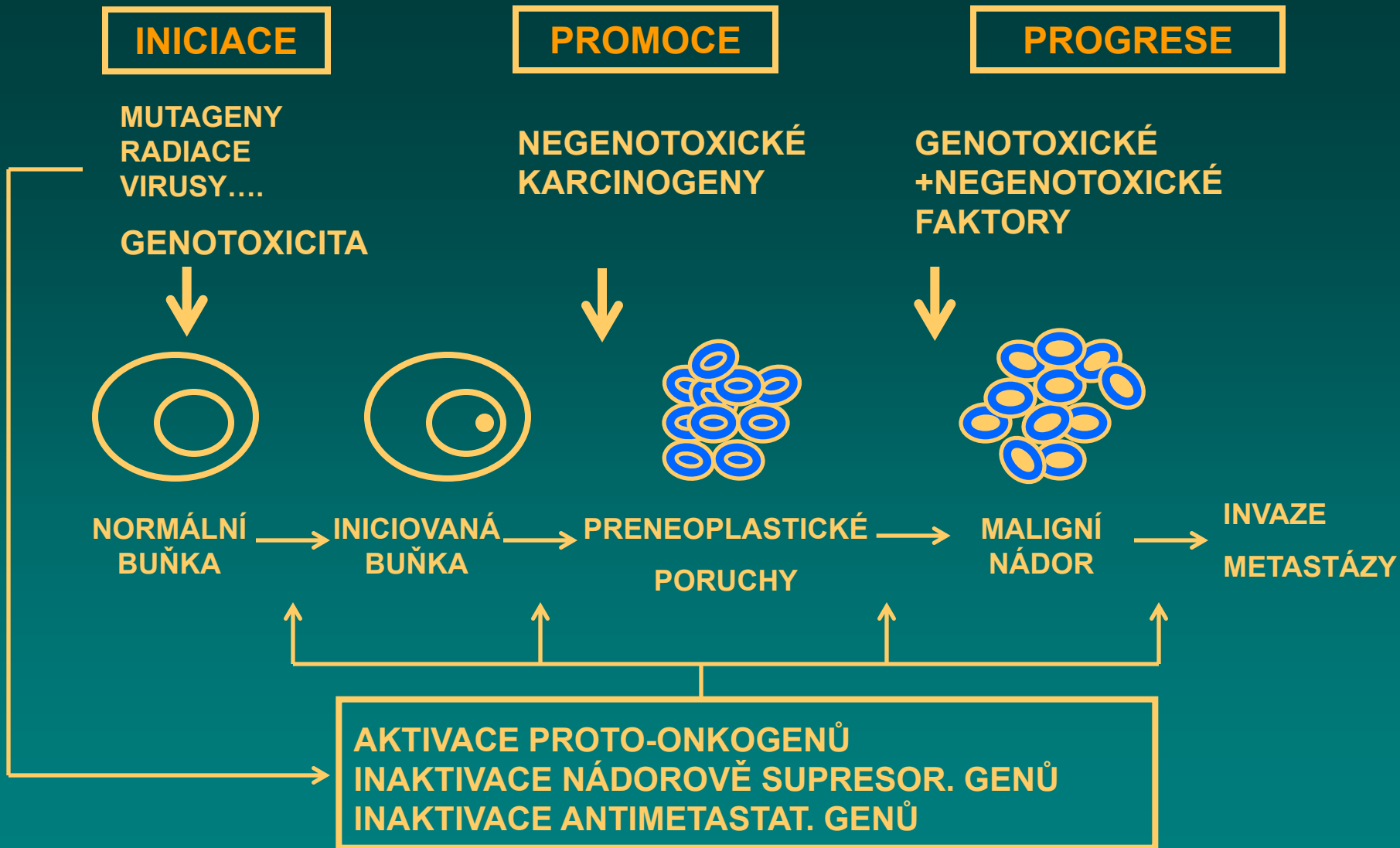
(Continued on next page.)



# Přenos signálů po ztrátě kontaktu vedoucí k indukci anoikis

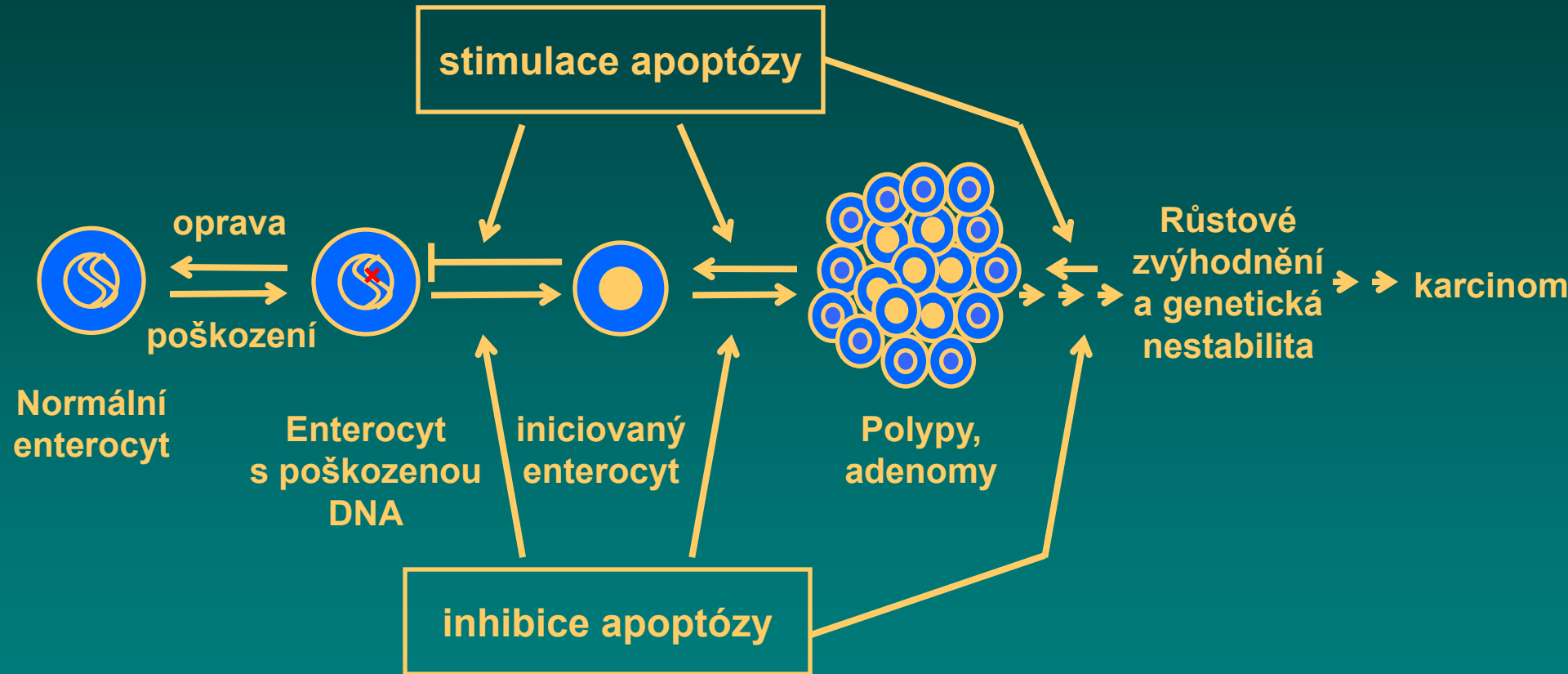


(b)



**Mnohostupňový proces karcinogeneze**

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



# 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.

## 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



# 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

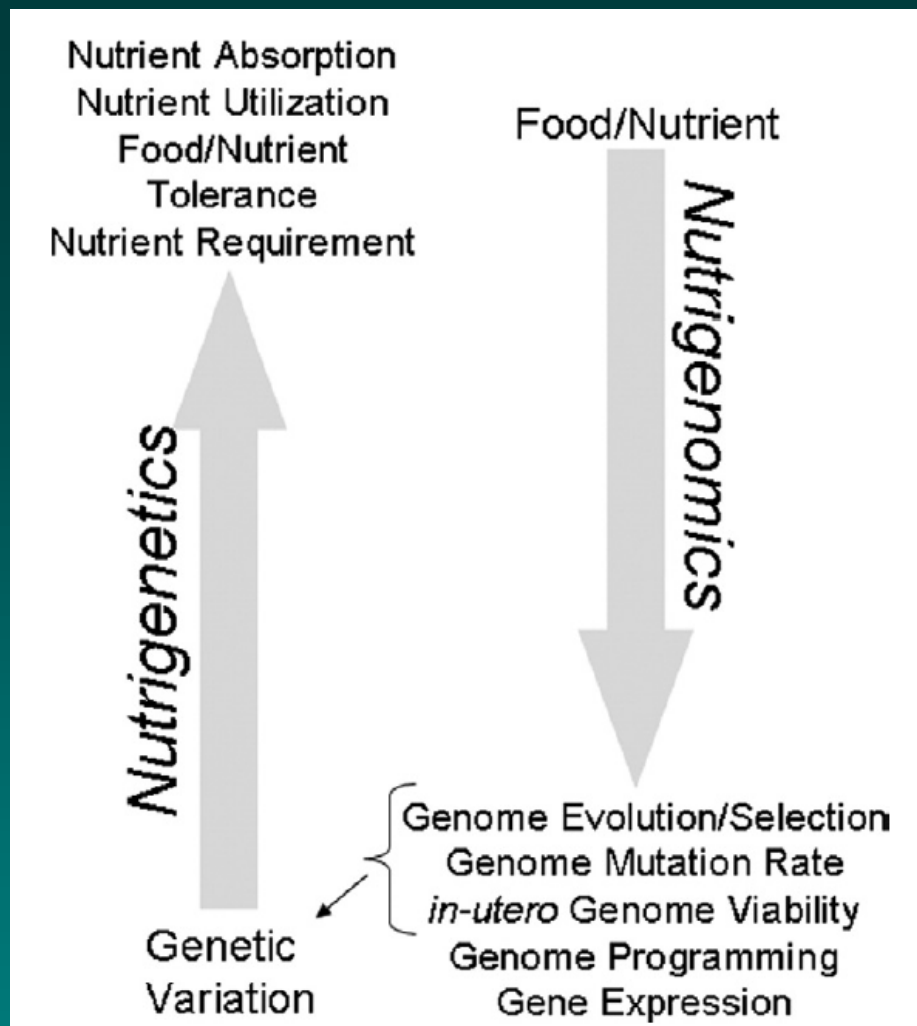
**pozitivní korelaci mezi příjmem tuků a nádory prsu, kolonu a prostaty.**

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

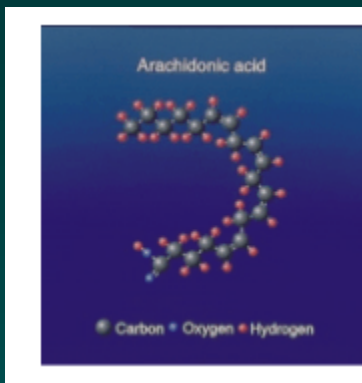
**vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK, PUFAs)**

**tříd n-3 a n-6**



Stover PJ, J Am Diet Assoc 2008

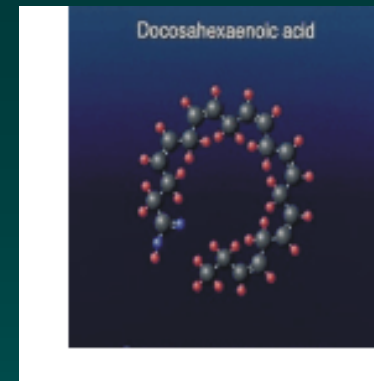
**Figure 1.** Nutrient-genome interactions. Nutritional genomics encompasses both nutrigenetics, the influence of genetic variation on nutrient utilization/metabolism, food tolerances, and nutrient requirements; and nutrigenomics, the modulatory role of nutrients on genome evolution, mutation rate, *in-utero* viability, programming, and expression. In turn, several of the nutrigenomic outcomes (ie, genome evolution) contribute to the genetic variation observed within genetically diverse human populations. NOTE: This figure is available online at [www.adajournal.org](http://www.adajournal.org) as part of a PowerPoint presentation.



# Zdroje tuků

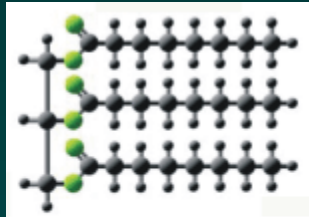
## živočišné a rostlinné

### 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. palmitolejová, 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, diferenciaci 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

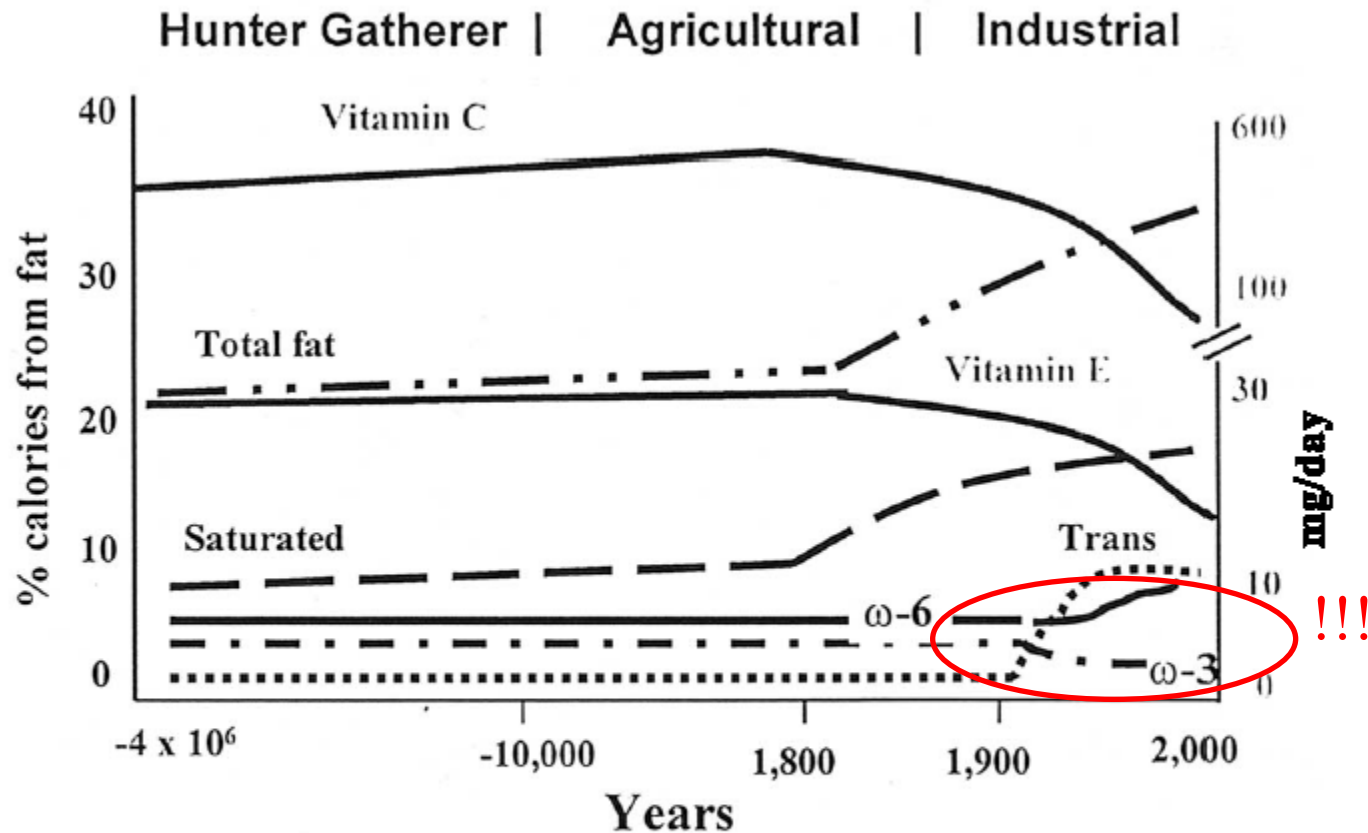


Fig. 1. Hypothetical scheme of fat, fatty acid ( $\omega$ 6,  $\omega$ 3, *trans* and total) intake (as percentage of calories from fat) and intake of vitamins E and C (mg/d). Data were extrapolated from cross-sectional analyses of contemporary hunter-gatherer populations and from longitudinal observations 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 dvojně 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 dvojně vazby od metylovaného konce molekuly

Téměř všechny dvojně vazby jsou ve víceméně stabilní cis - konfiguraci.

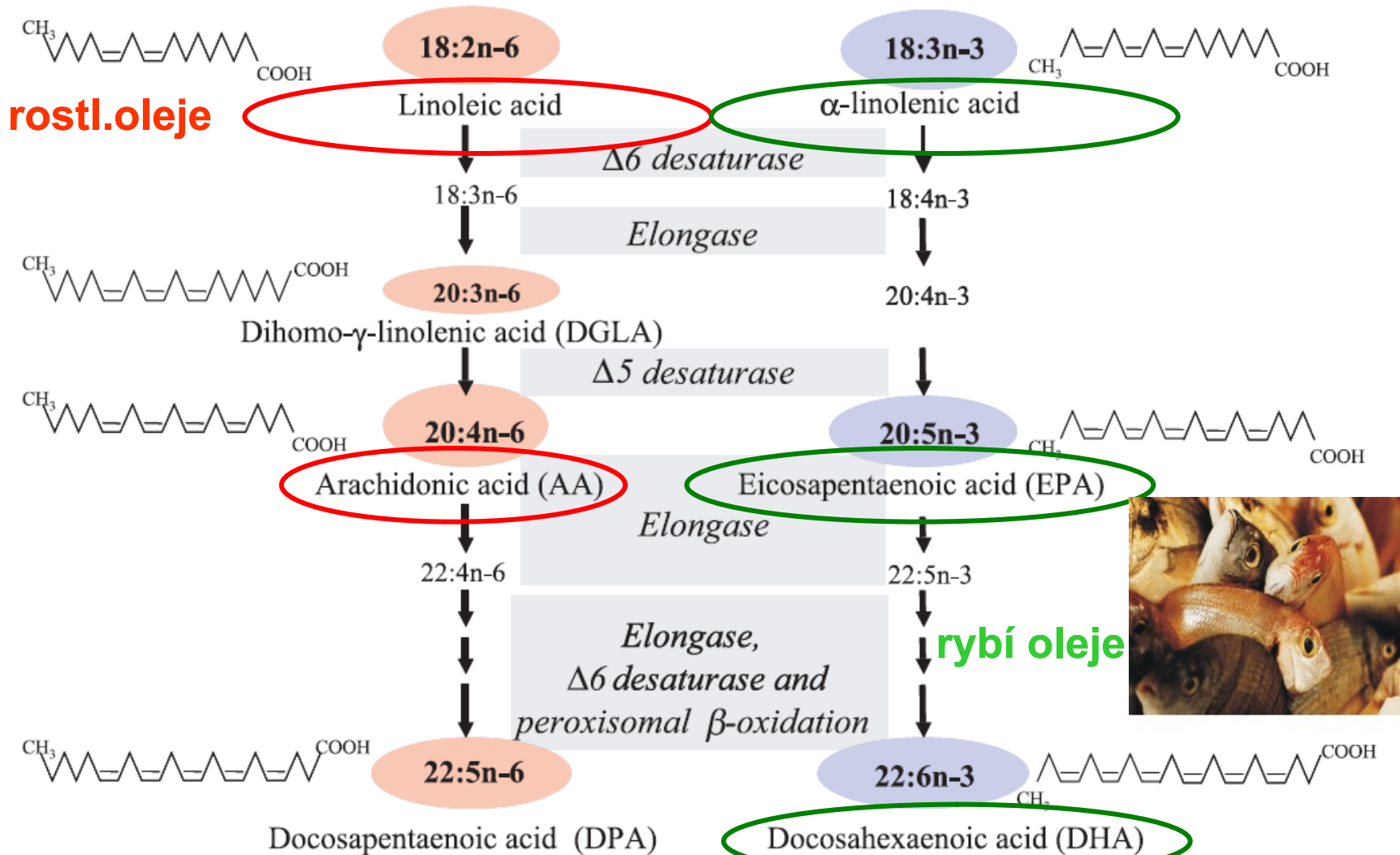
Živočichové nedovedou syntetizovat n-3 a n-6 PUFAs de novo ani nedovedou přeměnit jednu sérii v druhou.

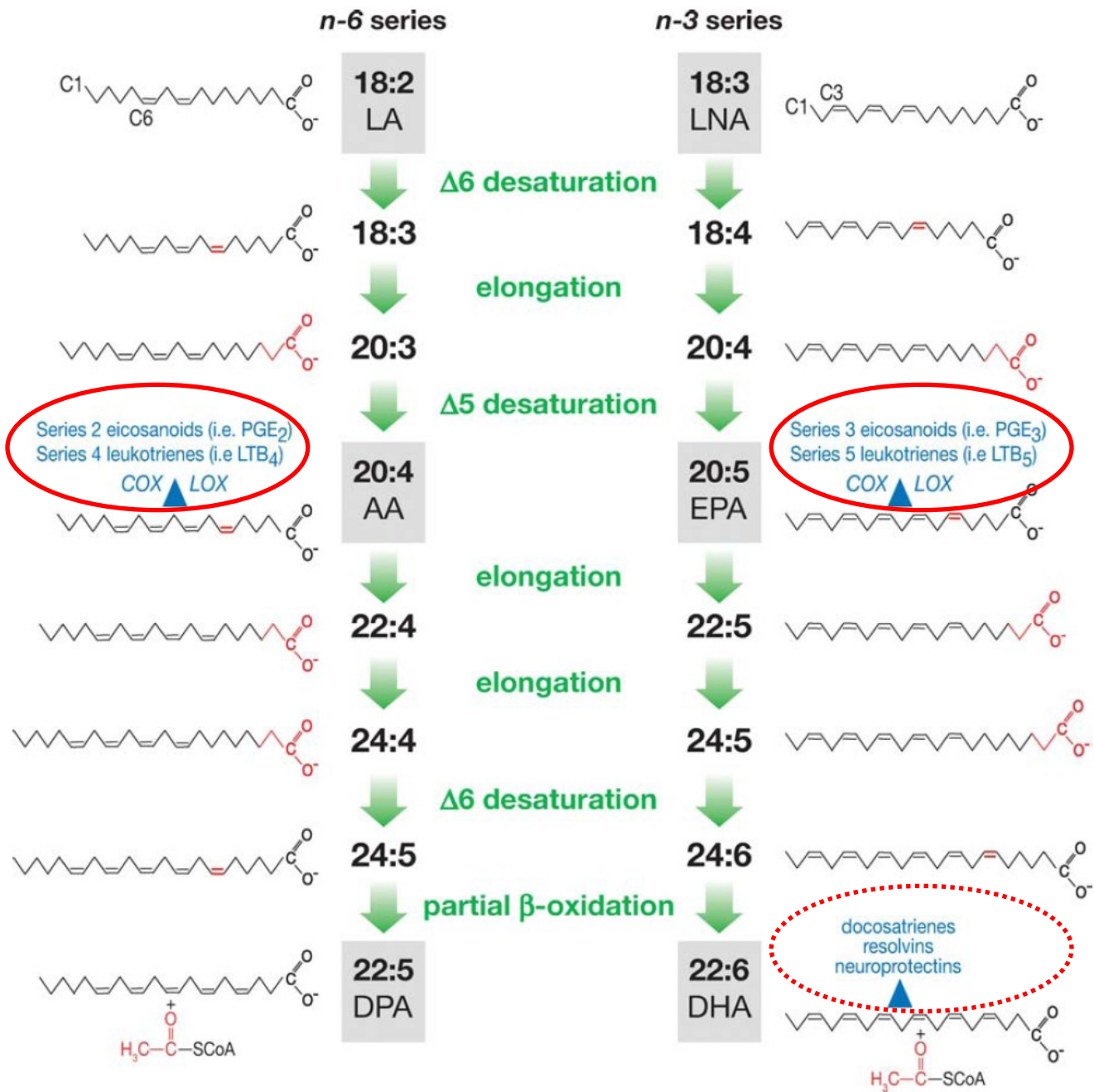
Tyto **ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY** musí být obsaženy v potravě podobně jako vitamíny. Jsou životně důležité jako složka všech membrán a permeabilní bariéry pokožky a jako prekursory eikosanoidů a s nimi souvisejících látek, které hrají důležitou regulační úlohu ve tkáních.

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

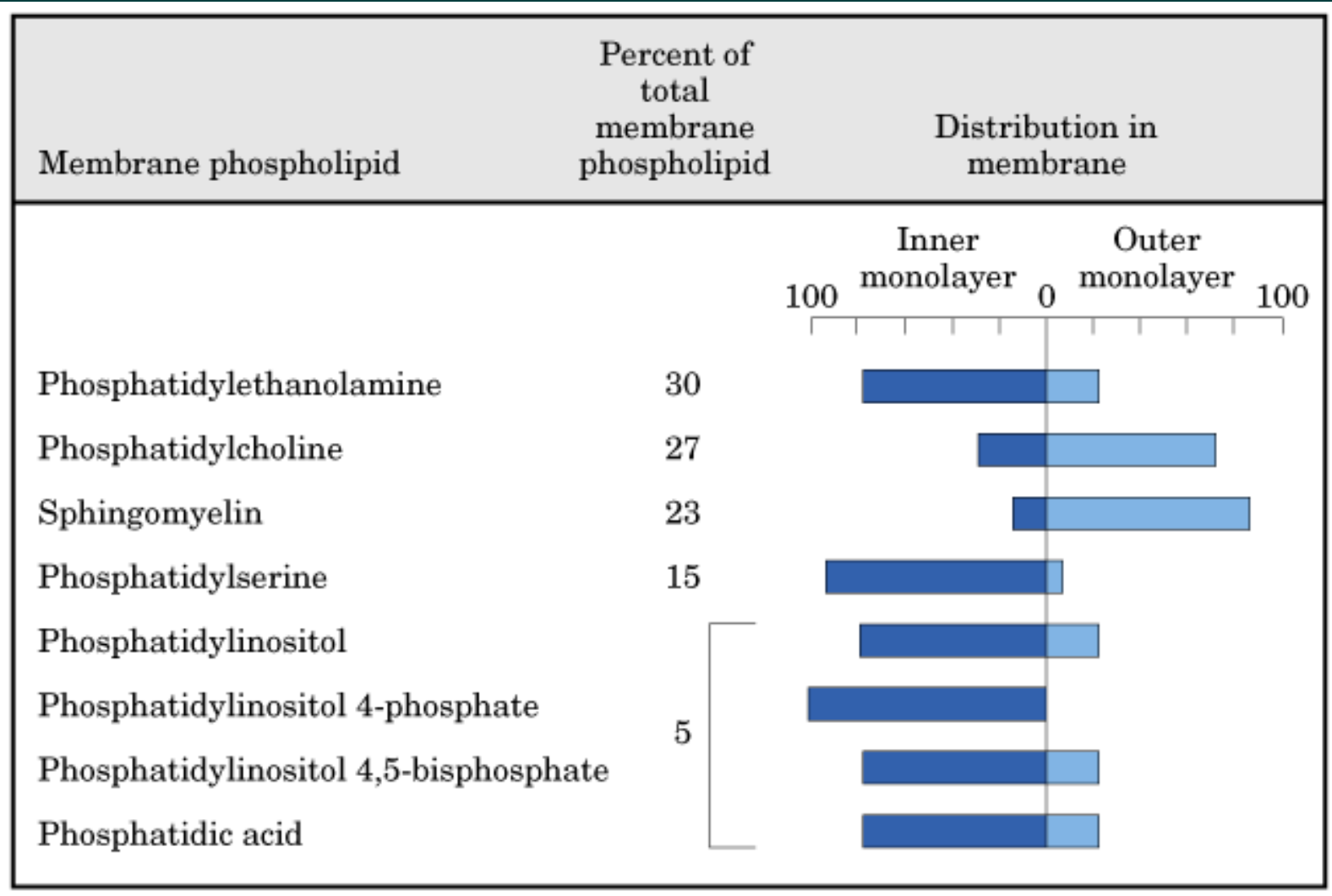
# VYSOCE NENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY (VNMK)

(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, $\omega$ -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, $\omega$ -3)

kys. eikosapentaenová (20:5) a dokosaheptaenová (22:6)  
z rybích a některých rostl. olejů (pupalka, len, rakytník)

V experimentálních systémech často inhibiční účinek pro  
vznik a rozvoj nádorů



**TUKY Z POTRAVY z potravy ovlivňují počátek a rozvoj řady onemocnění včetně nádorových. Existují v zásadě dvě úrovně ovlivnění: změny složení mastných kyselin (MK) v buněčných membránách**  
**přímá kontrola procesů v jádře na úrovni transkripce genů**  
**n-3 a n-6 PUFA jsou metabolicky i funkčně odlišné. Jejich rovnováha je důležitá pro homeostázu a normální vývoj. Efekty jsou pleiotropní.**

**Zatímco proteiny jsou geneticky determinovány, složení buněčné membrány s ohledem na lipidy (a tím i řada buněčných funkcí jako je aktivita membránových enzymů a přenašečů, vazba hormonů, mechanismy signálové transdukce) je z velké části závislé na příjmu z potravy.**  
**n-3 a n-6 PUFA mohou účinně a přímo řídit transkripci specifických genů (např. geny kódující lipogenní proteiny, delta desaturázy atd.).**

Tak může příznivý a nepříznivý účinek tuků na různé choroby zahrnovat kombinaci interaktivních regulačních mechanismů:

**akutní, rychlá a přímá regulace exprese genů**  
**dlouhodobá adaptivní modulace složení membrán, která může přímo ovlivnit příjem a přenos signálů hormonů, cytokinů, produkci eikosanoidů apod.**

Během průmyslové revoluce se drasticky poměr n-6:n-3 PUFA. V tzv. západní dietě je dnes místo 1:1 až 10-25:1.

## PREVENCE

**Epidemiologické studie** – snížená incidence nádorů (kolonu) v populacích konzumujících velké množství  $\omega$ -3 VNMK z mořské stravy

### **Experimentální studie**

$\omega$ -3 VNMK inhibují karcinogeny-indukovanou karcinogenezi  
redukuje růst transplantovaných nádorů u laboratorních zvířat  
snižují proliferaci a indukují apoptózu u nádorových buněk kolonu *in vitro*.

**Klinické studie** – EPA a DHA inhibují proliferaci epiteliálních buněk kolonu u pacientů s adenomy a vysokým rizikem nádorového onemocnění

## TERAPIE

Při **chirurgických zákrocích** předoperační perorální nebo pooperační enterální či parenterální dieta s  $\omega$ -3 VNMK zlepšuje postoperační zánětlivou a imunitní odpověď a snižuje infekci.

Dieta s  $\omega$ -3 VNMK zlepšuje **nádorovou kachexii a kvalitu života**

**Kombinace se standartní terapií** (chemoterapie, záření)

dieta s  $\omega$ -3 VNMK netoxický způsob zvýšení účinků terapie

samotné použití  $\omega$ -3 VNMK užitečný přístup, jestliže je vyloučena toxická standartní terapie.

# Účinek různých typů olejů na růst nádorů tlustého střeva u atymových myší

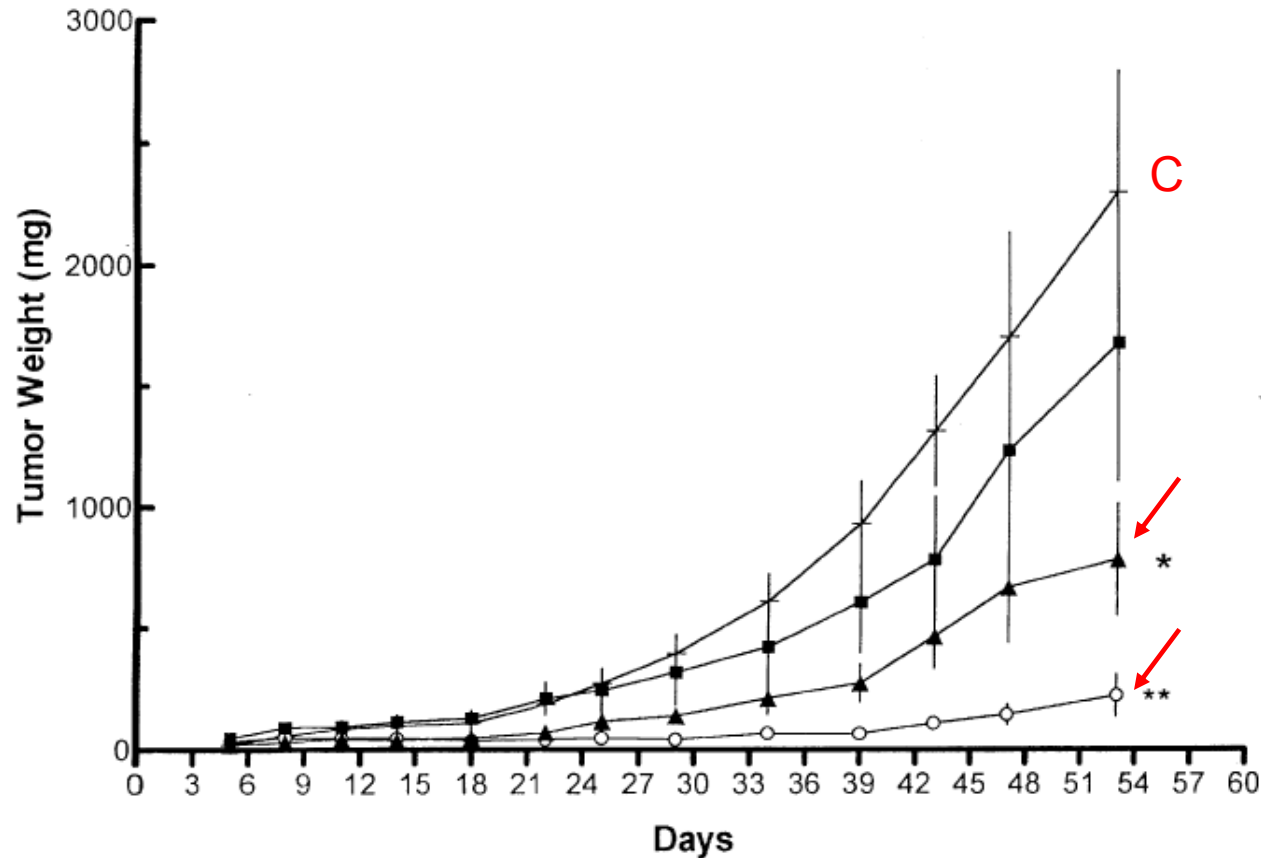


Fig. 1. Effect of dietary fatty acids (corn oil, menhaden oil, golden algae oil) on the growth of WiDr tumor in athymic mice. Tumor weights were estimated using the formula (tumor weight in mg =  $A \times B \times C/2$ ) where  $A$ ,  $B$ ,  $C$  represent the three perpendicular diameters of the tumor in millimeters. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM from 5 to 6 animals.  $P$ -values were compared to 24% corn oil. Label keys: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  at day 53; -, 24% corn oil treated; ■, 8% corn oil treated; ▲, 8% corn oil and 16% menhaden oil treated; ○, 8% corn oil and 16% golden algae oil treated.

# Prokázány změny ve složení a metabolismu lipidů!!!!

v plazmě nádorových pacientů

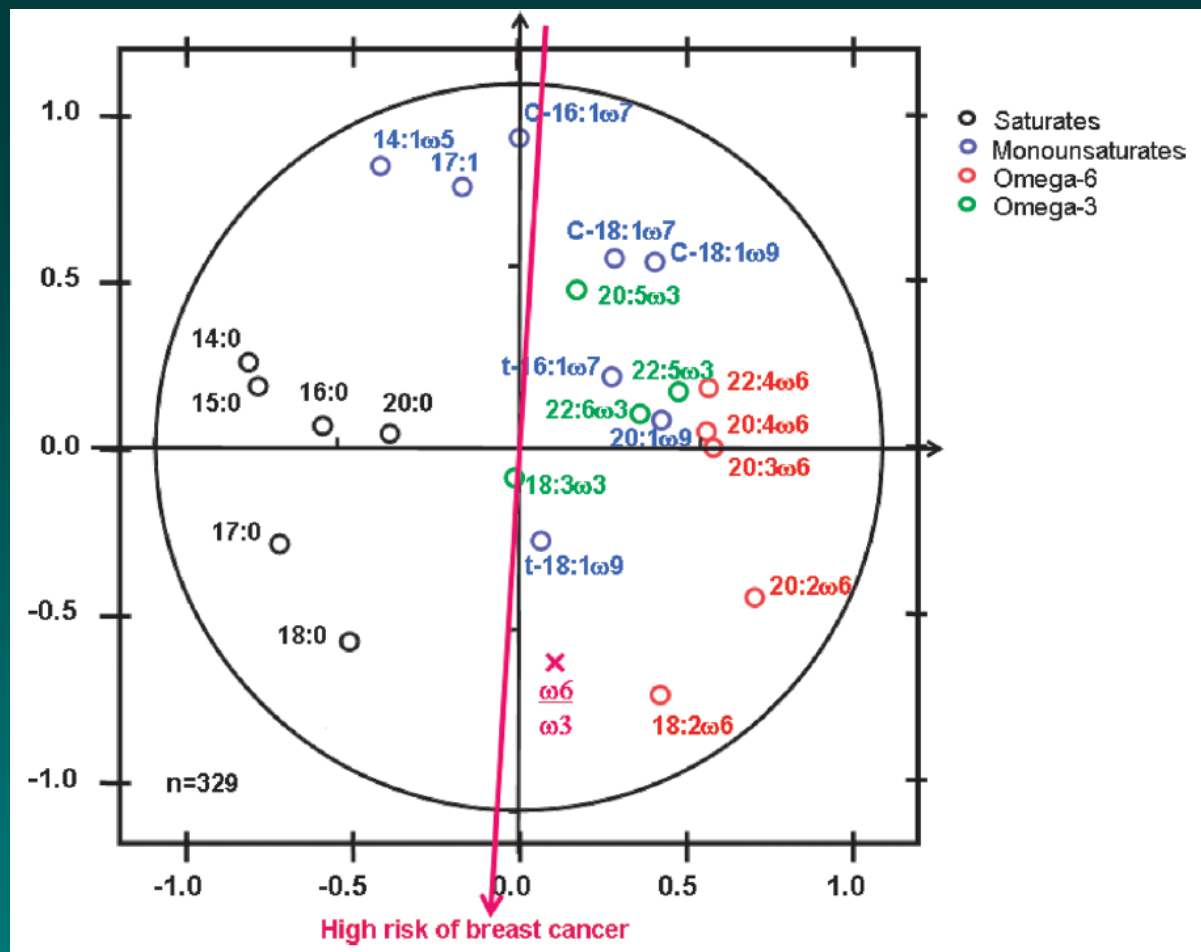
v nádorové tkáni a buňkách ve srovnání s nenádorovými

Zejména snížení obsahu  $\omega$ -3 VNMK (DHA) ve srovnání s  $\omega$ -6 (kys. linolová a arachidonová)

Integrovaný pohled na komplexní lipidové interakce, které určují výsledný tzv. LIPIDOM – lipidový profil jednotlivce.

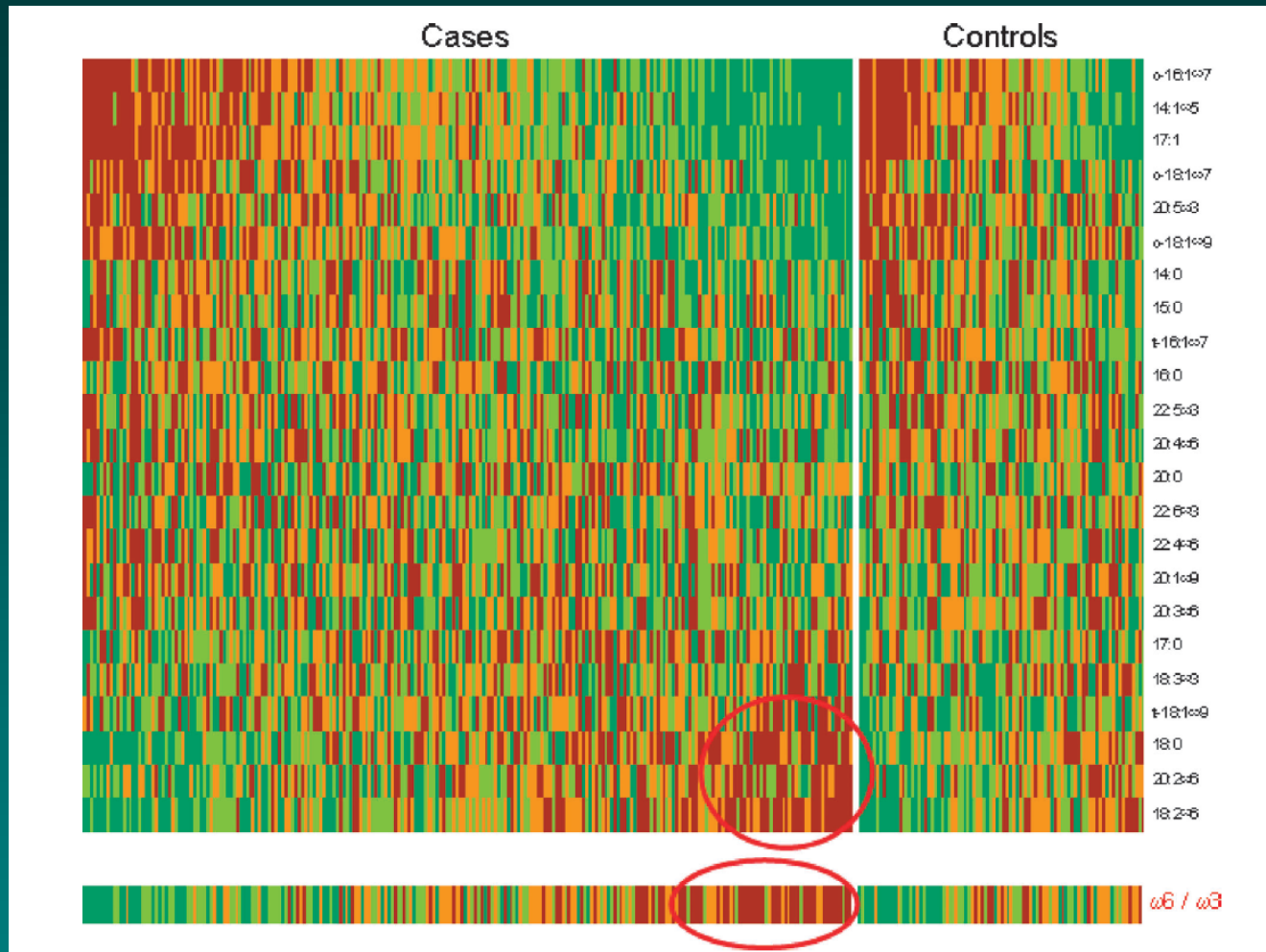
S protekcí určitých typů nádorů (např. prsu) spojen složený indikátor kombinující zvýšené mononenasyčené MK a nízký poměr omega6/omega 3. Tento lipidom by se mohl stát templátem pro detekci rizika nádorů prsu ve vztahu k dietě.

Nutrigenomika, metabolomika, lipidomika – nová odvětví



**Figure 3.** Principal component analysis of adipose tissue fatty acids. In the scatter plot of the second principal component against the first principal component (in which the *X* axis represents the first principal component and the *Y* axis represents the second principal component), the coordinates of each fatty acid equals the coefficients of correlation between the fatty acid and the principal components. The unity correlation circle drawn defines the limits in which the fatty acids locate: the closer a fatty acid to this unity circle, the higher its contribution to the definition of the principal components. The  $\omega_6/\omega_3$  ratio is located as illustrative variables—i.e., it does not contribute to the definition of the principal components, but it is positioned in the scatter plot according to its correlation with the two principal components. *Red arrow*, increased risk of breast cancer, taking into account the OR associated with both the *X* and *Y* axis, adjusted for BMI, age, menopausal status, and height. The position of this arrow is almost superposed on the *Y* axis because the OR associated with the first component is close to 1, whereas the OR associated with the second principal component is 1.28 (95% CI, 1.11-1.49;  $P = 0.001$ ).

## Analýza (array) hladiny MK u benigních a maligních nádorů prsu



**Figure 4.** Fatty acid level array in patients with benign (controls) or malignant (cases) breast tumors. Each lane represents a patient, sorted according to its position on the second principal component as shown in Fig. 3. Each line represents one fatty acid, according to its correlation with the second principal component. Fatty acid values are represented as different colors for each quartile, from green (low) to red (elevated). *Bottom*, the  $\omega 6 / \omega 3$  ratio of PUFAs.



# Změny spektra MK v tukové tkáni krys po podávání alfa-linolenové a dokosahexaenové kyseliny

Diet, Cancer, and the Lipidome

**Table 1. Changes in rat WAT fatty acid composition induced by either  $\alpha$ -linolenic acid or DHA supplementation (16, 19)**

Fatty acids (mol%)	$\alpha$ -Linolenic acid		DHA	
	Control ( <i>n</i> = 12)	Supplemented ( <i>n</i> = 14)	Control ( <i>n</i> = 7)	Supplemented ( <i>n</i> = 6)
<b>Saturates</b>				
16:0	15.2	17.3	22.9	20.8
18:0	2.7	2.9	2.8	3.4
Total*	19.4	21.8	27	28.9
<b>Monounsaturates</b>				
<i>c</i> -18:1 $\omega$ 9	56.9	48.3 <sup>†</sup>	52.7	43.8 <sup>†</sup>
Total <sup>†</sup>	62.4	54.7 <sup>†</sup>	57.9	48.9 <sup>†</sup>
<b><math>\omega</math>6 PUFA</b>				
18:2 $\omega$ 6	13.9	13.4	12.2	11.1
Total <sup>§</sup>	14.4	13.7	12.7	11.3
<b><math>\omega</math>3 PUFA</b>				
18:3 $\omega$ 3	1.3	6.9 <sup>†</sup>	0.6	0.8
22:6 $\omega$ 3	0.1	0.1	0.1	8.2 <sup>†</sup>
Total <sup>  </sup>	1.4	7.0 <sup>†</sup>	0.7	9.3 <sup>†</sup>
<b>Ratio</b>				
$\omega$ 6/ $\omega$ 3	10.3	1.9 <sup>†</sup>	18.1	1.2 <sup>†</sup>

\*Including: 14:0, 15:0, 17:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, and 24:0.

<sup>†</sup>Within diet, significantly different from control values (*P* < 0.05).

<sup>§</sup>Including: 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, *c*-18:1 $\omega$ 7, and 20:1.

<sup>||</sup>Including: 18:3 $\omega$ 6, 20:2 $\omega$ 6, 20:3 $\omega$ 6, and 20:4 $\omega$ 6.

<sup>||</sup>Including: 20:3 $\omega$ 3, 20:5 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 3, and 22:6 $\omega$ 3.

WAT – white adipose tissue

# MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení $\omega$ -3 VNMK

- ▶ změny vlastností buněčných membrán (fluidita, lipidové rafty)

suprese biosyntézy eikosanoidů odvozených od AA – změna imunitní odpovědi a modulace zánětu, proliferace, apoptózy, tvorby metastáz a angiogeneze

ovlivnění signálové transdukce, aktivity transkripčních faktorů (NF $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ ) a genové exprese – změny metabolismu, buněčného růstu a diferenciaci

- ▶ změny metabolismu estrogenů – redukce estrogeny stimulovaného růstu

- ▶ zvýšená nebo snížená produkce volných radikálů (kyslíku, dusíku)

- ▶ mechanismy zahrnující citlivost k insulinu

# Složky lipidového metabolismu v buněčných signalizacích

## Mediátory a modulátory

SIGNÁL (např. cytokiny)

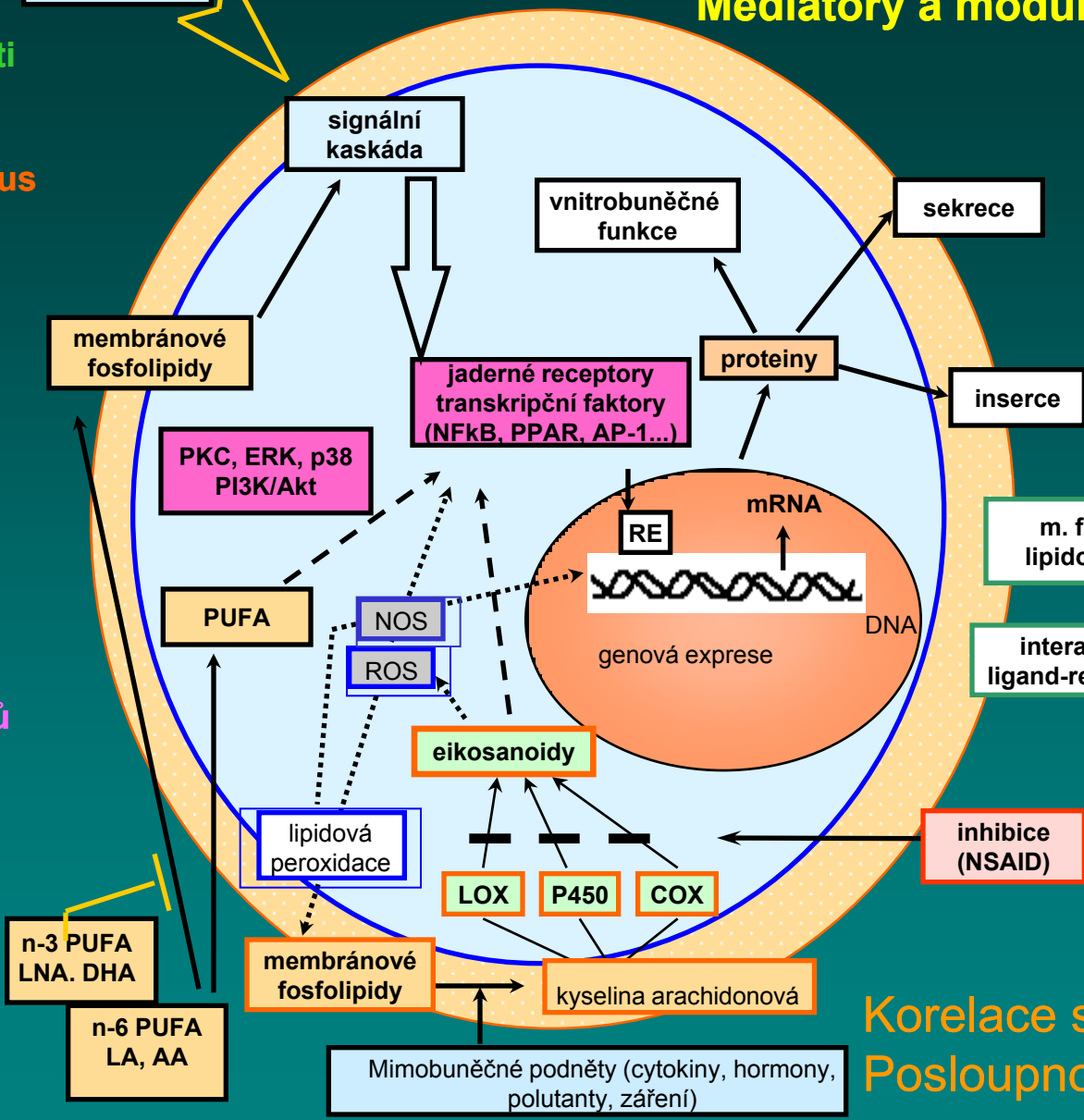
Biofyzikální vlastnosti membrán

Lipidový metabolismus  
Aktivace fosfolipáz  
Uvolňování a metabolizace AA  
eikosanoidy

Oxidativní metabolismus

Transdukce signálů (kinázy, fosfatázy)  
Aktivace membrán. i vnitrobun. receptorů – tr. faktorů

Exprese proteinů  
Exprese genů - mRNA



m. fluidita lipidové rafty

interakce ligand-receptor

inhibice (NSAID)

n-3 PUFA  
LNA, DHA

n-6 PUFA  
LA, AA

Mimobuněčné podněty (cytokiny, hormony, polutanty, záření)

Korelace s cytokinetikou  
Posloupnost dějů

## Phospholipid structure and the orientation of phospholipids in membrane

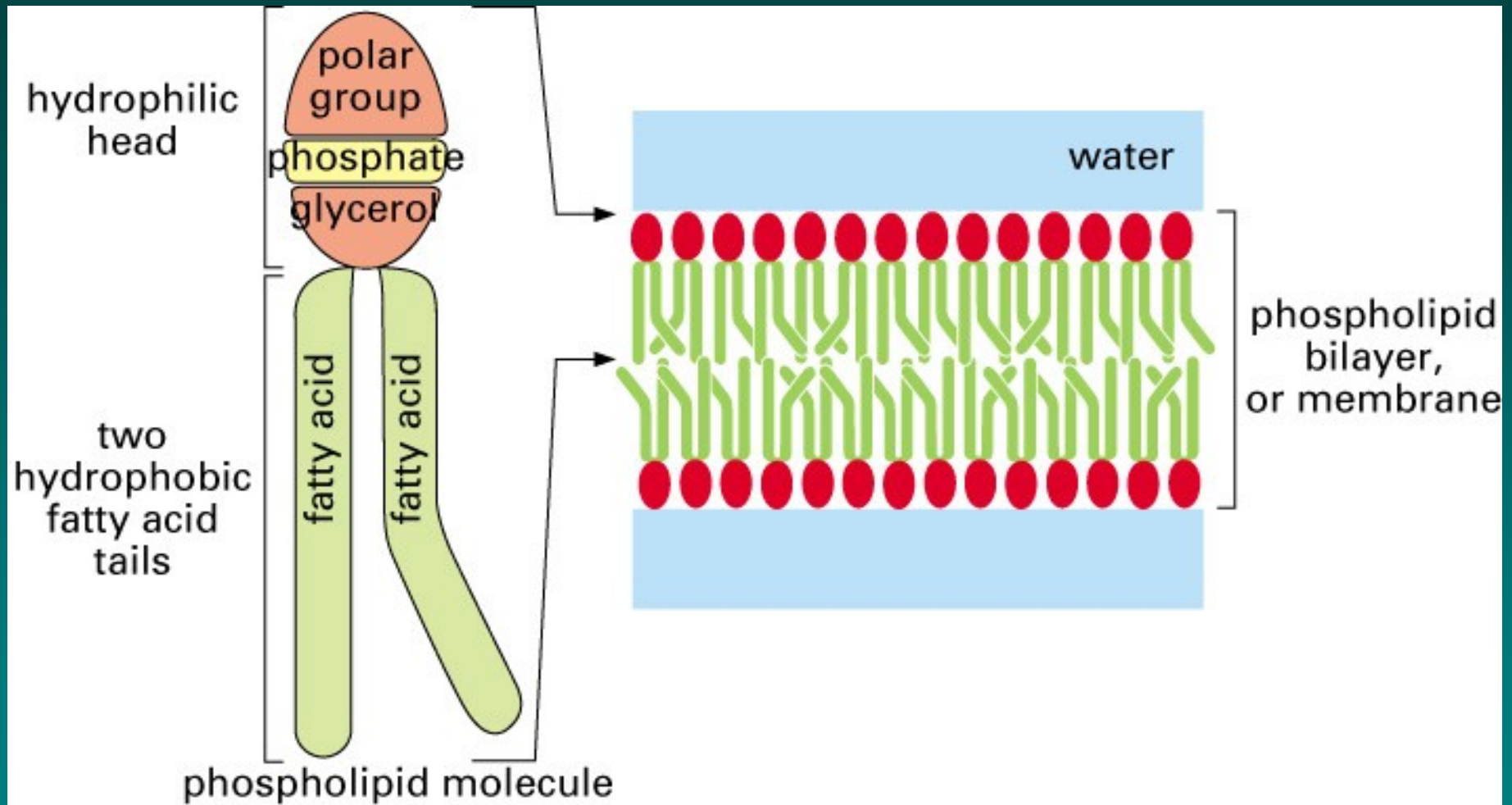
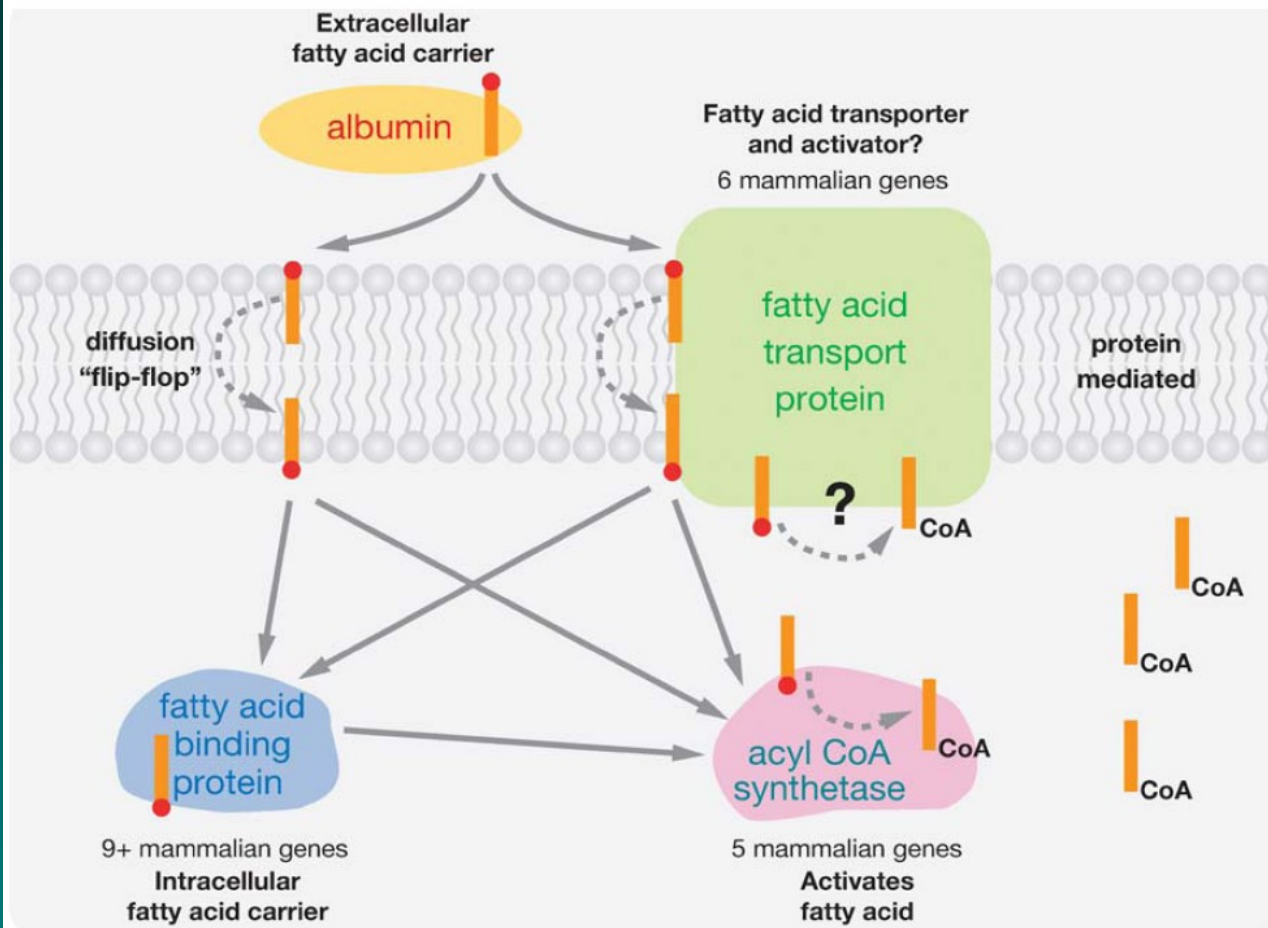


Figure 2-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

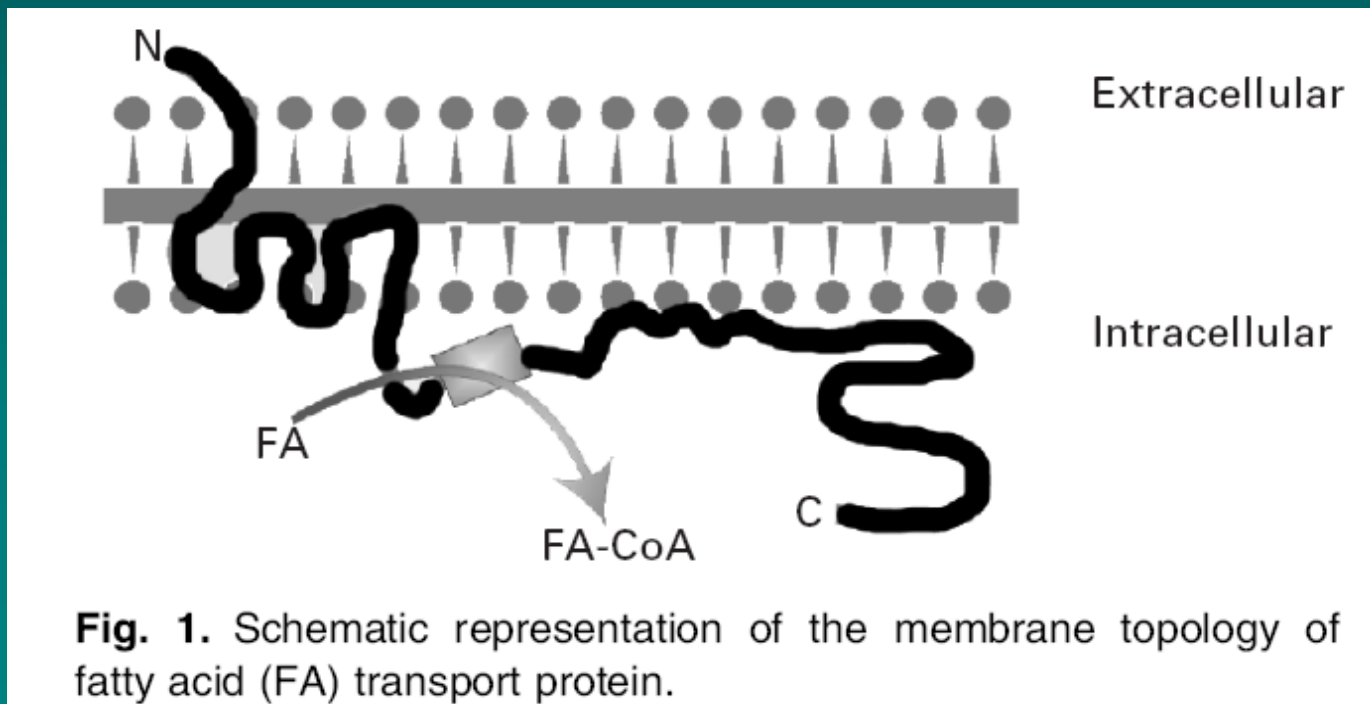


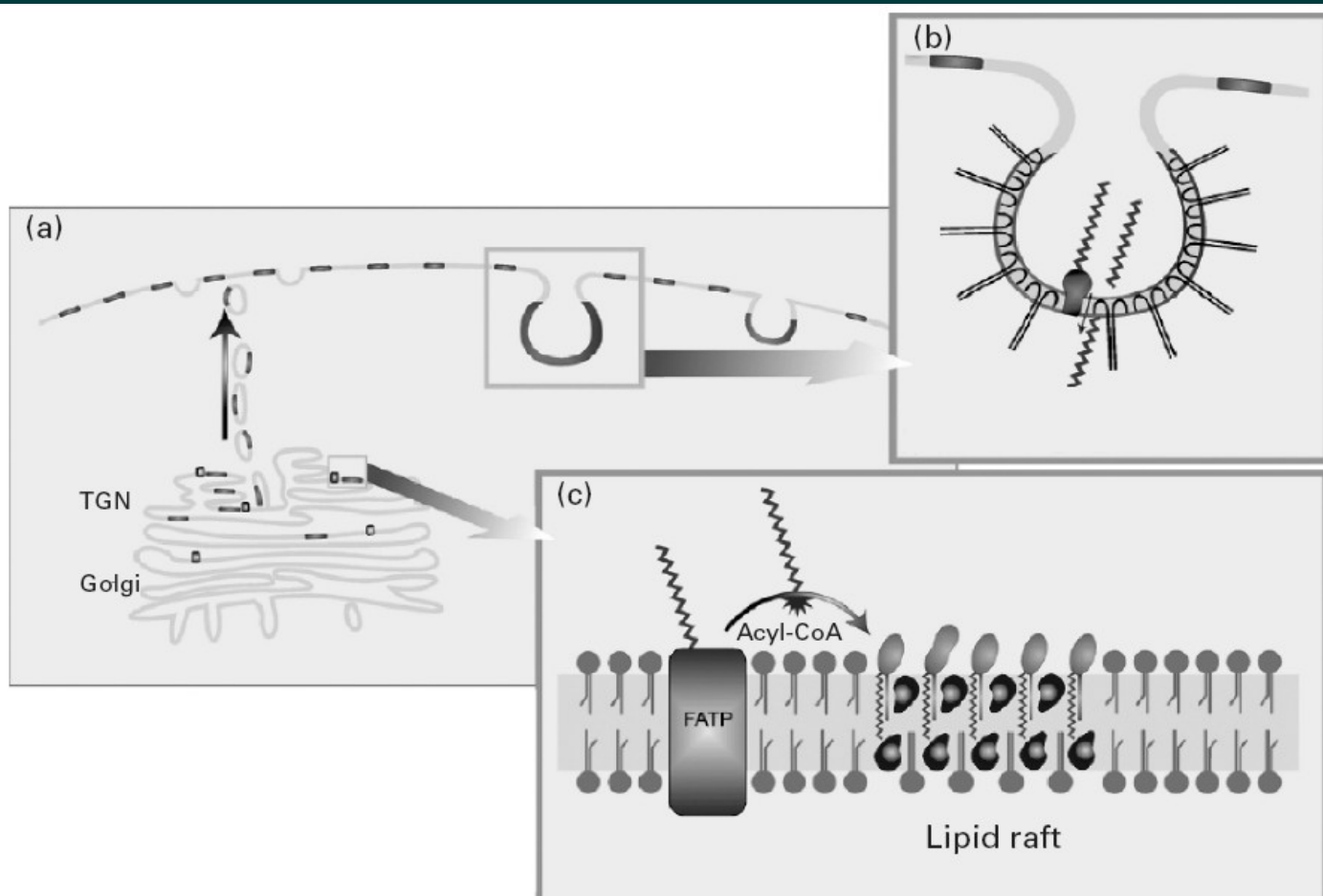
Proposed models for FA internalization in neurons. In the diffusion model of FA internalization, FAs are released from albumin and, owing to their hydrophobicity, partition into the outer leaflet of the plasma membrane. The FAs then "flip-flop" from the outer leaflet to the inner leaflet of the plasma membrane, where they can dissociate or be extracted by FABPs or Acsl proteins. FAs bound to FABPs are ultimately transferred to Acsl proteins, which catalyze the reaction that converts the free FAs to their CoA derivative. The FA-CoA cannot repartition into the membrane owing to the presence of the hydrophilic CoA. Additionally, FA internalization may be mediated by FATPs. FATPs may increase the rate or efficiency of FA "flip-flop" or increase FA stability in the inner leaflet, which increases the opportunity for FAs to interact with either FABPs or Acsl proteins. It remains controversial whether FATPs themselves convert the FAs to their FA-CoA derivative.

# FATTY ACID TRANSLOCASE (FAT/CD36)

Protein v plasmatické (mitochondriální?) membráně  
CD36 – multifunkční adhezní receptor pro trombospodin a kolagen a scavenger receptor pro LDL exprimovaný na plateletech, monocytech ale i jiných typech buněk.

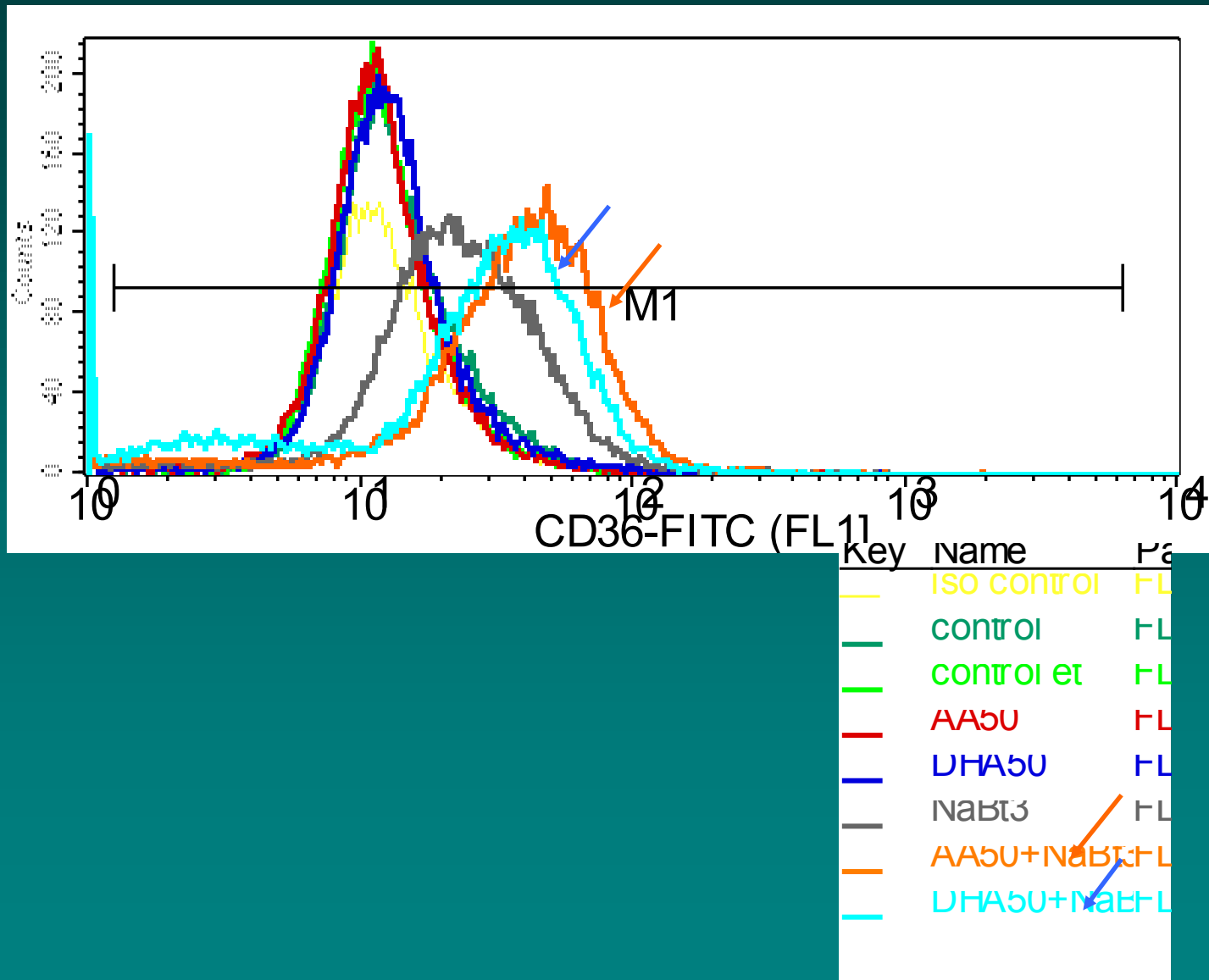
Nově prokázána funkce při transportu VNMK i jeho přítomnost v buňkách gastrointestinálního traktu (Lobo MVT et al., J Histochem Cytochem 2001, Campbell SE et al, J Biol Chem 2004, Drover VA, J Clin Invest 2005)



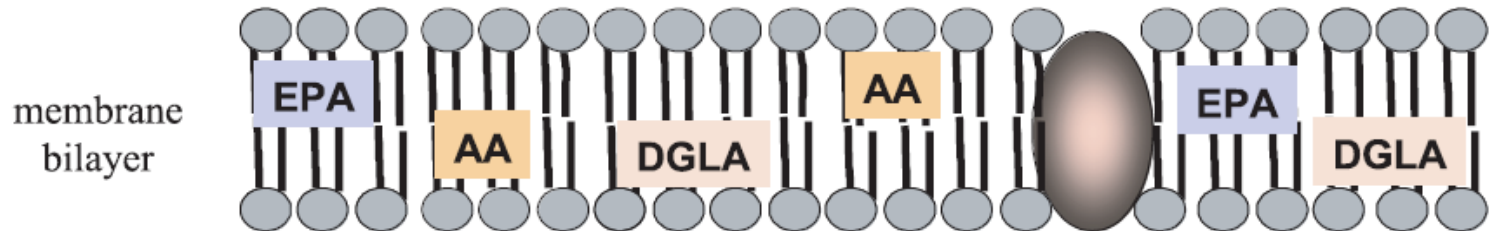


**Fig. 3.** Proposed model for cellular fatty acid uptake. Fatty acid transport protein (FATP, □), stabilization of lipid rafts (—) by acylated very-long-chain fatty acids (VLCFA) and fatty acid translocase (FAT)/CD36 incorporation into lipid rafts could cooperate to facilitate efficient long-chain fatty acid (LCFA) uptake. Intracellular VLCFA are esterified to their acyl-CoA and thereafter bound to sphingolipids in the outer leaflet of the biomembrane of lipid rafts. This process might indirectly facilitate ‘on-demand’ recruitment of FAT/CD36 from an intracellular compartment to lipid rafts located on the plasma membrane and result in augmented uptake of LCFA. TGN, trans-Golgi network; (⌋), caveolins; (●), fat; (~~~~~), fatty acid; (⌋), phospholipid; (●), cholesterol; (⌋), sphingolipid.

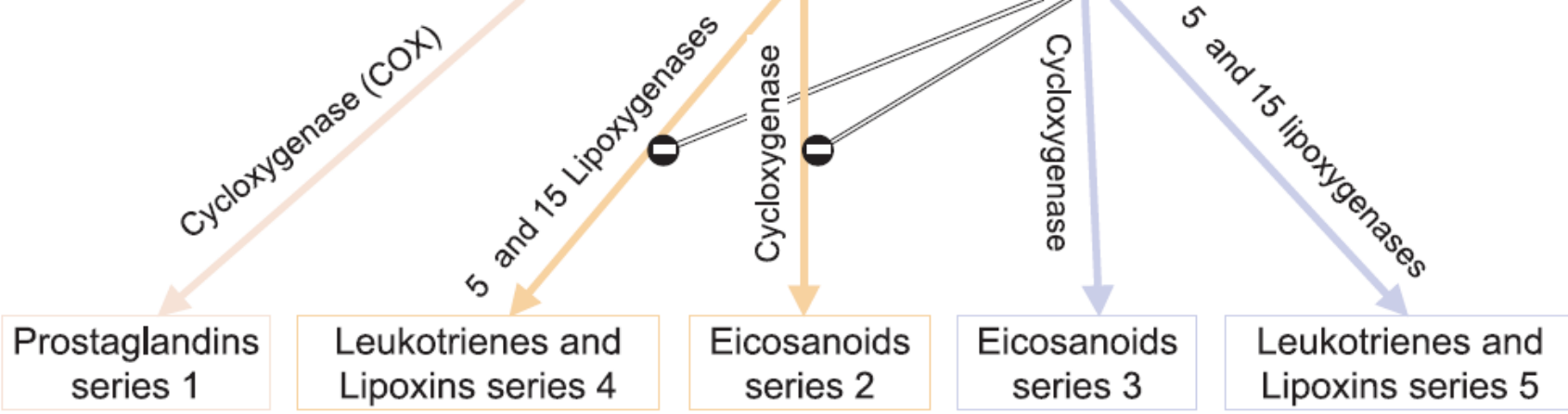
## Expression of CD36 antigen in HCT116 cells after treatment with AA, DHA, NaBt or their combinations

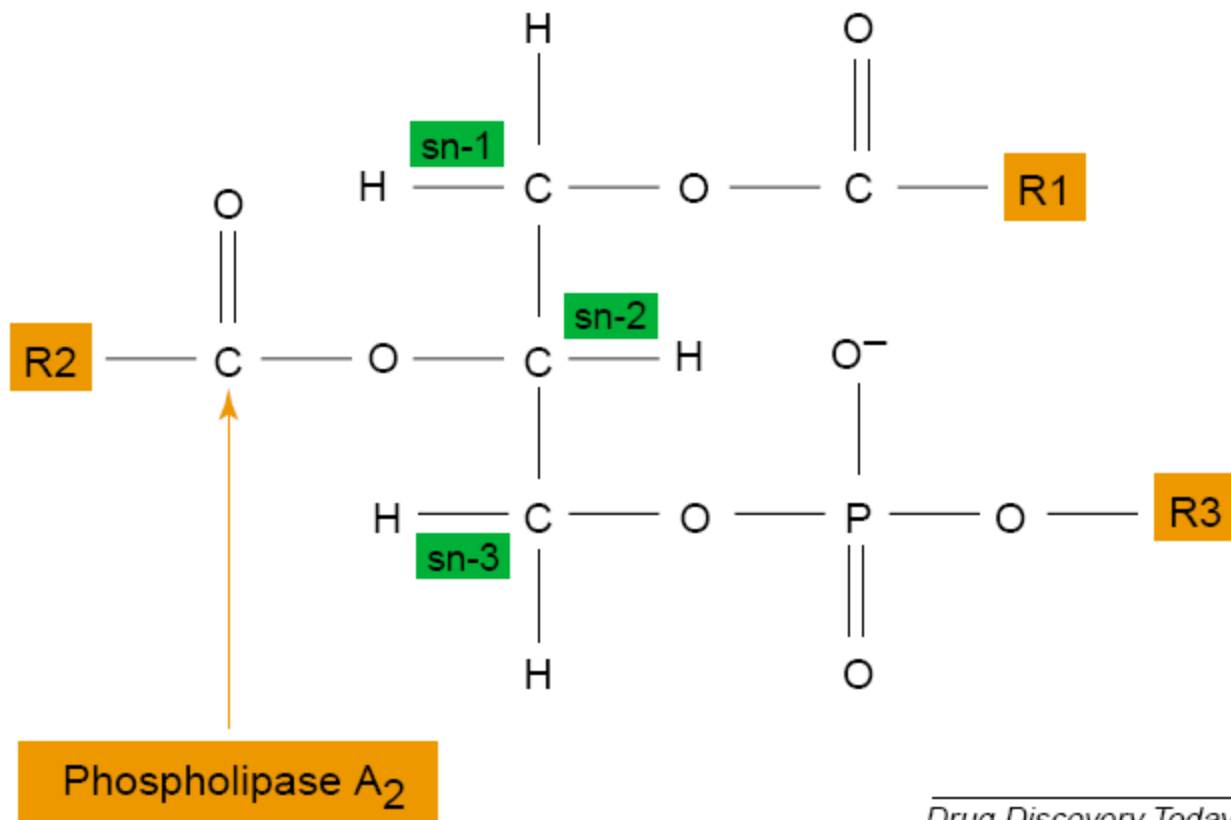






Phospholipase A2





**Figure 1.** Phospholipid structure with phospholipase A<sub>2</sub> cleavage site.

# Fosfolipáza A2

Enzym účastnící se lipidového metabolismu, důležitý pro řadu buněčných procesů.

Tři skupiny:

- ▶ sekretovaná PLA2 (sPLA2),
- ▶ na vápníku nezávislá PLA2 (iPLA2),
- ▶ na vápníku závislá cytosolová PLA2 (cPLA2).

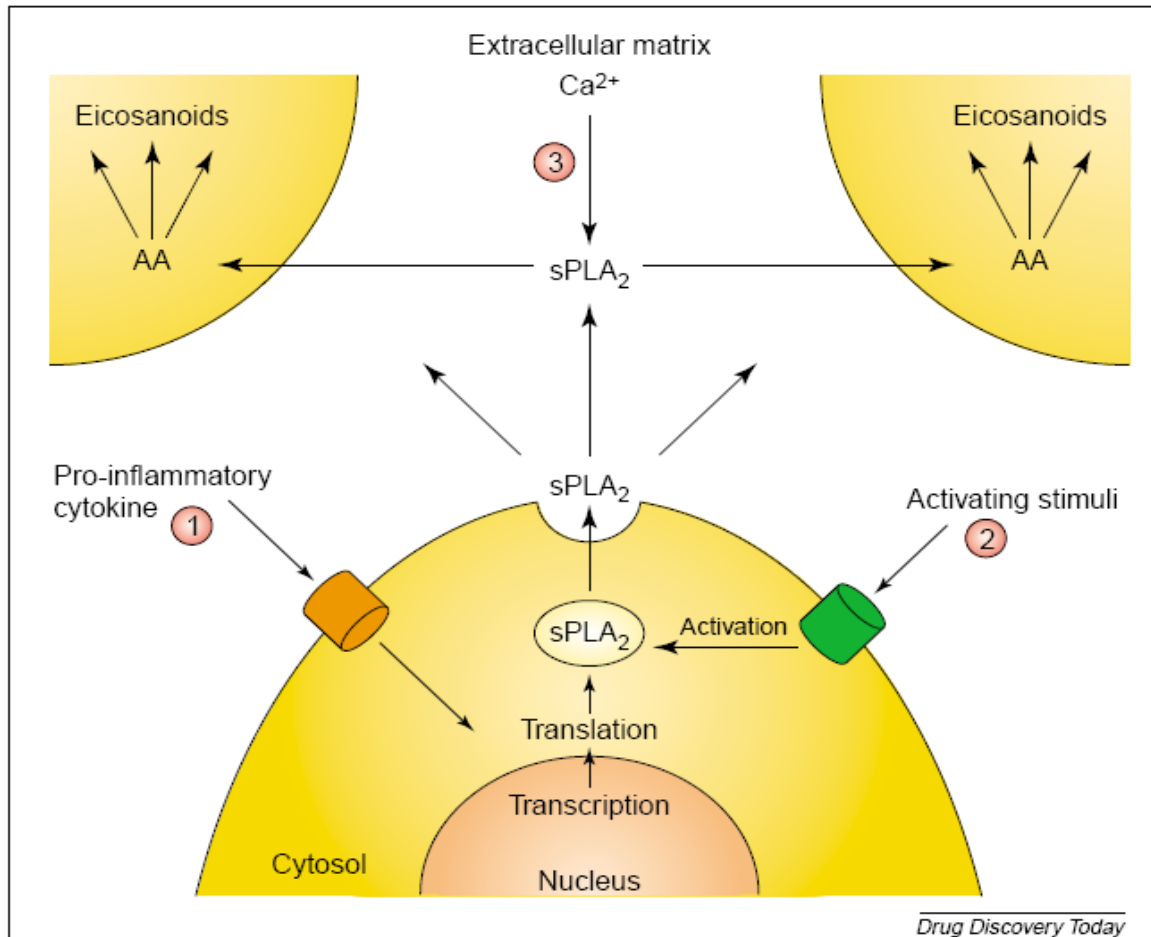
Kromě úlohy v buněčném signálování souvisejí PLA2 s různými patologickými stavy, včetně zánětu, tkáňové reparace a nádorů.

U řady nádorů jsou hladiny sPLA2 a cPLA2 zvýšeny.

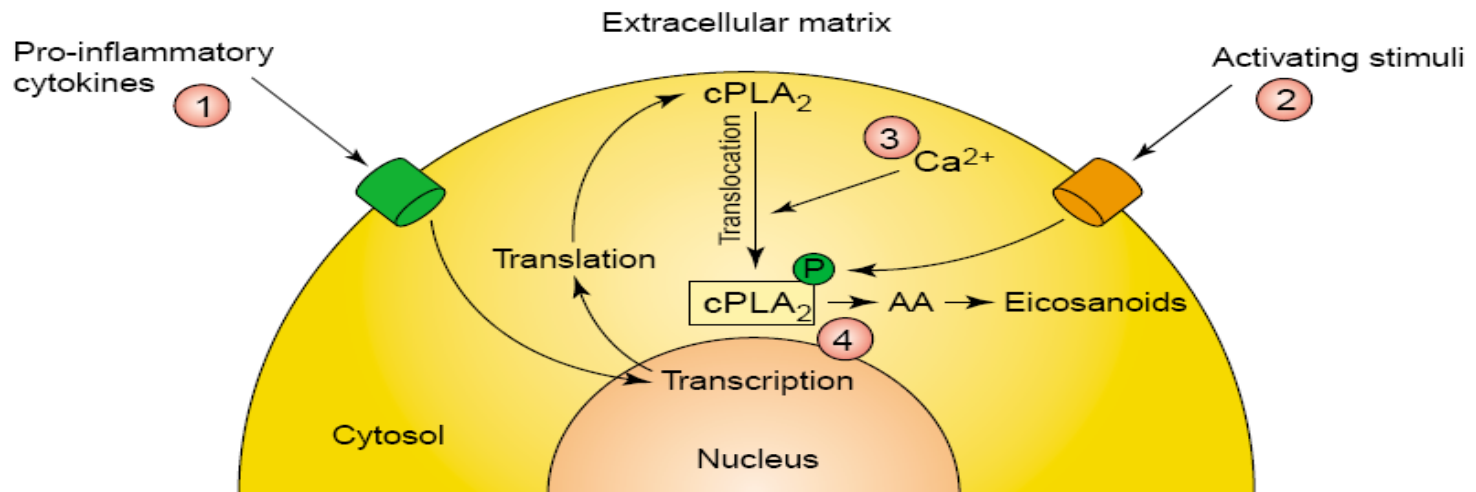
PLA2 jsou také cílem protinádorové terapie

## sPLA<sub>2</sub> v zánětlivé odpovědi

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi sPLA<sub>2</sub>. Aktivační faktory uvolňují sPLA<sub>2</sub> ze sekrečních granul do ECM. Za přítomnosti Ca<sup>2+</sup> sPLA<sub>2</sub> hydrolyzuje membránové fosfolipidy sousedních buněk. Uvolnění AA a následná tvorba eikosanoidů indukuje zánět.



**Figure 2.** sPLA<sub>2</sub> participating in an inflammatory response. (1) Pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induce cellular expression of sPLA<sub>2</sub>. (2) Activating factors cause release of sPLA<sub>2</sub> from secretory granules into the extracellular matrix. (3) In the presence of millimolar concentrations of Ca<sup>2+</sup>, sPLA<sub>2</sub> hydrolyzes membrane-bound phospholipids of neighbouring cells. Released fatty acids, such as arachidonic acid, are further metabolized into eicosanoids, generating an inflammatory response in neighbouring cells.



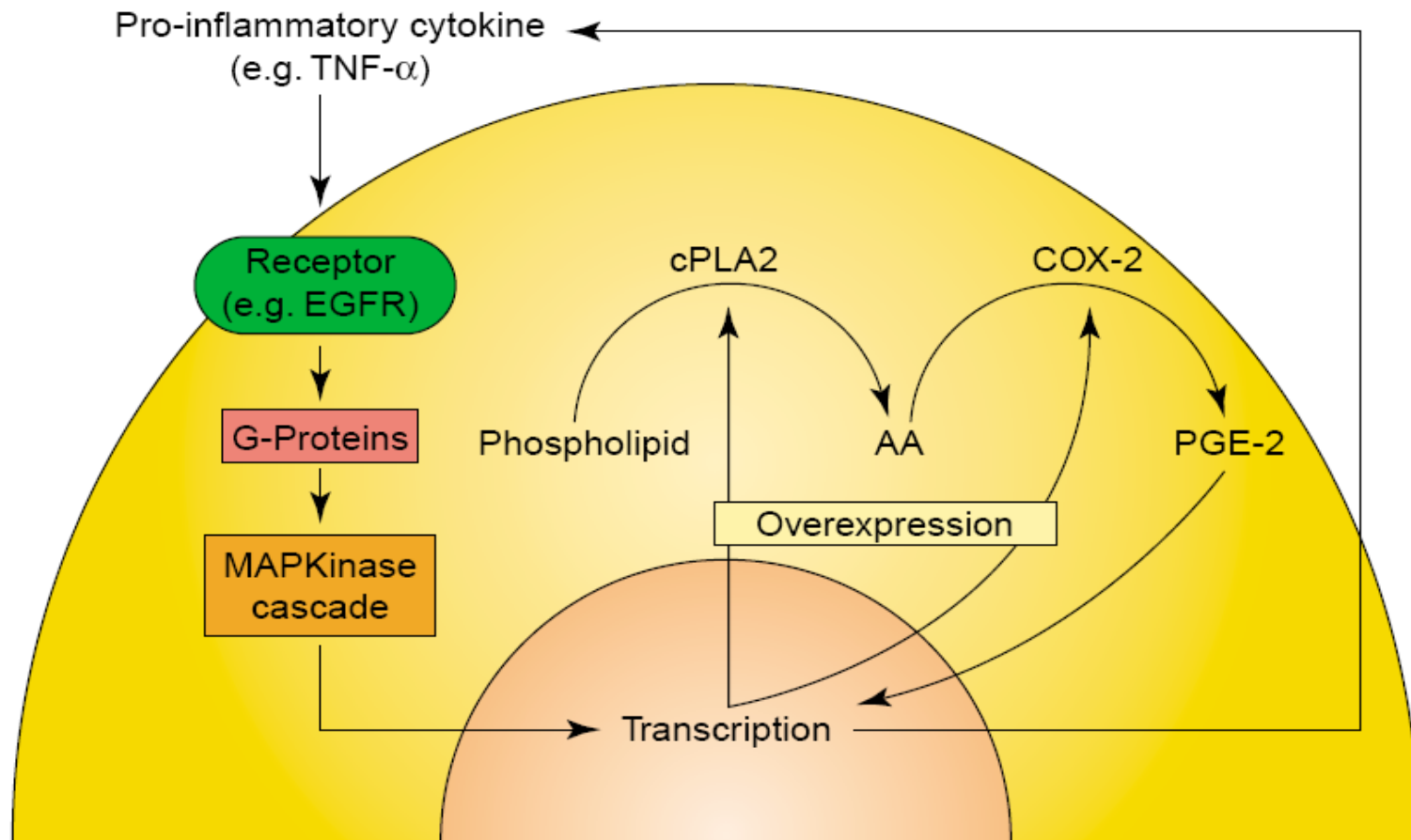
*Drug Discovery Today*

**Figure 3.** Activation of cPLA<sub>2</sub>-α. (1) Pro-inflammatory cytokines including tumour necrosis factor α induce expression of cPLA<sub>2</sub>-α. (2) Activation leads to mitogen-activated protein kinase-pathway-directed phosphorylation of cPLA<sub>2</sub>-α. (3) Extracellular influx or mobilization of intracellular stores of Ca<sup>2+</sup> bring about cPLA<sub>2</sub>-α translocation from the cytosol to perinuclear membranes. This brings cPLA<sub>2</sub>-α in close proximity to both its substrate and enzymes involved with eicosanoid synthesis. (4) Activated cPLA<sub>2</sub>-α lyses membrane phospholipids providing arachidonic acid (AA) to a range of enzymes involved with eicosanoid synthesis, specifically COX and LOX.

## Aktivace cPLA2

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi cPLA2. Následuje fosforylace zprostředkovaná MAP kinázami. Ca<sup>2+</sup> způsobuje translokaci cPLA2 z cytosolu do perinukleární membrány, kde je také její substrát a enzymy nutné k tvorbě eikosanoidů. Aktivovaná cPLA2 lyzuje membránové fosfolipidy a uvolňuje AA, která je metabolizovaná COX a LOX.

# Model konstitutivní overexprese cPLA<sub>2</sub> a COX-2 u nádorových buněk



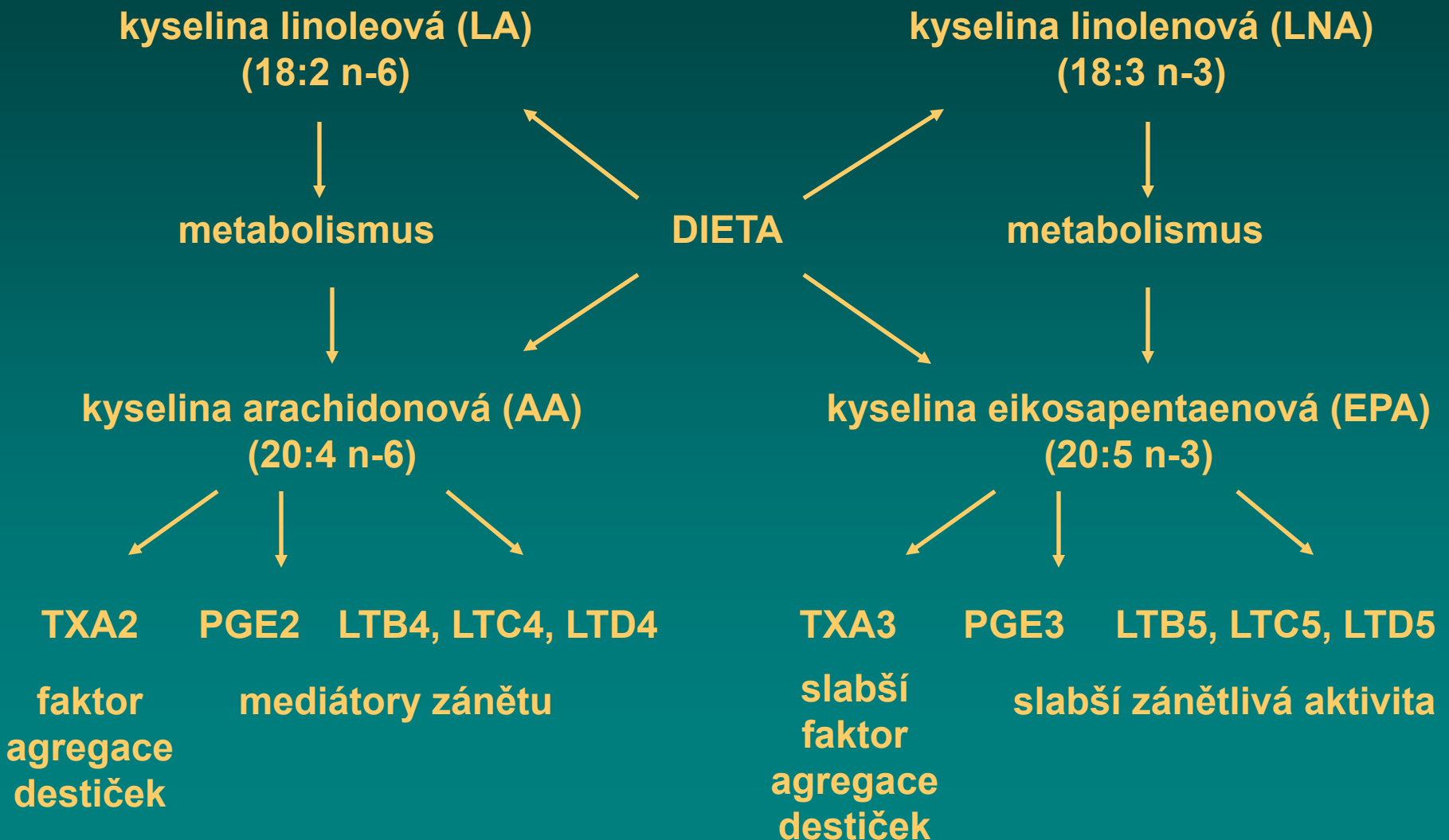
*Drug Discovery Today*

**Figure 4.** Model of constitutive overexpression of cPLA<sub>2</sub> and COX-2 in tumour cells (reviewed in [4]).

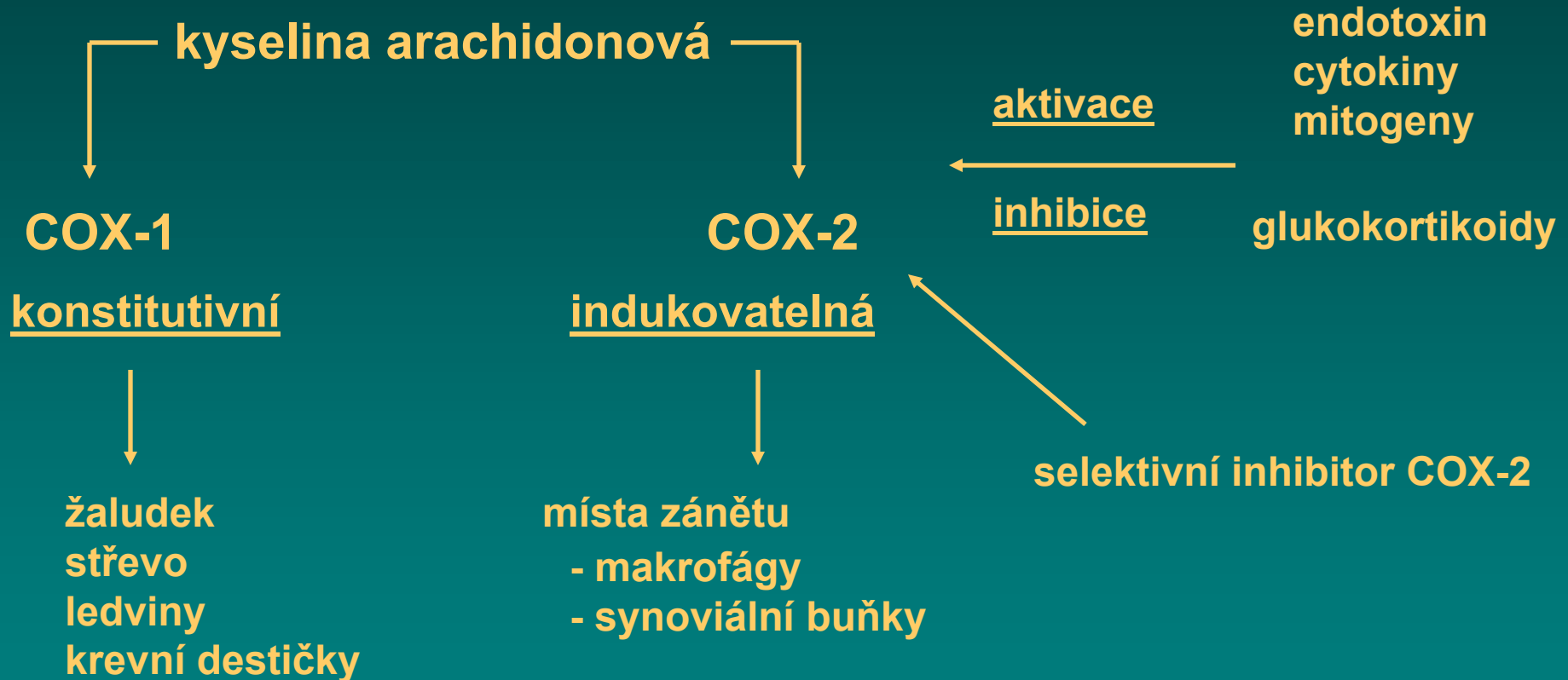
# Interakce n-3 PUFAs s AA

při

syntéze eikosanoidů s prozánětlivou aktivitou



# Cyklooxygenázové dráhy





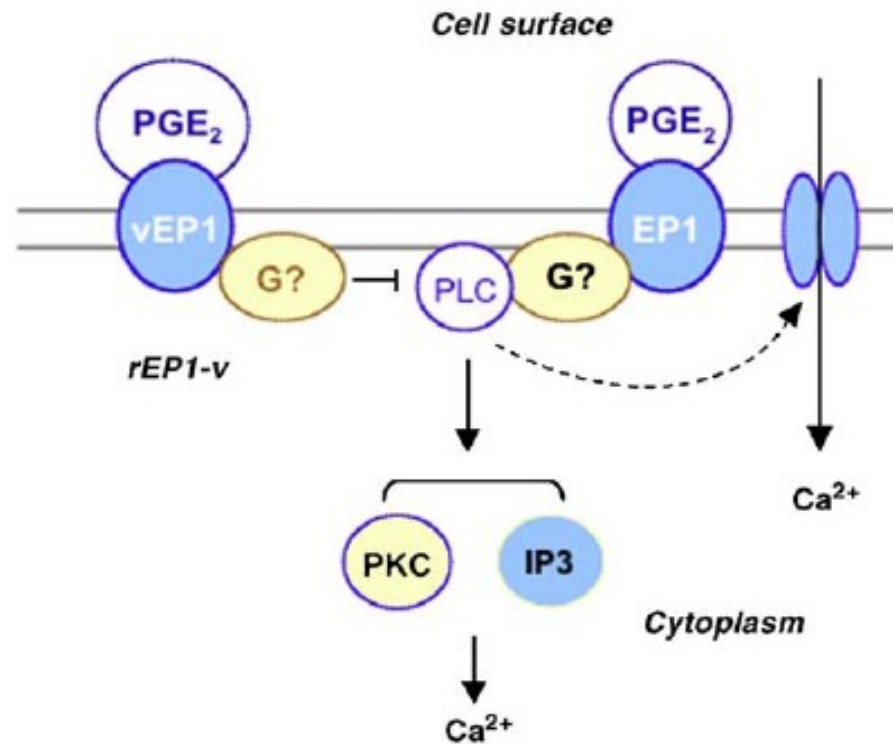
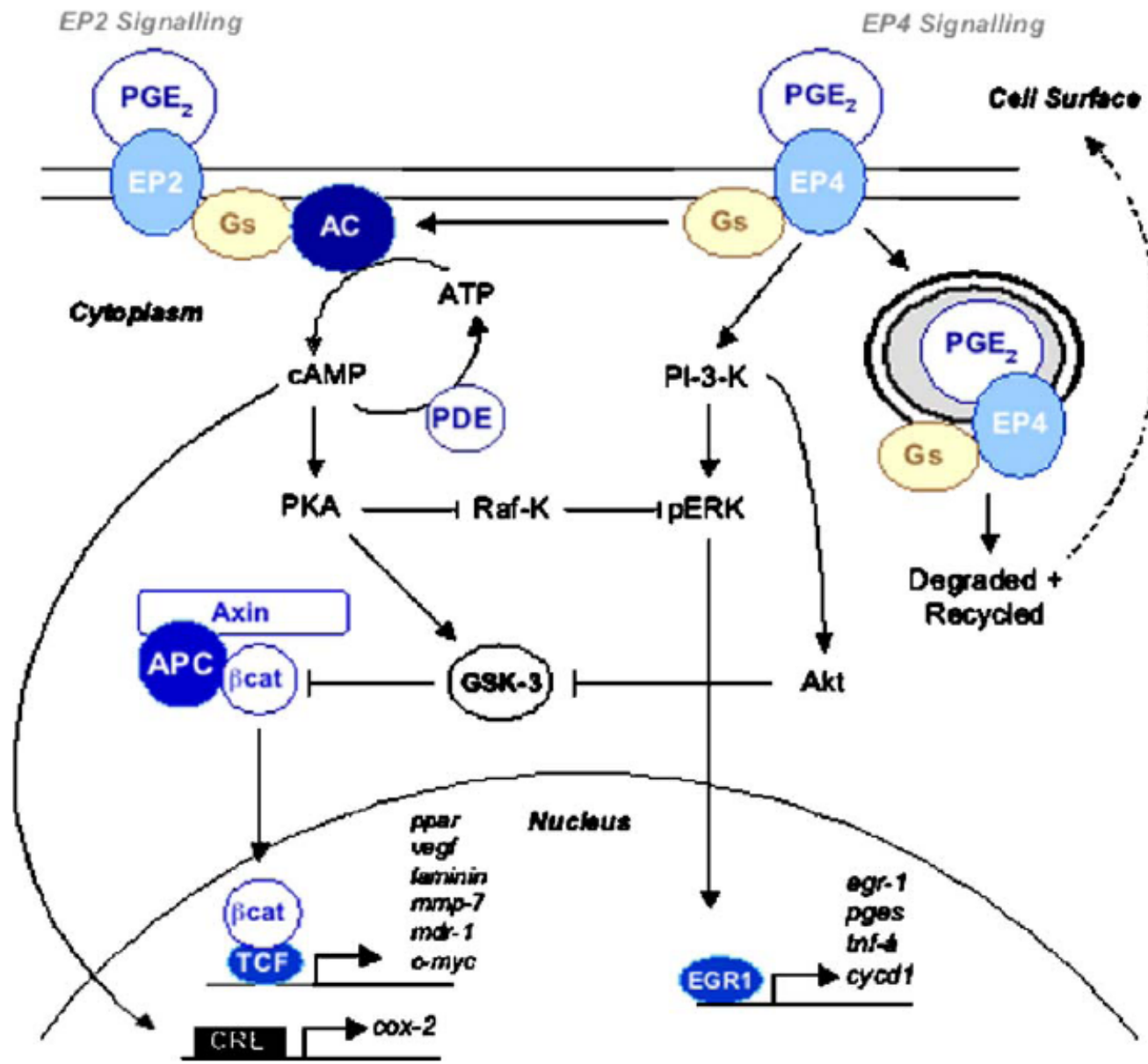


Fig. 5. The EP1 receptor signals via coupling to an as yet uncharacterised G protein. The blocked arrow indicates the potential inhibitory effect on PGE<sub>2</sub> signalling through a variant EP1 receptor such as found in the rat (see text).



# Přenos signálů PGE<sub>2</sub> prostřednictvím receptorů EP1 - 4

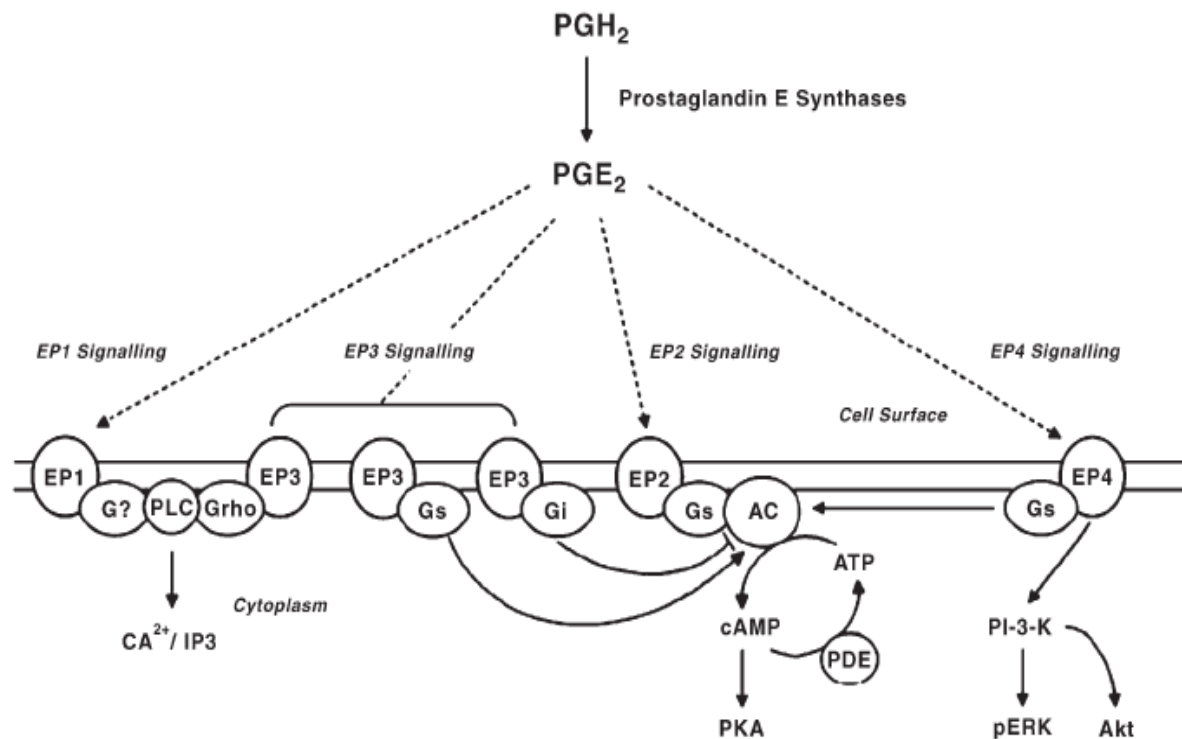
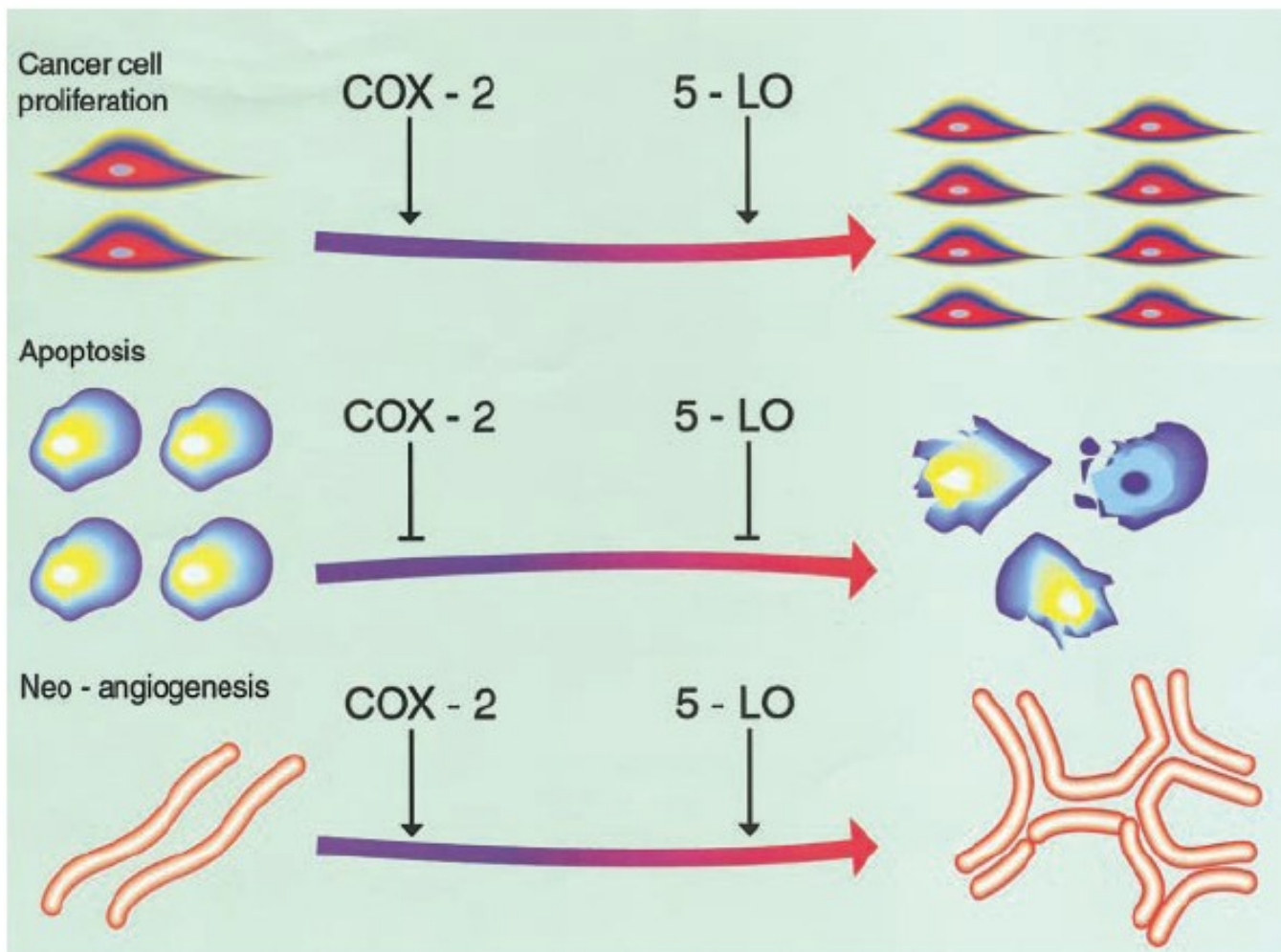


Fig. 4. PGE<sub>2</sub> can signal through any single (or combination of) EP receptor. Signalling depends upon the enzymatic machinery and receptors present in the tissue or cell type in question. Signalling via the EP1 receptor subtype activates IP<sub>3</sub> and mobilises intracellular Ca<sup>2+</sup>, through an as yet uncharacterised G protein [110]. The EP2 and EP4 receptors activate adenylyl cyclase activity through binding Gs proteins (EP4 also has the capacity to modulate MAPK signal cascades). The predominant EP3 receptor splice variant (of which four have been identified in humans) induces the inhibition of adenylyl cyclase, and hence inhibits cAMP activation, although this receptor subtype can also couple to Gs and G12. Arrows indicate activation by phosphorylation, whereas blocked arrows indicate inhibition of activation.

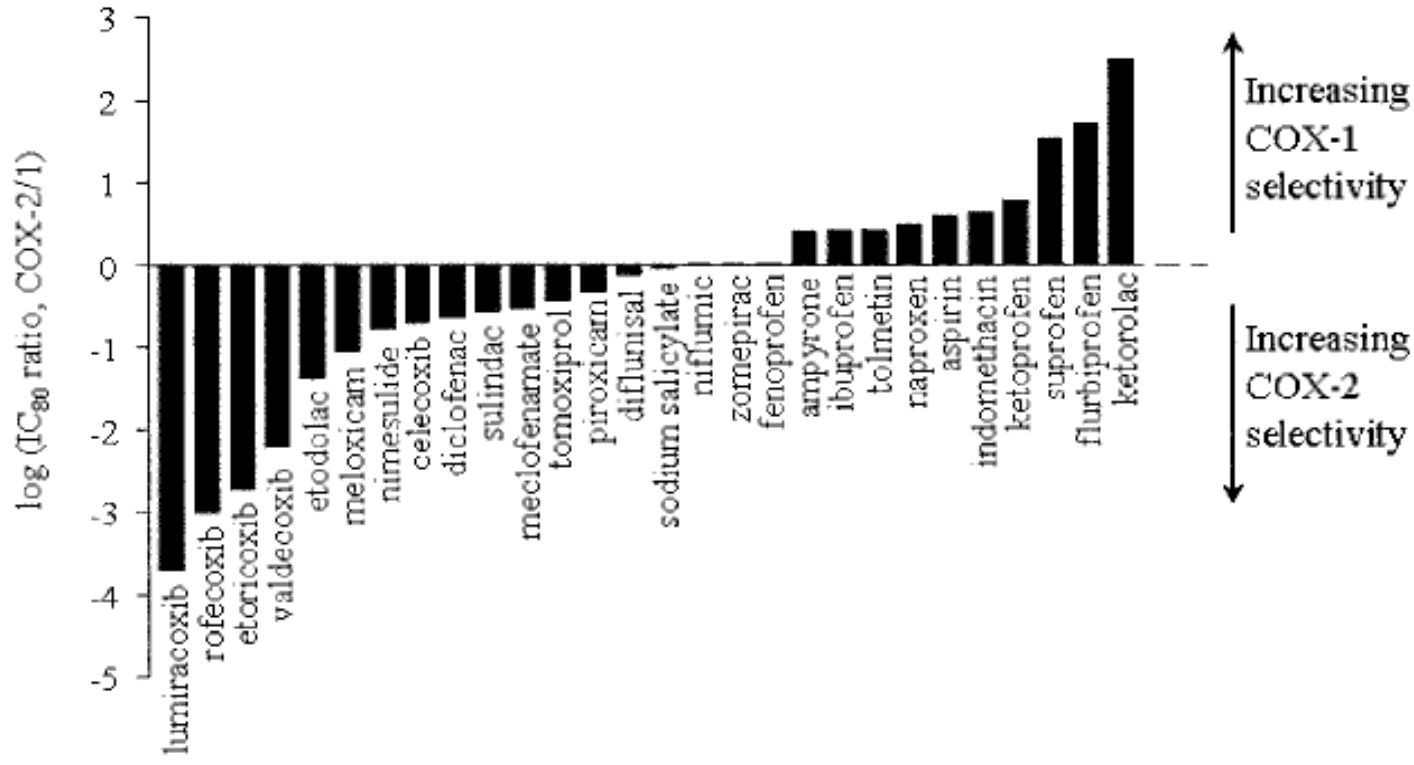
# COX-2 i 5-LPO stimulují buněčnou proliferaci, inhibují apoptózu a indukují neoangiogenezi



**Table 1. COX2 expression in malignant or premalignant human tumours**

Premalignant or malignant lesion	COX2 expression (%)
Colorectal	80–90
Gastric	80
Oesophageal	70
Hepatocellular (liver cirrhosis)	54 (81)
Pancreatic	67
Head and neck	80
Non-small-cell lung cancer	70
Breast (ductal carcinoma-in-situ)	40 (60)
Prostatic	83–93
Bladder	86
Cervix	43
Endometrial	37
Cutaneous basal cell	25
Cutaneous squamous cell	80
pPNET	100
Glioblastoma multiforme	71–74
Anaplastic astrocytoma (low grade)	44 (30)

References available at <http://image.thelancet.com/extras/03oncl205webfr.pdf>



## Mechanismy účinků exprese COX-2 na vývoj kolorektálních nádorů:

Účinky nezávislé na produkci prostaglandinů (PGE2):

Aktivace karcinogenů

Produkce malondialdehydu

Redukce hladiny volné AA

Účinky závislé na produkci PGE2:

Indukce buněčné proliferace

Inhibice apoptózy

Indukce angiogeneze

Zvýšení buněčné motility

Zvýšené metastatického potenciálu

Indukce lokální imunosuprese

# Model interakce mezi nádorovými buňkami, endoteliálními buňkami a infiltrujícími zánětlivými buňkami v místě nádoru

## Úloha COX-2, PG a prozánětlivých molekul v angiogenezi

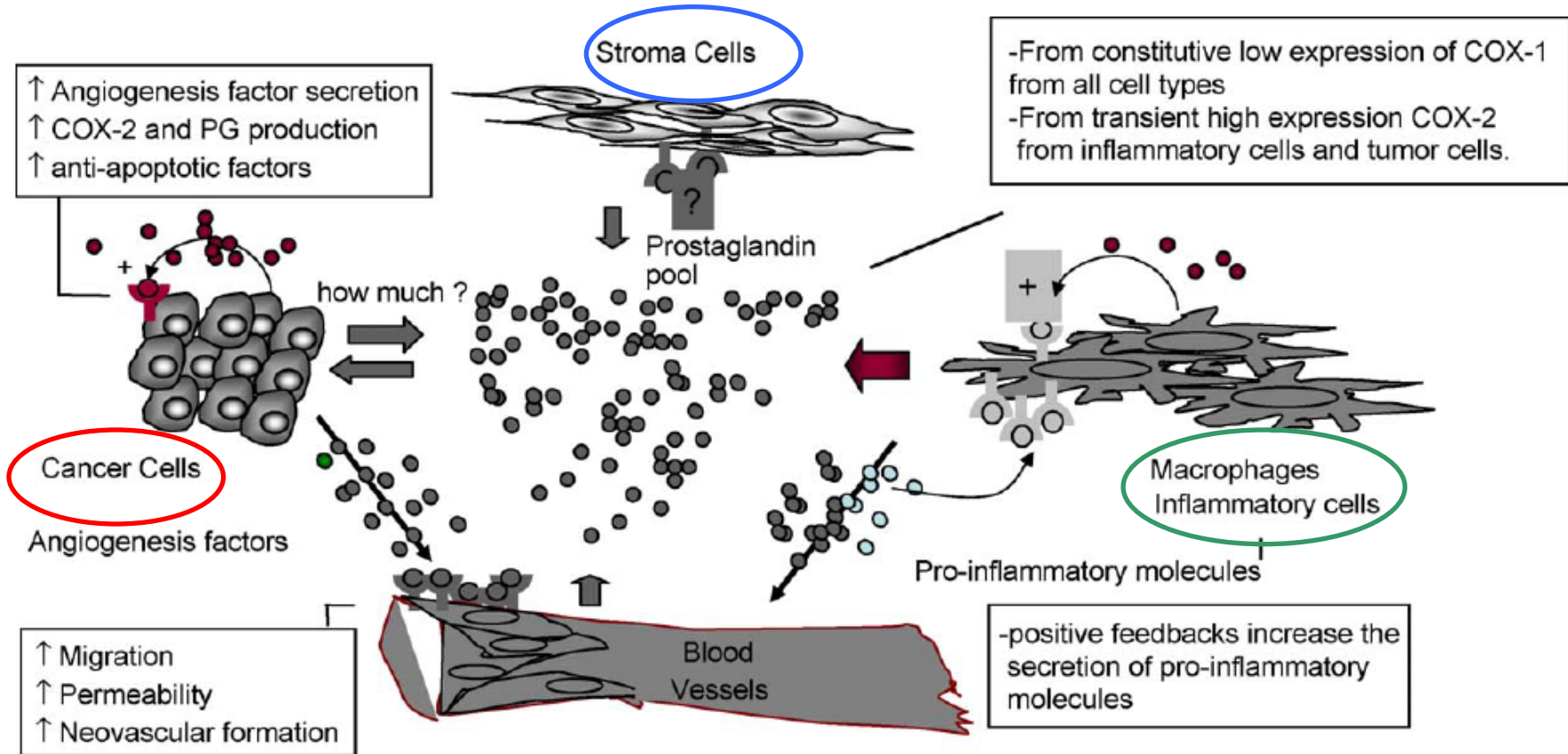


Fig. 1. COX-2 in angiogenesis. This figure models the interactive relationship among cancer cells, endothelial cells and infiltrating inflammatory cells at the site of tumorigenesis. The prostaglandin pool is contributed to by all three different cell types and occasionally stromal cells. The positive feedback through prostaglandin receptors increases COX-2 expression and ensures the continued generation of prostaglandins. In the cancer cell, prostaglandin signaling also results in the production of multiple angiogenesis factors, through which they stimulate neovascular formation at the site of tumorigenesis. In inflammatory cells, prostaglandin signaling stimulates the generation of pro-inflammatory molecules such as IL-2, which further recruits additional circulating monocytes and amplifies the inflammatory response. As a response to increased levels of prostaglandins, angiogenesis factors and pro-inflammatory molecules, endothelial cells proliferate, migrate and undergo tubal formation, providing additional nutrients for oncogenesis as well as a potential route for metastasis.



# ÚČINKY INHIBICE CYKLOOXYGENÁZ A LIPOXYGENÁZ NA NÁDOROVÉ BUN. POPULACE

- Řada nádorů má změněný metabolismus nenasycených MK a produkuje zvýšené množství metabolitů AA, které indukují růst a invazivitu (epiteliální nádory - prsu, kolonu, plic, prostaty)
- Frekvence exprese jednotlivých typů enzymů (COX1, COX2, 5-, 12- 15- LOX, FLAP, P450) se liší podle typu a histologického stupně nádoru
- Mitogenní a viabilitní faktory (EGF, HGF atd.) a prozánětlivé cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1) indukují uvolňování AA a tvorbu eikosanoidů, které slouží jako přenašeče nebo modulátory signálů regulujících proliferaci a apoptózu
- Nesteroidní antiflogistika (NSAID - aspirin, sulindac, indometacin, ibuprofen , piroxicam) inhibují aktivitu COX a mají preventivní a terapeutické účinky na rozvoj nádorů, zejména kolonu - využití inhibitorů COX2 (inducibilní)
- NSAID - snižují proliferaci a indukují apoptózu mechanismy závislémi i nezávislémi na aktivitě COX
- Účinky mohou být přímé nebo nepřímé - zprostředkované např. změnami aktivity imunitního systému
- Inhibitory LOX (NDGA, esculetin, MK-886) inhibují proliferaci a indukují apoptózu řady nádorových linií
- Produkty 5-LOX fungují jako „second messengers“ řady růstových a viabilitních faktorů
- Produkty 12-LOX se uplatňují v procesu invaze a tvorby metastáz - ovlivnění exprese proteáz, adhezivních molekul - využití inhibitorů

# Molekulární mechanismy COX-2 a NSAIDs

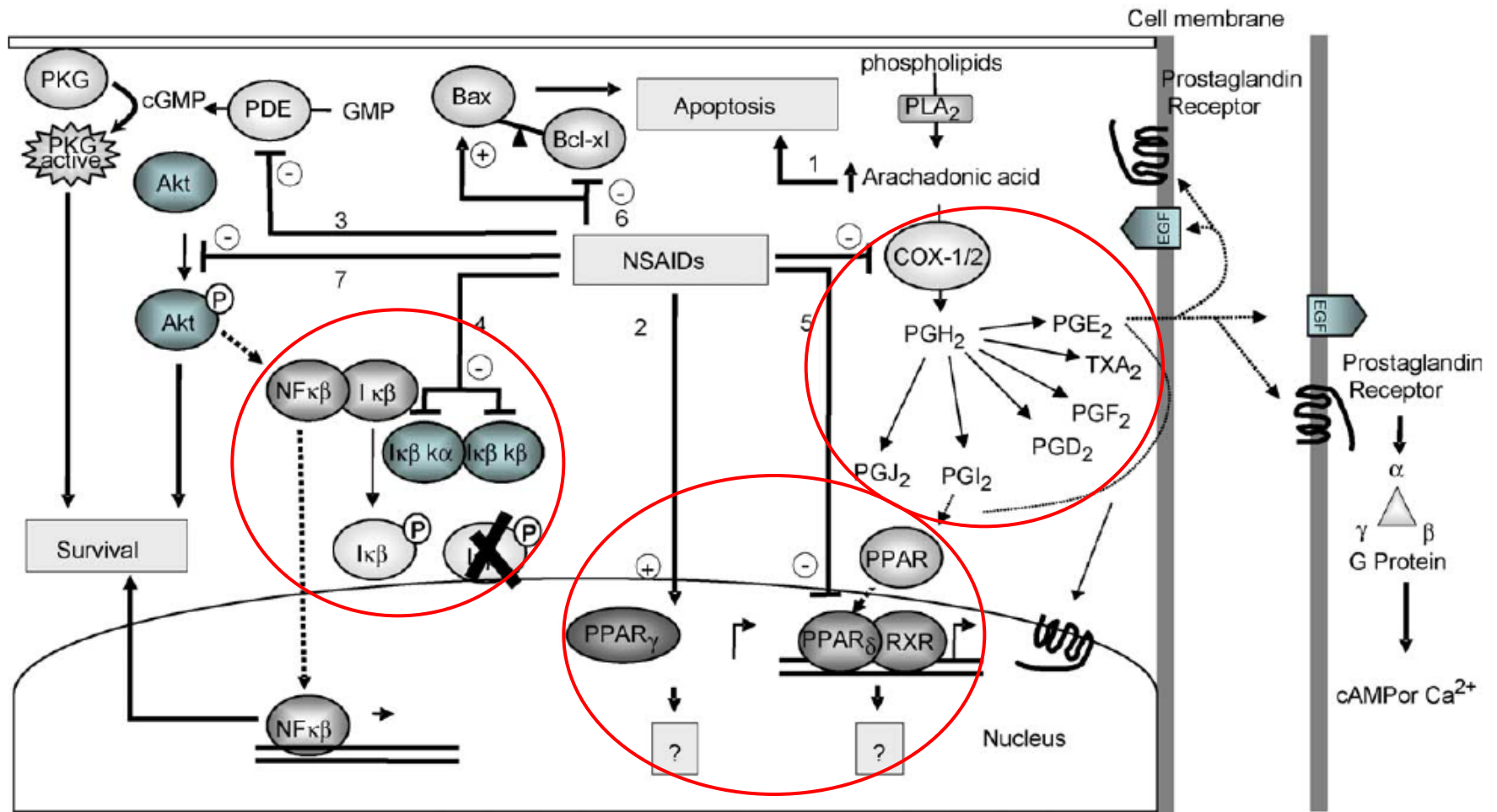


Fig. 4. Molecular mechanisms for COX-2 and NSAIDs. The right part of the model illustrates the prostaglandin synthesis pathway as well as the subsequent receptor signaling—the specific prostaglandin receptors as well as the non-canonical EGF receptor pathway. As the result of inhibiting COX enzymes, accumulation of arachadonic acid would directly promote apoptosis and attenuation of positive feedback to proliferation and survival through receptors. The rest of the figure demonstrates several COX-2 independent mechanisms proposed for NSAIDs. Since, not all NSAIDs are able to act through these mechanisms in every cell type, a brief table is attached to summarize the particular NSAIDs used in each experiment as well as the cell lines involved.

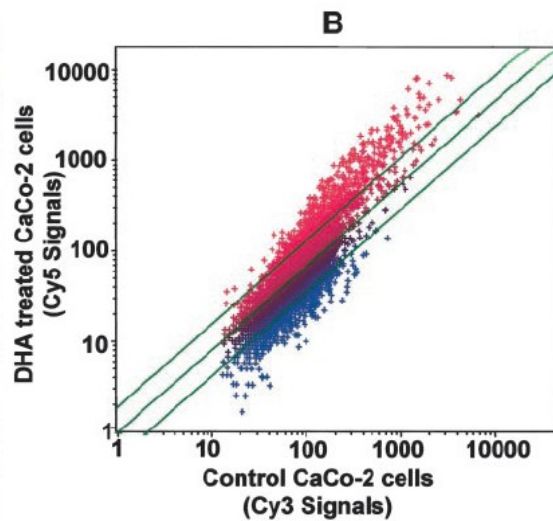
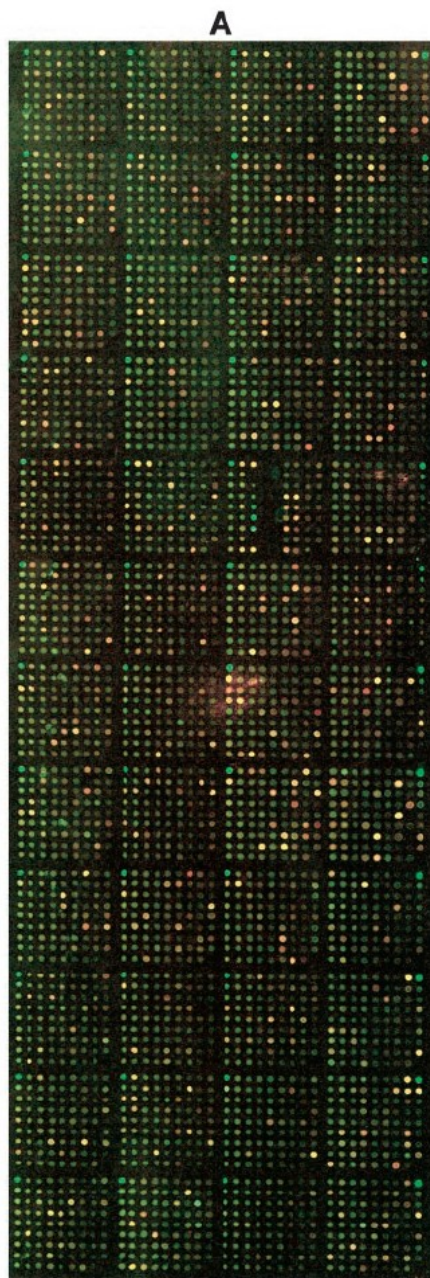


Fig. 2. *A*, scanned image of hybridized human oligoarrays containing 3.8 k genes. Total RNA from CaCo-2 cells, treated with DHA for 48 h, was used for microarray analysis as described in "Materials and Methods." A red color image of spots represents induced genes, green spots indicate repressed genes. *B*, scatter plot view of gene expression. Expression intensity Cy5: Cy3 ratios of untreated versus DHA-treated CaCo-2 cells. The ratios (Cy-5: Cy-3) of genes that have  $\geq 2$ -fold expression are considered induced, and those with  $\leq 0.5$ -fold expression are considered repressed. Approximately 504 of 3800 genes (13%) were expressed in DHA-treated cells.

## Microarray analýza CaCo-2 buněk po působení DHA (48h)

Indukované geny  
Reprimované geny

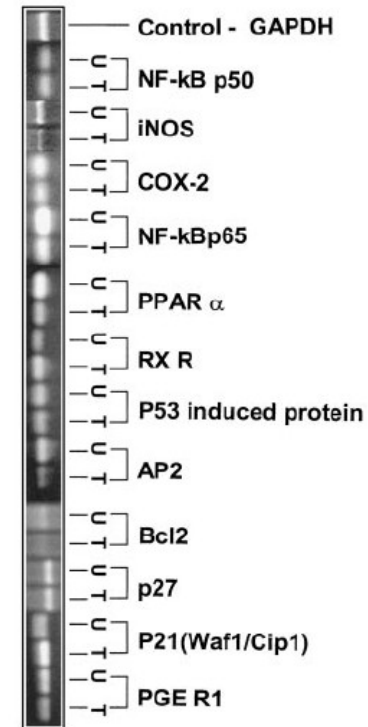


Fig. 3. RT-PCR validation of selected genes listed in Table 1. Differential expression of potential molecular targets modulated by DHA in CaCo-2 cells is shown on 2% agarose gel.

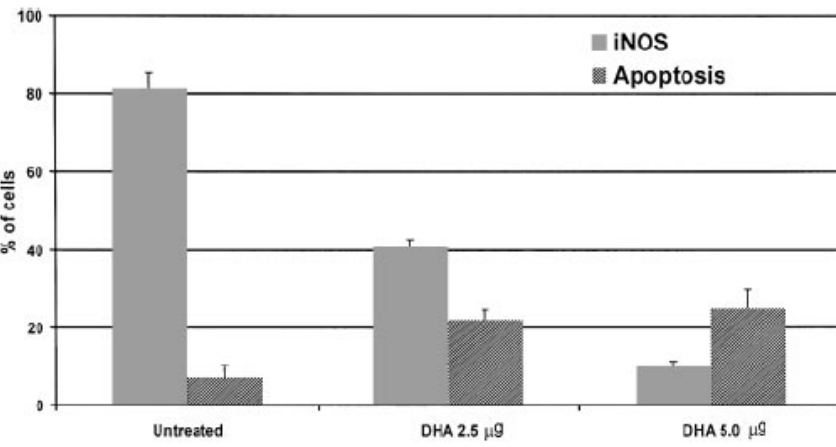
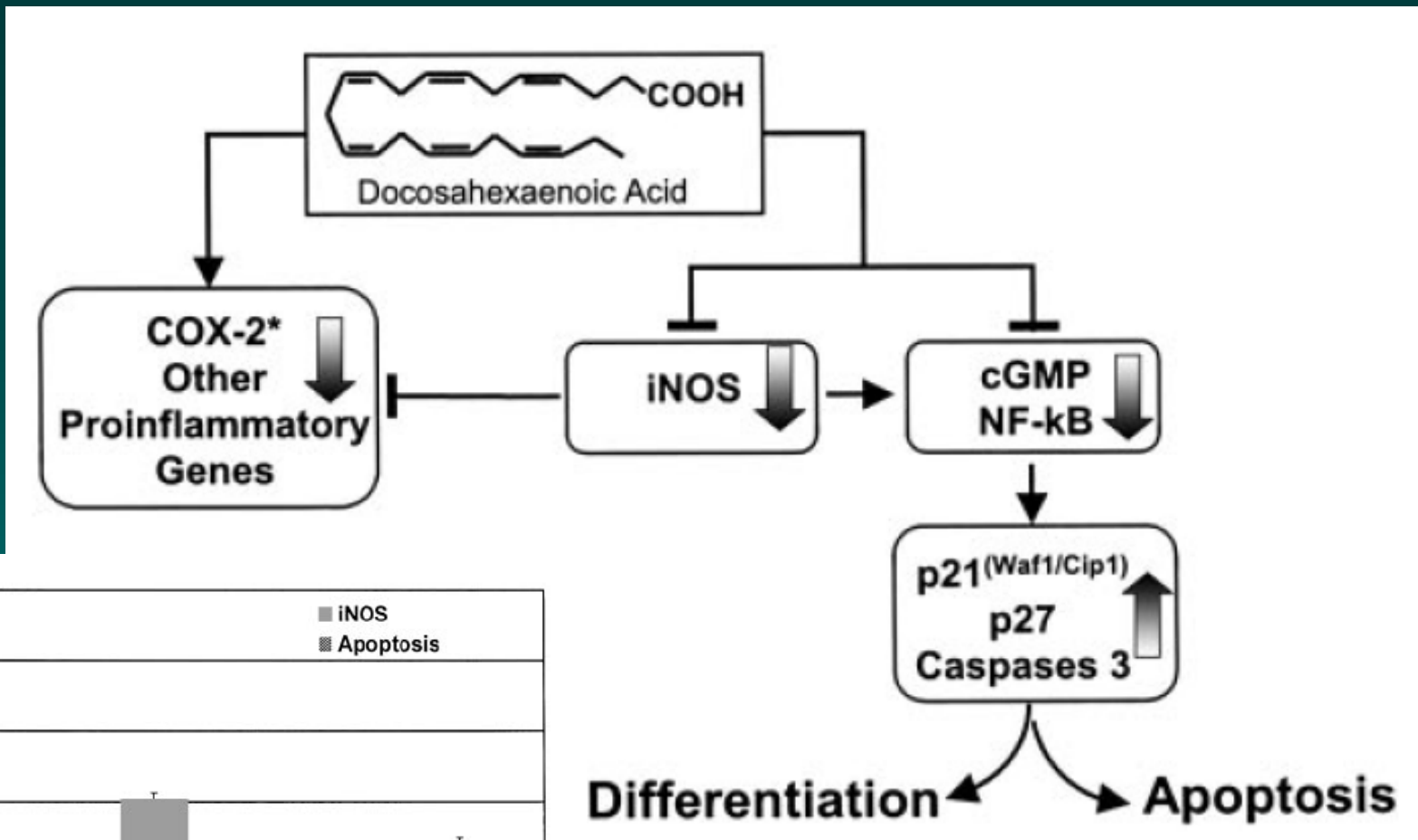
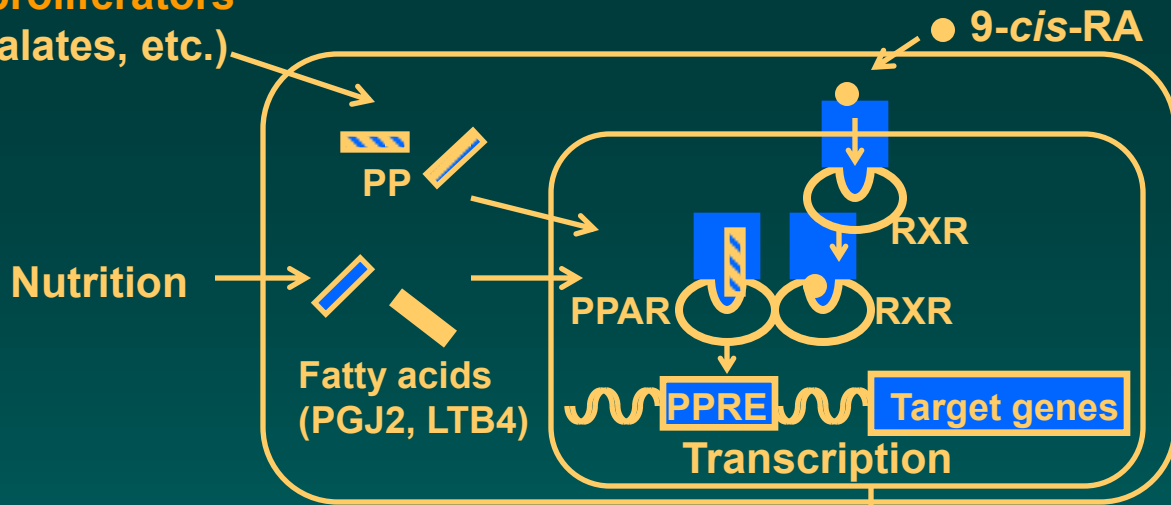


Fig. 6. Effect of DHA on iNOS-positive and apoptotic cells. Percentage of apoptotic cells was determined by DAPI staining. DAPI-positive cells with characteristic nuclear condensation and DNA strand breaks for apoptosis were counted from 10 identical fields using a fluorescence microscope (Olympus) with  $\times 40$  magnification; bars,  $\pm$ SD.

Potenciální molekulární mechanismy působení DHA na nádorové buňky kolonu

**Peroxisome proliferators**  
(fibrates, phtalates, etc.)



**Importance of PPARs in cell proliferation, differentiation and apoptosis.**

After activation, PPAR and RXR form heterodimers which bind to DNA regulatory sequences of target genes through interaction with PPRE. The control by PPARs of the transcriptional activity of target genes gives rise to biological effects which may have consequences for human health. LTB4, leukotriene B4; PGJ2, prostaglandin J2; PP, peroxisome proliferator; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE, peroxisome proliferator responsive element; 9-cis-RA, 9-cis-retinoic acid; RXR, 9-cis-retinoic acid receptor.

**CELL SPECIFIC RESPONSES**

<b>Proliferation</b>	<b>Differentiation and maturation</b>	<b>Apoptosis</b>
----------------------	---------------------------------------	------------------

**MEDICAL RELEVANCE**

<ul style="list-style-type: none"> <li>* Clonal expansion of preadipocytes promoting adipogenesis (participation on PPAR<math>\gamma</math>.)</li> <li>* Hypothetical risk in man of cell growth stimulation by activation of PPARs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Monocyte / macrophage differentiation (implication of PPAR<math>\gamma</math>) leading to accelerated atherosclerosis.</li> <li>* Protective effects of PPAR<math>\alpha</math>.</li> <li>* Adipocyte differentiation responsible of obesity and other related disorders (implication of PPAR<math>\alpha</math>.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Enhanced PPAR<math>\gamma</math> expression could lead to tumoral cell apoptosis and represents a therapeutic approach in malignant disease.</li> </ul>
---	--	--

# 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*

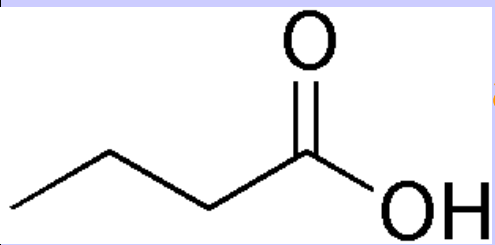
Alteration of colonic microflora; numbers and species balance  
Inhibition of carcinogen activation  
Stimulation of flora to increase bulk  
Alteration of bile salt metabolism to reduce conversion to secondary bile salts

*Fermentative*

Lowering of pH  
Reduced solubility of bile salts  
Increased production of SCFAs, especially butyrate

*Metabolic*

Reduced insulin resistance and hyperinsulinaemia



## krátké kyseliny s krátkým řetězcem – BUTYRÁT

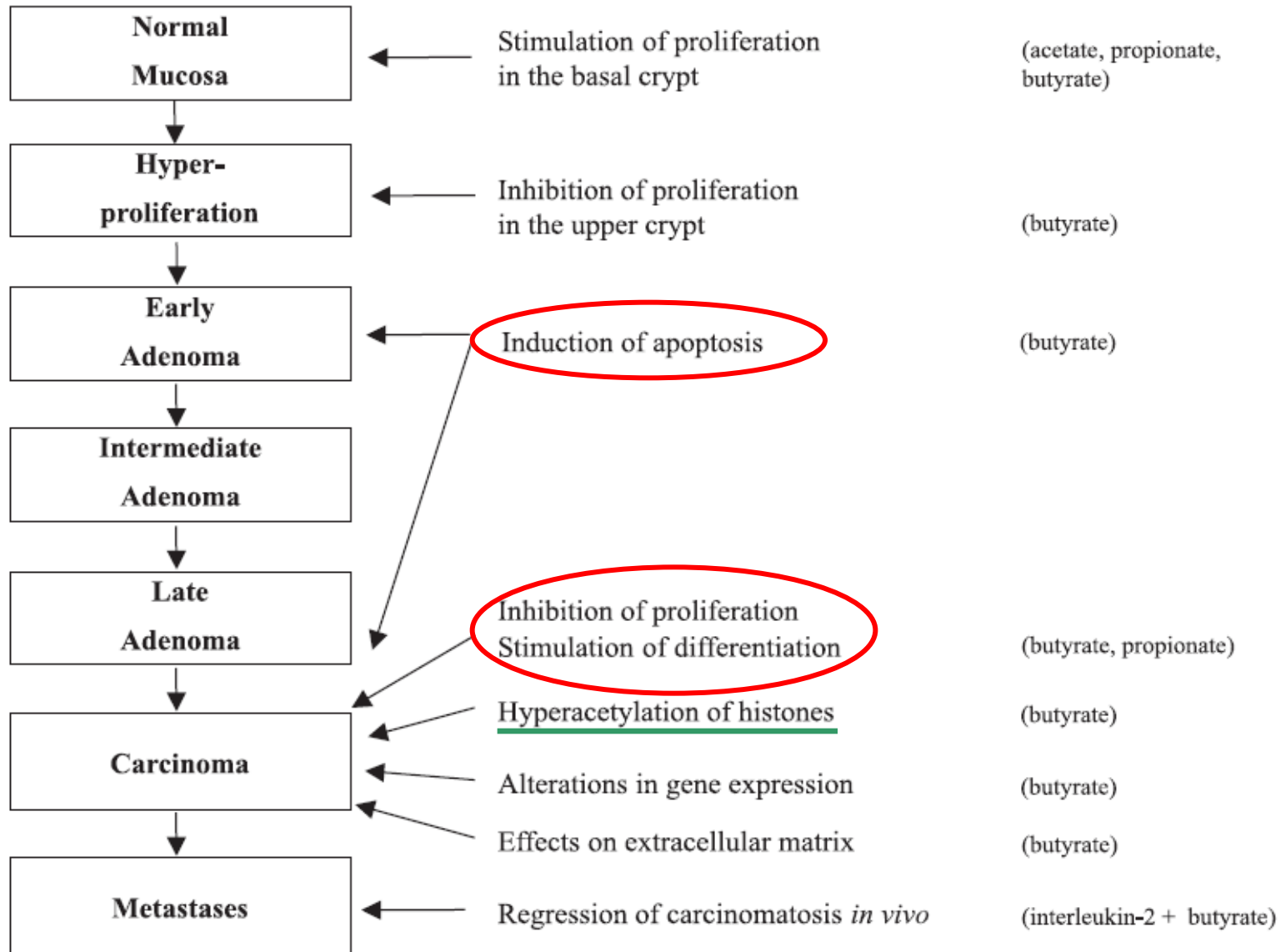
- ▶ produkován anaerobní mikrobiální fermentací vlákniny ve střevě

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**

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





## Účinky butyrátu na nádorové buňky:

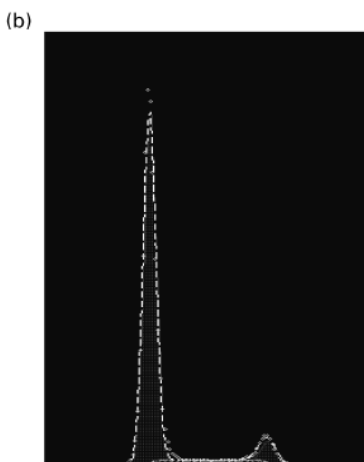
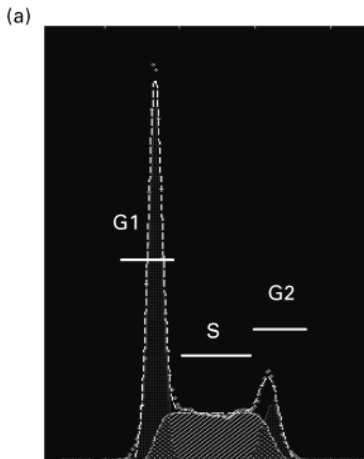
**Inhibice proliferace** – blok v G1 nebo G2/M, indukce p21, Cyklin D1,D3, downregulace c-myc

**Indukce diferenciaci a apoptózy** – genové arrays

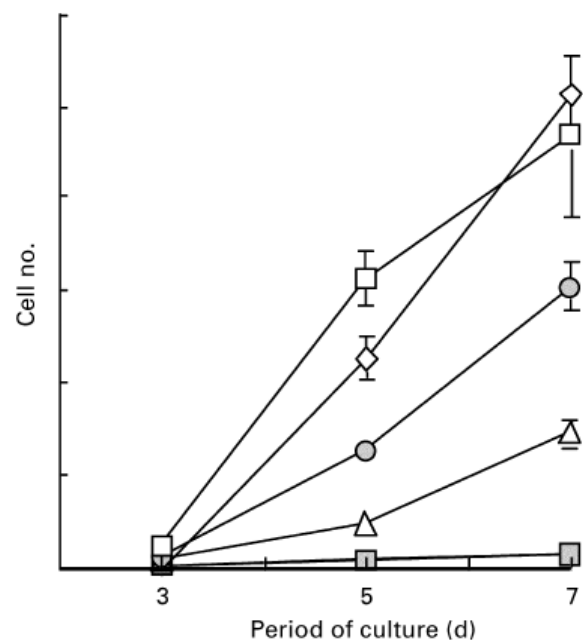
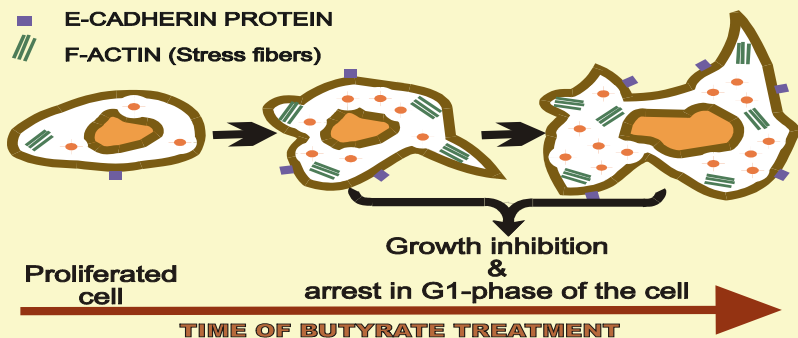
**Inhibitor histon deacetyláz** – změny exprese genů

Ovlivnění specif. kináz, aktivace PPAR gamma, inhibice NFkB

Inhibice c-Src, FAK, iNOS, COX-2

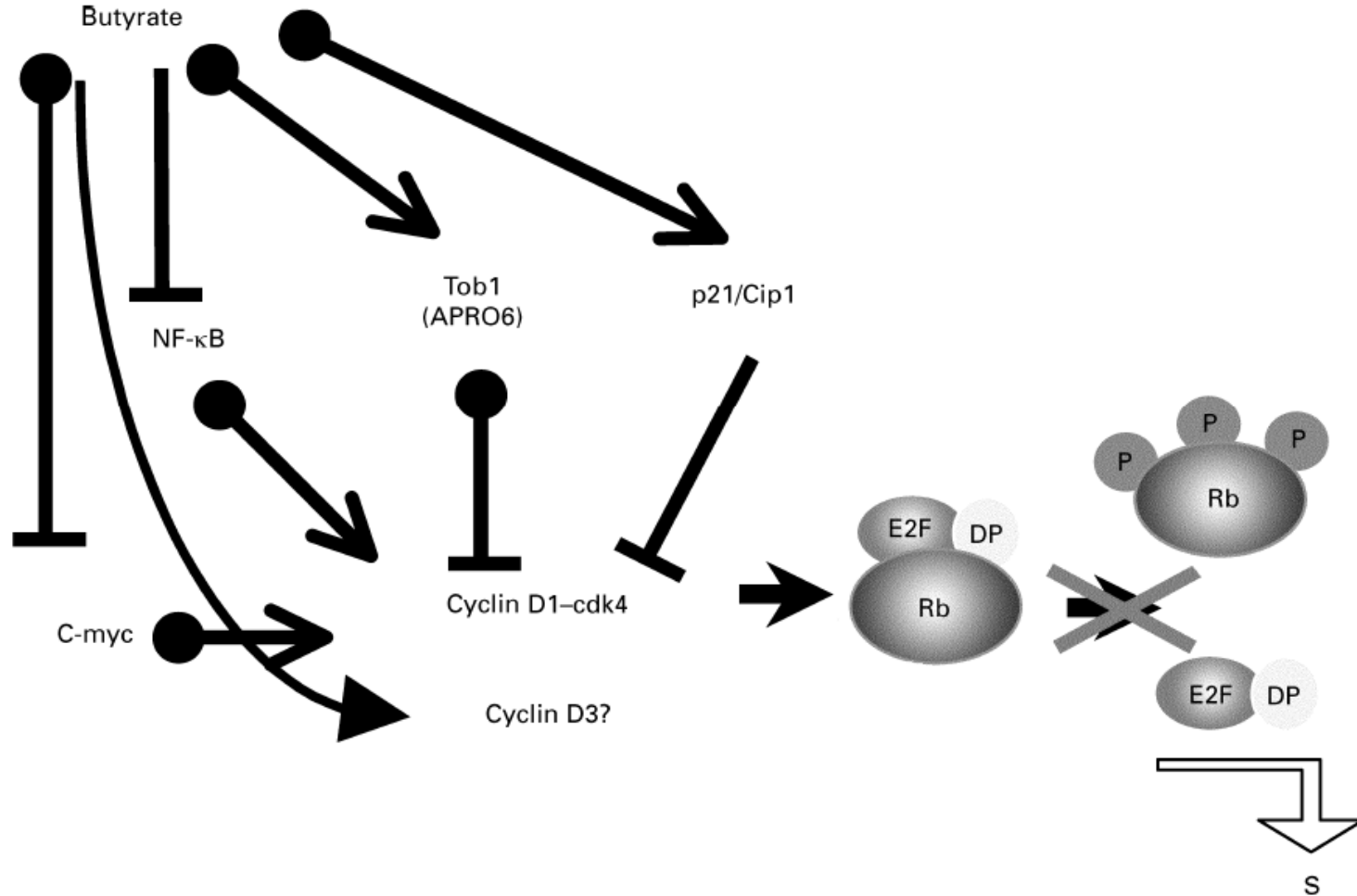


- ALKALINE PHOSPHATASE
- E-CADHERIN PROTEIN
- /// F-ACTIN (Stress fibers)



**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.

Short-chain fatty acids



**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-κB, 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.

# LIPIDOVÉ SLOŽKY VÝŽIVY

## VÍCE, NEŽLI JEN ZDROJ ENERGIE!!!!

- ◆ **strukturální a regulační úloha**
- ◆ **dopad na fyziologické funkce organismu**
  - účinky na imunitní systém
  - regulace proliferace, diferenciací a apoptózy

### ▶ **úloha v karcinogenezi**

(etiologie nádorů tlustého střeva, prostaty, prsu)

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

Poměr obsahu  $\omega$ -6 a  $\omega$ -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.).

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- $\beta$ 1), induktorům apoptózy (TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL) a diferenciaci (butyrát)

# CYTOKINY

Důležité endogenní faktory ovlivňující kolorektální karcinogenezi

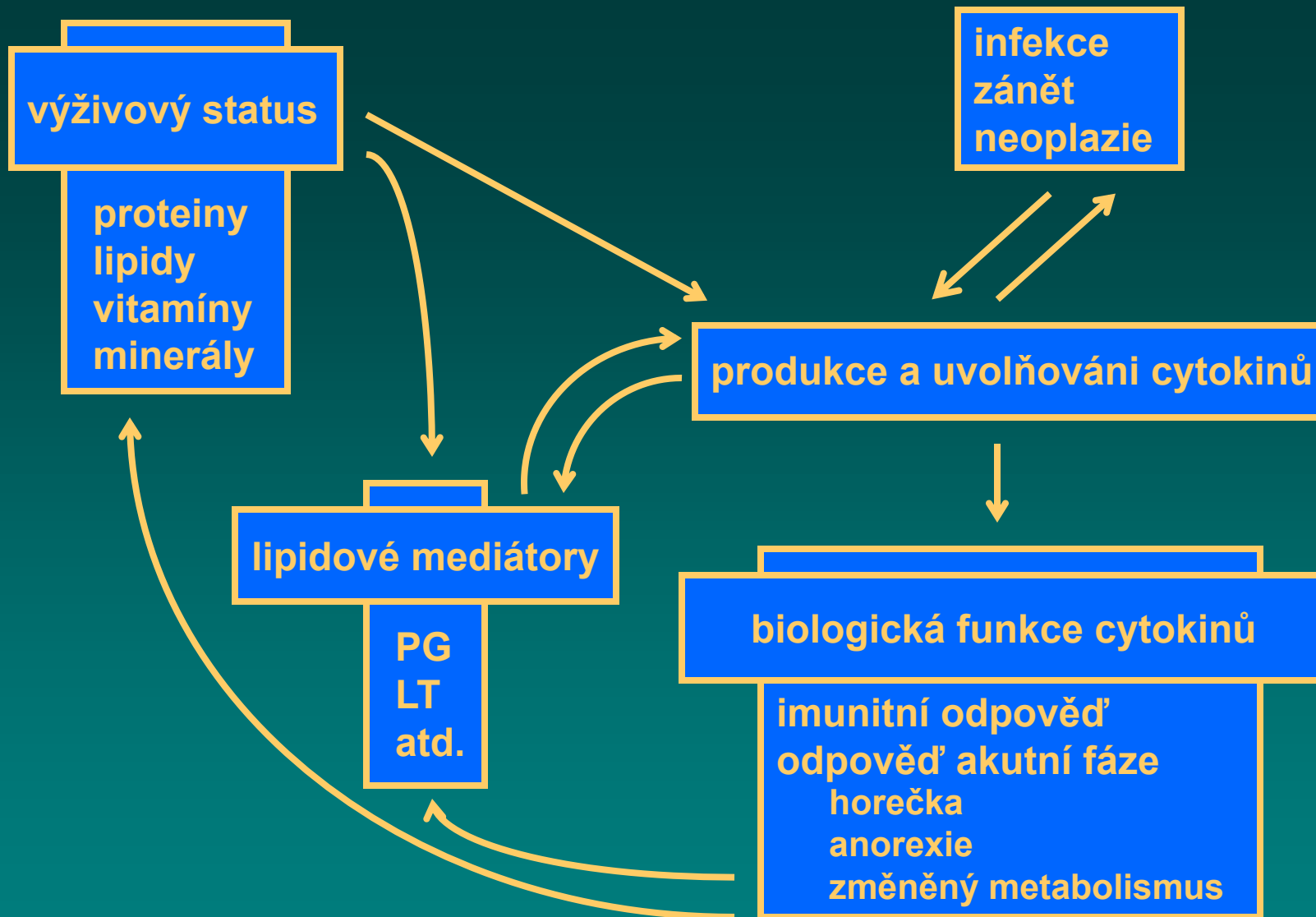
**TNF-family** (TNF- $\alpha$ , Fas ligand, TRAIL – TNF relating apoptosis inducing factor)

**TGF-family** (TGF- $\beta$ )

**EGF** – epidermální růstový faktor

**Tumour necrosis factor-alpha** (TNF-  $\alpha$ ), interleukiny

- ▶ multifunkční cytokin
- ▶ jeden z hlavních mediátorů zánětu
- ▶ TNF-  $\alpha$  je produkován makrofágy a dalšími buňkami imunitního systému
- ▶ koncentrace TNF-  $\alpha$  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



**Vzájemné vztahy mezi výživou a infekčními a zánětlivými chorobami zprostředkovanými cytokiny**

# ZMĚNY BIOFYZIKÁLNÍCH VLASTNOSTÍ BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

- ▶ provázejí procesy diferenciaci a apoptózy savčích buněk
- ▶ pozorovány rozdíly u
  - nádorových a normálních buněk
  - nádorových buněk senzitivních a rezistentních k cytostatikám
- ▶ souvisejí do značné míry s modulacemi ve složení, struktuře, symetrii a metabolismu buněčných lipidů.



Detekce těchto změn  
a jejich korelace s dalšími parametry  
odrážejícími diferenciaci a apoptózu  
přispívá k objasnění



- posloupnosti a regulace jednotlivých kroků těchto dějů
- rozdílů mezi normálními a nádorovými buňkami
- příčin rezistence nádorových buněk k terapii

# PARAMETRY DETEKOVANÉ v LC

- ◆ strukturální změny lipidů v bun. membránách, tzv. „lipid packing“ (merocyanine 540, FCM)
- ◆ membránový potenciál (DiOC5, FCM)
- ◆ exprese transportního proteinu pro mastné kyseliny - FAT/CD36, MCT1 (FCM)
- ◆ akumulace triglyceridů (lipid droplets) v cytoplazmě buněk (Nile red, FCM)
- ◆ změny mitochondriálního transmembránového potenciálu (TMRE, FCM)
- ◆ produkce reaktivních kyslíkových metabolitů -ROS (DHR-123, FCM)

## CYTOKINETIKA

Proliferace - počty buněk, buněčný cyklus, regulační proteiny

Diferenciace – aktivita alkalické fosfatázy (ALP), CEA, E-kadherin, F-aktin

Buněčná smrt (apoptóza)– viabilita, % plov.buněk, subG0/G1, MMP, Apo2.7, kaspázy, štěpení PARP, Bcl-2 rodina, morfologie jader (DAPI)...

# METODOLOGIE



## CYTOKINETIKA

**Detekce proliferace**- regulace buněčného cyklu a zapojených proteinů,

**diferenciace** -buněčná morfolgie, 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

# Detekce apoptózy různými metodami

## Průtoková cytometrie

## Fluorimetrie

## Fluorescenční mikroskopie

## Western blotting

### ÚVOD

Apoptóza, geneticky kontrovaný proces buněčné smrti, je charakterována 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, změněn mitochondriálního membránového potenciálu, změněn i symetrii rozložení lipidů v membránách a aktivaci endonukleáz, které je doprovázena internukleozomální fragmentací DNA.

TRAIL je ligand z rodiny TNF (tumour necrosis factor), který indukují apoptózu u celé řady nádorových buněk, zatímco v normálních buněk je k jeho účinkům rezistentní. V současné době je intenzivně studována možnost využití TRAILu v protinádorové terapii. Úspěšně využívá TRAILu v klinické praxi mezi předchází detailní studium jeho signální dráhy.

TRAIL indukuje apoptózu po vazbě na tzv. „death receptors“ DR4 (TRAIL-R1) a DR5 (TRAIL-R2). Na úrovni proapoptotického signálního komplexu zvaného DISC a k aktivaci iniciálních kaspáz-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. mitochondriálního štěpení DNA (MMP) podléhají proteiny rodiny Bcl-2, reaktivní metabolismy kyslíku, změny mitochondriálního membránového potenciálu a vyžití proapoptotických proteinů do cytoplazmy. Následuje aktivace iniciálních kaspáz-9, které dále aktivuje kaspázy-3. Tato elektrická kaspáza se pak podílí na štěpení celé řady tzv. „death substrátů“ jako jsou např. poly(ADP-ribose) 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, fluorimetrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie a western blottingu s následnou imunodektací. Získané výsledky, jejich srovnání a interpretace jsou obsahem tohoto sdělení.

### CÍLE PRÁCE

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

### 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 malé počty fragmentů o vysoké molekulové hmotnosti, pro jejichž detekci pravděpodobně nebývá metoda TUNEL dostatečně citlivá.

### USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ

Buněk HT-29 byly vysévány v McCoyově médiu s 5% séra a kultivovány při standardních podmínkách. 24 hodin po vysevu byly buňky cvrtněny 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 (FACS-Calibur, Becton Dickinson). Získané výsledky byly dále doplněny pomocí metod fluorimetrie (Fluostar Galaxy), fluorescenční mikroskopie (Olympus IX70) a metod western blottingu s následnou imunodektací. Všechna data byly 3x nezávisle opakovaně byla statisticky vyhodnocena (ANOVA, Tukey test, p 0,05), (\*) značí výsledek významný ve srovnání s neovlivněnou kontrolou.

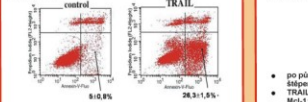
### SHRNUTÍ

Bylo provedeno srovnání vybraných získaných pomocí metod průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Hodnoty v tabulce představují výsledky (průměry ze tří nezávislých 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	2,6	0,3
TRAIL	25,7	26,3	17,1	14,6	16,0	0,3

### Translokace fosfatidylinositolu (PS) AnnexinV (Cytochrom c) (průtoková cytometrie)

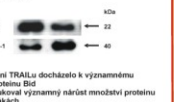
Během apoptózy dochází k translokaci PS u vnější strany mitochondriální membrány na stranu vnějšku. Pro detekci externalizovaného PS se používá antezes-V konjugovaný s FITC. Pro rozlišení populace apoptotických a necrotických buněk je vhodné použít barvení propidium jodidem (PI). Apoptotické buňky jsou pozitivní na annexin-V, avšak negativní na PI.



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

### Proteiny rodiny Bcl-2 - Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak (western blotting, imunodekce)

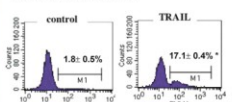
Proteiny rodiny Bcl-2 s antiapoptotickou (Bcl-2, Mcl-1) i proapoptotickou (Bid, Bax, Bak) funkcí se významně uplatňují v regulaci apoptózy indukované TRAILem u celé řady buněk na úrovni mitochondrií. Studovali jsme množství uvedených proteinů v buňkách pomocí elektroforézy, western blottingu a následně imunodekce 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 změnilo množství proteinů Bax a Bak
- v buňkách linie HT-29 se nevyskytl protein Bcl-2

### Mitochondriální protein Apo2.7 (Apo2.7, FLE, průtoková cytometrie)

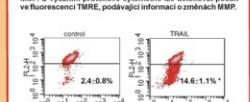
Apo2.7 (FAS antigen) je protein o velikosti 38 kDa, nacházející se v membráně mitochondrií. Jeho exprese je charakteristická pro buňky podléhající apoptóze. V nepřítomnosti apoptotického stimulu není tento protein v buňce detekován. Detekce proteinu Apo2.7 se provádí pomocí specifické protilátky Apo2.7-FITC,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



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

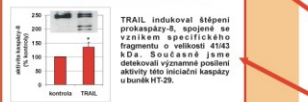
### Mitochondriální membránový potenciál (MMP) - TMRE (průtoková cytometrie)

Změna MMP se hodí jako nepřímý důkaz oběhnutí mitochondrií a zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, které hraje úlohu při vyžití některých mediátorů apoptózy a těchto organel. Při analýze MMP se používá fluorescenční lipofila tanine TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester) který se hromadí v mitochondriích a zůstává na MMP. S využitím průtokové cytometrie lze detekovat posun ve fluorescenci TMRE, poskytující informaci o změnách MMP.



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

### Aktivita kaspázy-3, štěpení prokaspázy-3 (fluorimetrická detekce, western blotting)



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

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



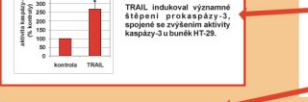
TRAIL indukoval významné štěpení prokaspázy-3, spojené se zvýšením aktivity kaspázy-3 u buněk HT-29.

### Produkt ROS (DHR-123, průtoková cytometrie)



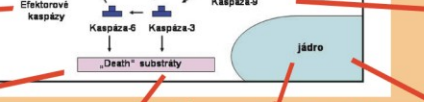
Reaktivní metabolismy kyslíku (ROS) mohou hrát významnou úlohu u indukci apoptózy. Pro měření produkce ROS jsme využili fluorescenční indikátor dihydrodihydrodimin-123 (DHR-123). Ve studovaných časových intervalech jsme však nepozorovali změny v produkci ROS při působení TRAILu u buněk HT-29.

### Specifické štěpení cytokeratinu 18 (CK18) (agarózová elektroforéza, průtoková cytometrie)



TRAIL indukoval významné štěpení CK18, což je indikací na probíhající apoptózu.

### Štěpení jaderného PARP (western blotting)



PARP je jaderný protein (113 kDa), který se podílí na opravě zraněné DNA. Během apoptózy dochází ke specifickému štěpení PARP na fragmenty o velikosti 89 a 23 kDa. Detekce těchto fragmentů je považována za citlivý marker charakterizující probíhající apoptózu.

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



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

### Internukleozomální štěpení DNA (TUNEL, průtoková cytometrie)



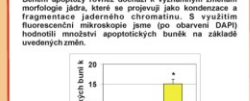
U buněk HT-29 během apoptózy indukované TRAILem nebyla prokázána internukleozomální fragmentace DNA. Absence fragmentů DNA o velikosti 180 bp v apoptotických buňkách HT-29 byla v naší laboratoři rovněž potvrzena pomocí agarózové gelové elektroforézy DNA.

### Jaderná morfologie (DAPI, fluorescenční mikroskopie)



Během apoptózy rovněž dochází k významným změnám morfologie jádra, které se projevují jako kondenzace a fragmentace DNA. Při studiu jsme využili fluorescenční mikroskopie jako (po obarvení DAPI) hodnocení množství apoptotických buněk na základě změn v jádrech.

### Jaderná morfologie (DAPI, fluorescenční mikroskopie)



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

- 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

# 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...“)

## DALŠÍ PARAMETRY

- ◆ **Fluidita membrán** – polarizace fluorescence  
TMA-DPH (trimethylammonium diphenylhexatriene)
- ◆ **Analýza fosfolipidů a spektra mastných kyselin**  
Celé buňky, membránová frakce, mitochondrie (kardiolipin)
- ◆ **Detekce specifických typů lipidových molekul**  
(ceramid, eikosanoidy.....)
- ◆ **Lipidový metabolismus** - inhibitory AA, exprese a aktivity spec. enzymů (PLA, COX, LOX,.....),  
Oxidativní metabolismus – produkce ROS, NOS  
peroxidace lipidů,  
glutathion, enzymové aktivity - iNOS, MnSOD atd.

## MEROCYANIN 540 (MC540)

- ▶ Lipofilní, negativně nabitý heterocyklický chromofor m. v. 570 D, používán ve fotodynamické terapii
- ▶ Váže se preferenčně na biologické membrány a lipozomy a je citlivý ke strukturálním změnám lipidů
- ▶ Rozsah vazby a následně intenzita fluorescence je ovlivňována
  - změnou tzv. „lipid packing“
  - membránovým potenciálem
  - přítomnosti séra, pH a iontovou silou

# VYUŽITÍ MC540

Pomocí MC540 lze monitorovat

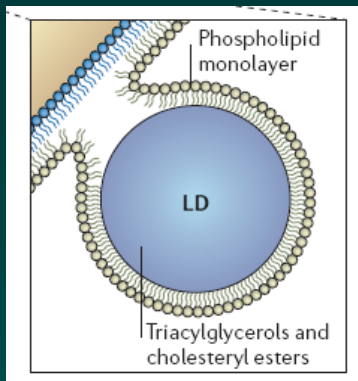
- ▶ strukturální změny membránových fosfolipidů (změny asymetrie) během proliferace, diferenciace a apoptózy
- ▶ jemné rozdíly membránových lipidů u podobných buněk (nádorové vs. nenádorové, senzitivní vs. rezistentní)

FL-2

"looser lipid packing" (rozvolňování) ↑ zvýšená fluorescence

"more tight packing" (upevňování) ↓ snížená fluorescence





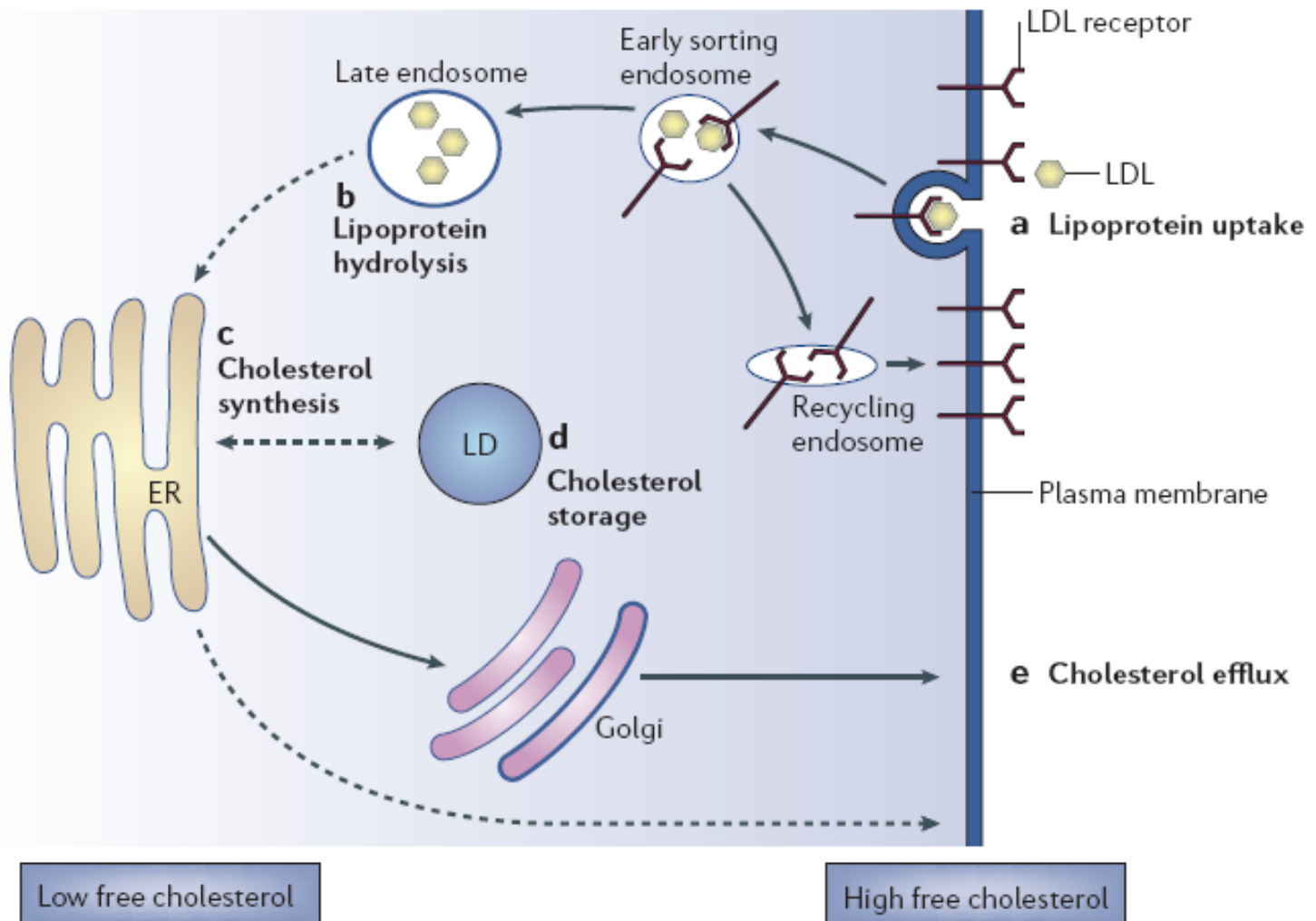
# „LIPID DROPLETS“

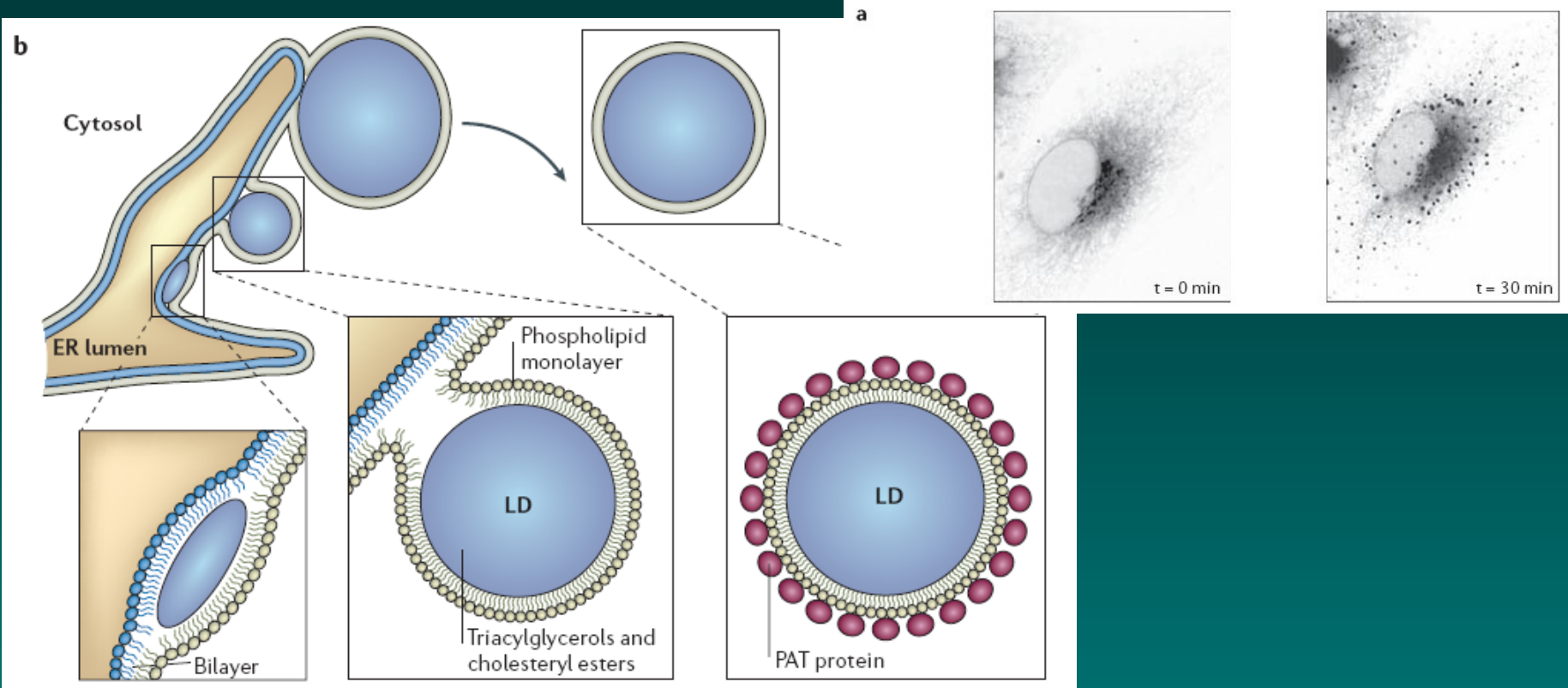
## AKUMULACE LIPIDŮ V CYTOPLAZMĚ

### Nile Red

- ▶ akumulace lipidových kapének (lipid droplets) v cytoplazmě buněk (působení lipidových látek, indukce diferenciace a apoptózy )
- ▶ obsahují neutrální lipidy (obvykle triacylglyceroly nebo estery cholesterolu)  
za normálních podmínek - zásobárna energie a cholesterolu
- ▶ souvislost s regulací procesů diferenciace a apoptózy není zcela objasněna
- ▶ fluorescenční barvivo Nile Red (FL-1 a FL-3)  
citlivé vitální barvení lipidových kapének

## Box 2 | Intracellular cholesterol regulation





**Figure 1 | The formation of lipid droplets.** **a** | The formation of lipid droplets (LDs) as monitored by the use of a caveolin-truncation-mutant-green-fluorescent-protein fusion protein (Cav3<sup>DGV</sup>-GFP). Before fatty acid addition (t = 0 min), Cav3<sup>DGV</sup>-GFP localizes to the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi region (the image has been inverted to show dark staining for GFP). After fatty acid addition, LDs appear throughout the cell within minutes (the t = 30 min image is shown here). For a movie of this process, see the Further information. **b** | In the current model of LD formation, neutral lipids are synthesized between the leaflets of the ER membrane. The mature LD is then thought to bud from the ER membrane to form an independent organelle that is bounded by a limiting monolayer of phospholipids and LD-associated proteins. Some of the best understood LD-associated proteins are members of the PAT (perilipin, ADRP and TIP47-related protein)-domain family of proteins. Part a modified with permission from REF. 8 © (2004) The American Society for Cell Biology.

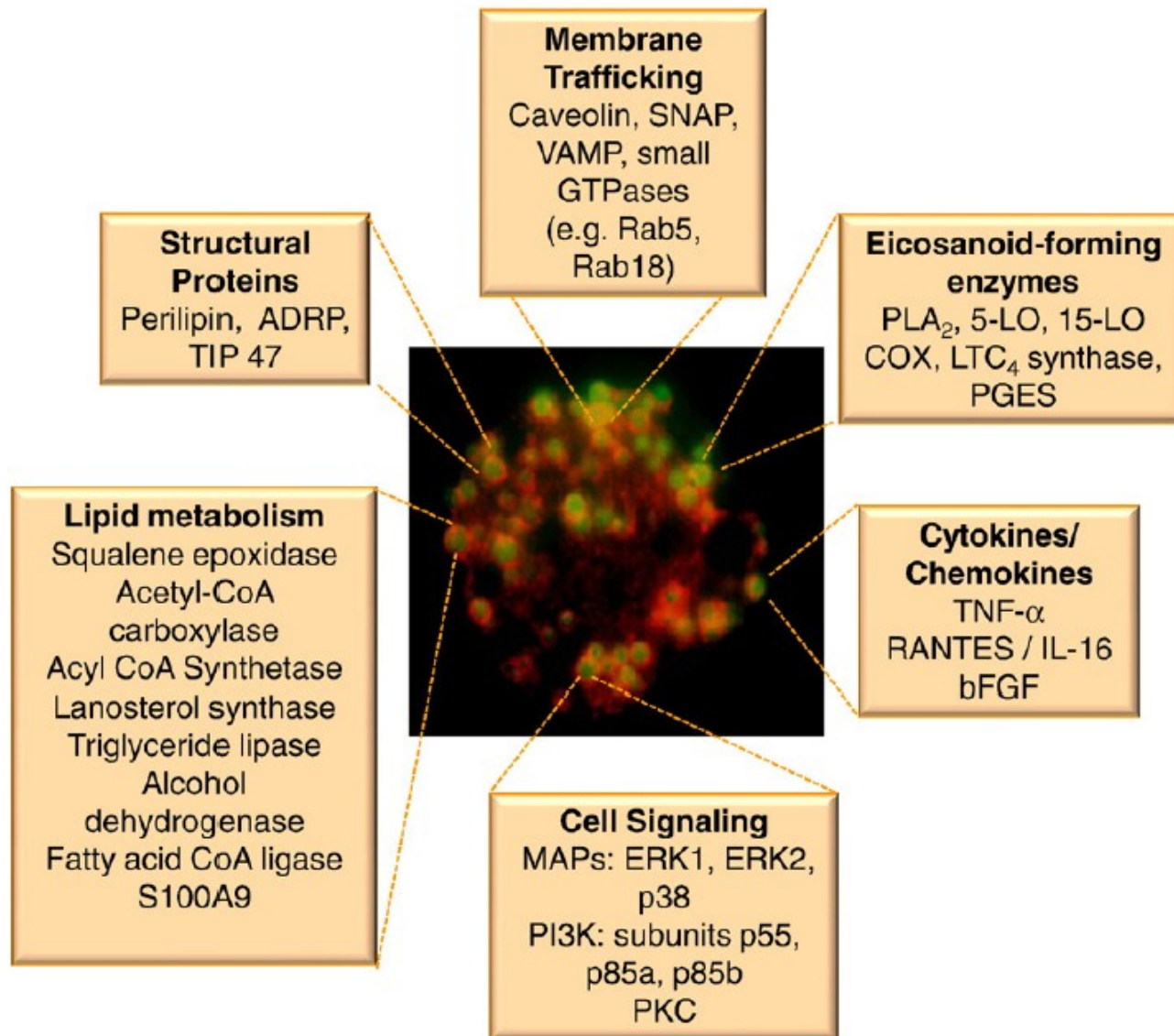
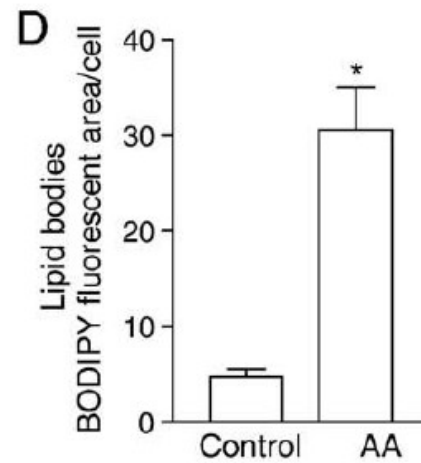
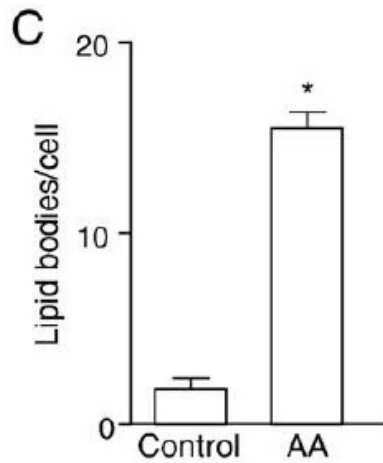
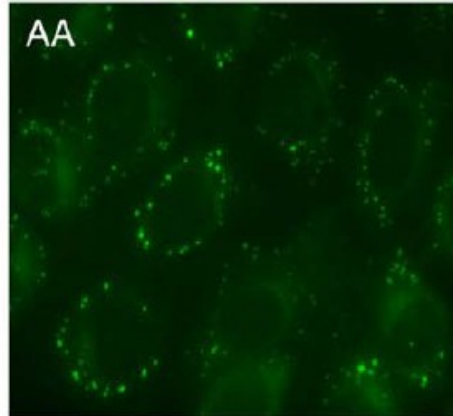
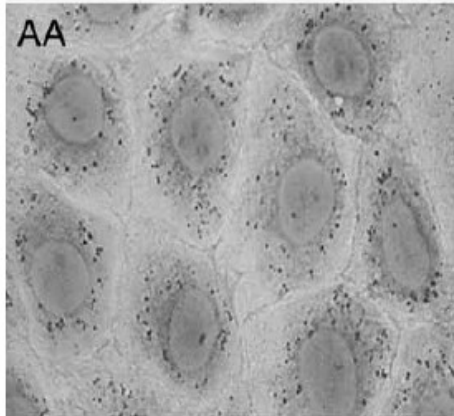
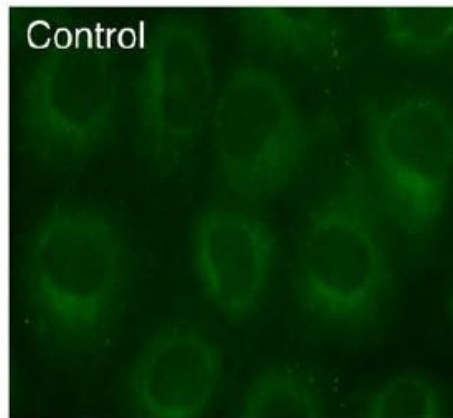
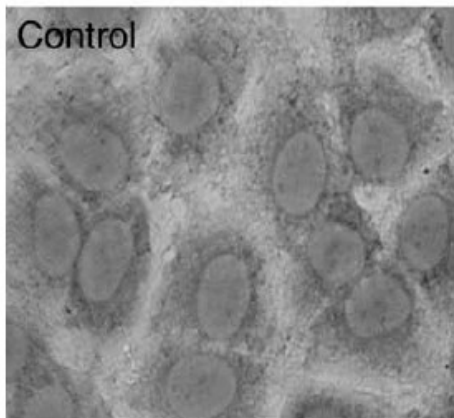


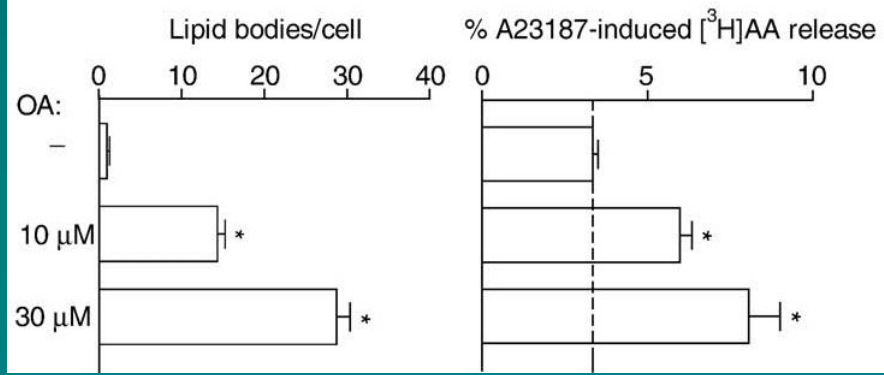
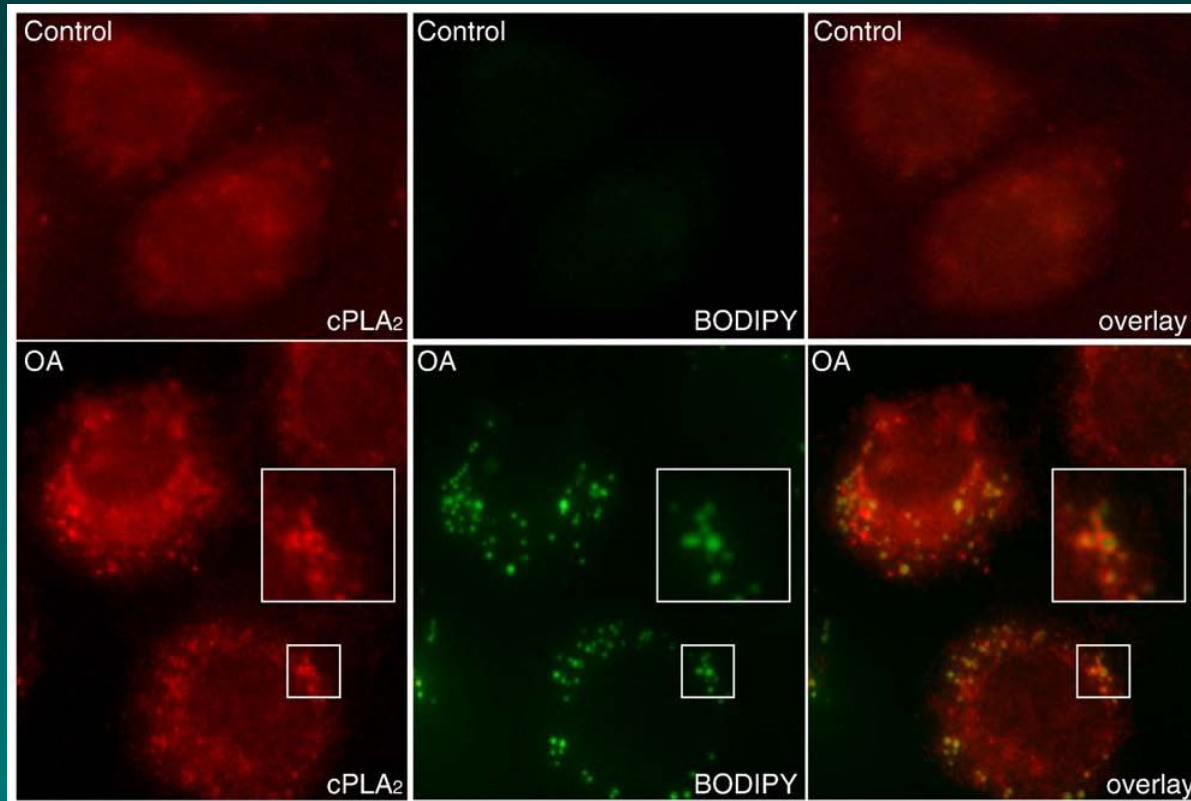
Fig. 1. Lipid body-associated proteins.



Akumulace lipid bodies (droplets v cytoplasmě buněk kolonu po přidání AA

Moreira LS, Biochim Biophys Acta 2009

# Kolokalizace lipid bodies (droplets) s cPLA<sub>2</sub> a uvolňování AA u kolonových buněk po působení kyseliny olejové



# LIPIDOVÉ RAFTY

malé oblasti proteinů a lipidů v membráně s unikátním složením lipidů – bohaté na cholesterol.

Tyto struktury jsou funkčně zahrnuty v kompartmentalizaci, modulaci a integraci buněčných signálů a tak modulují důležité procesy jako buněčný růst, přežití a adhezi.

VNMK jsou základní složkou lipidových raftů a předpokládá se, že např. DHA může částečně působit zvýšením fázové separace lipidů v membráně.

Strukturální integrita LR a caveolae jsou základní pro příjem VNMK. Caveolin-1 a FAT/CD36 jsou vázány v LR

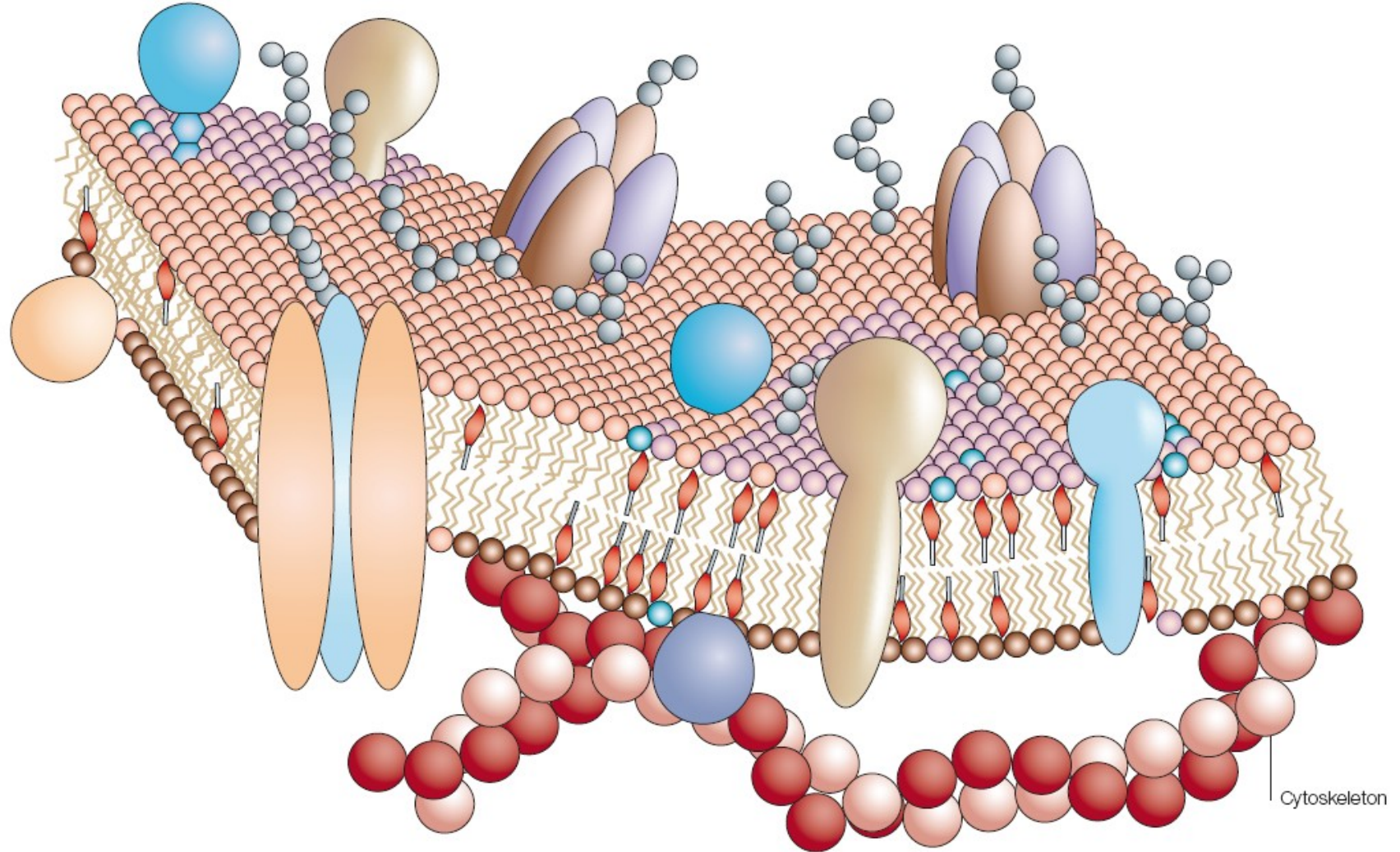
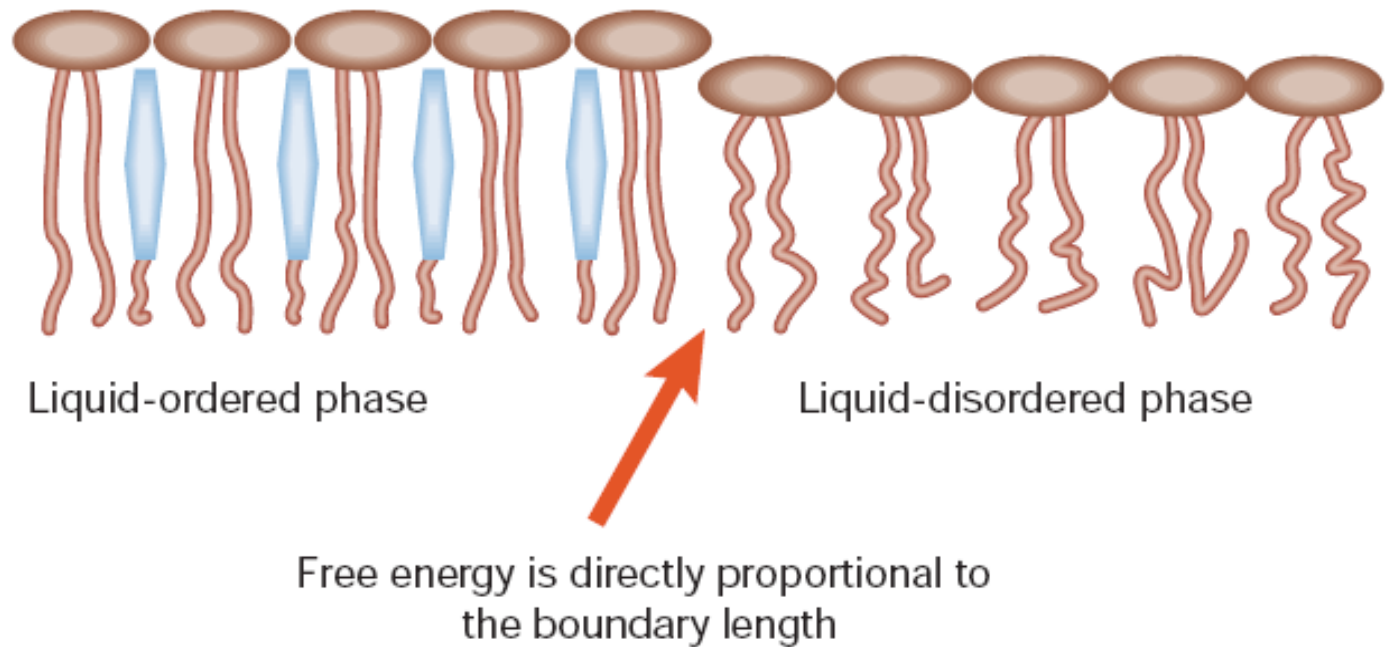


Figure 2 | **The Fluid-Mosaic-Model of the cell membrane.** Like a mosaic, the cell membrane is a complex structure made up of many different parts, such as proteins, phospholipids and cholesterol. The relative amounts of these components vary from membrane to membrane, and the types of lipids in membranes can also vary.

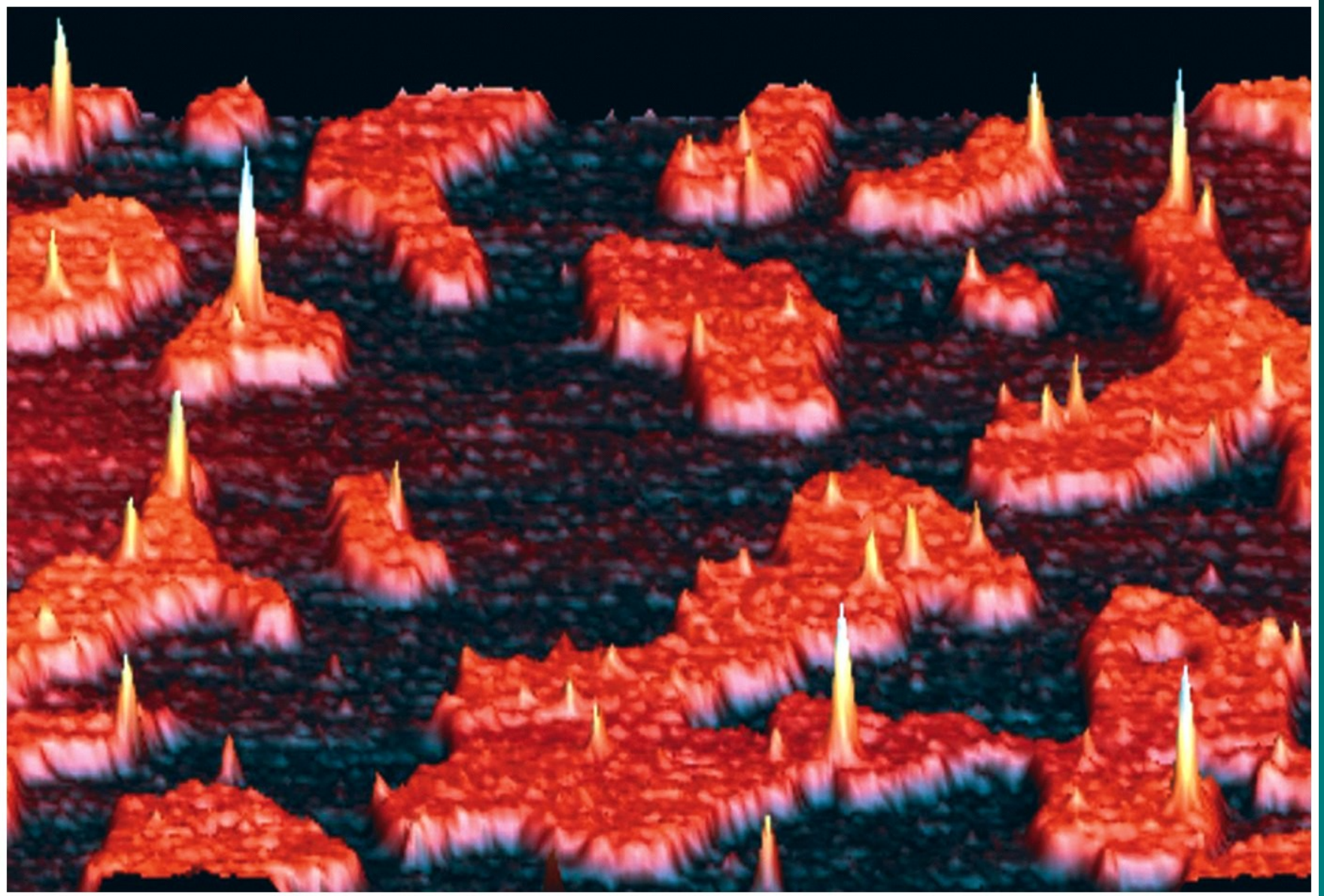




**Fig. 2** | Mismatch of hydrated phospholipids and the intercalation of cholesterol as a driving force for a phase separation into liquid-ordered and -disordered phases. (Figure courtesy of P. Kinnunen.)

PC black, SM red, PLAP yellow.

Atomic force microscopy!



Lodish, Molecular Cell Biology, 5th ed. 2004

# Modulace lipidů (DHA)– lipidové rafty – modulace signálů TNFR

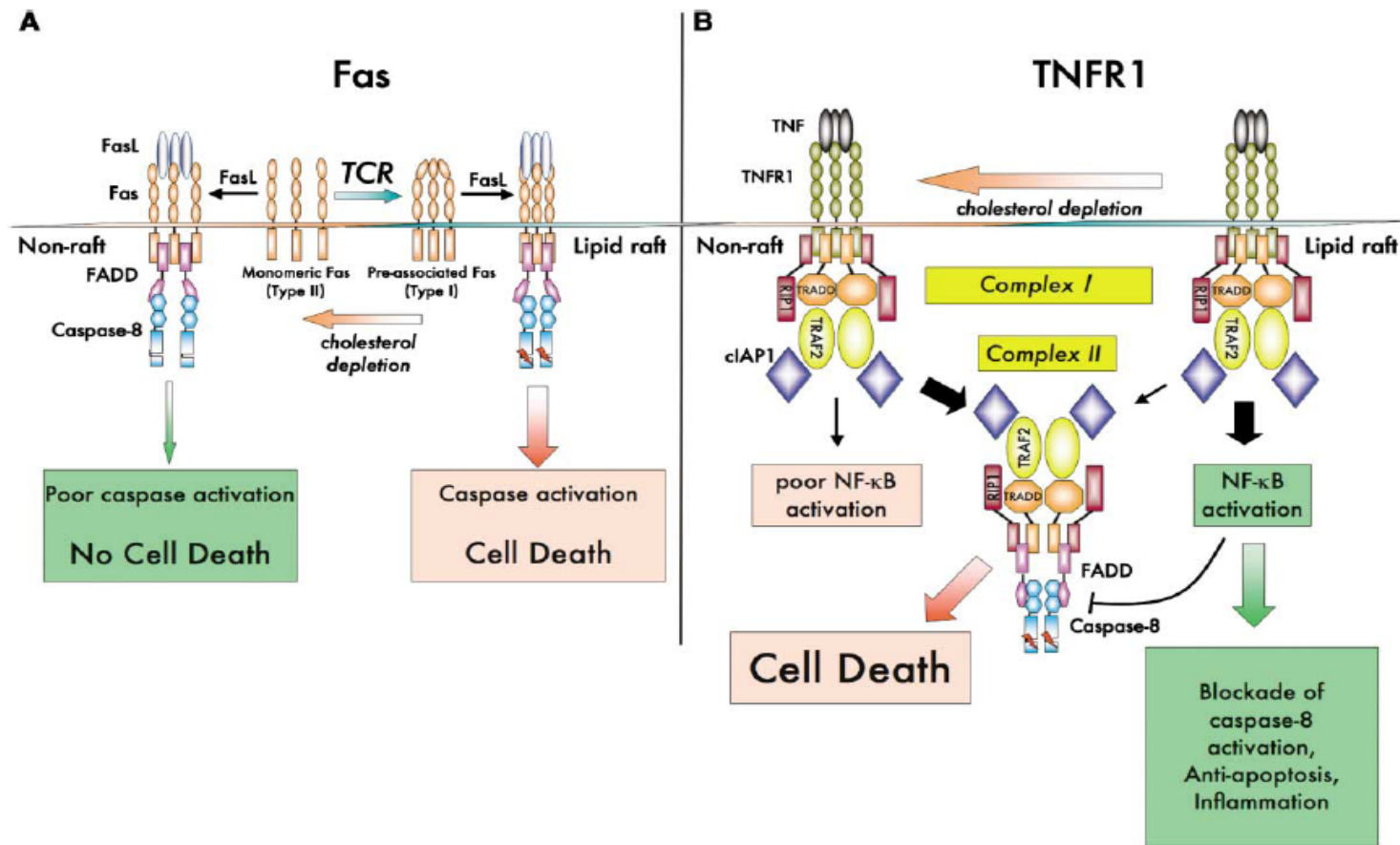


Figure 2. Examples of How Lipid Rafts Can Modify Early Events in TNFR Family Signaling

(A) In activated CD4<sup>+</sup> T cells, Fas is excluded from lipid rafts. Outside of lipid rafts, Fas is likely to be monomeric. After engagement by FasL, although FADD and caspase-8 are recruited to Fas, they do not signal efficiently for death. Upon TCR restimulation, Fas translocates into lipid rafts where it tends to preassociate. Within lipid rafts, upon FasL binding, FADD and caspase-8 are recruited to Fas where caspase-8 can autoactivate and trigger cell death.

(B) Upon TNF binding, TNFR1 translocates into lipid rafts wherein complex I formation takes place and results in the activation of NF-κB. Through mechanisms described in Figure 1, NF-κB can inhibit caspase activation within complex II. When cholesterol is depleted, lipid raft structure is disrupted and complex I forms outside of lipid rafts and cannot signal efficiently for NF-κB and therefore cannot inhibit death induced by complex II. The thickness of the arrows indicates relative efficiency of each signaling pathway.