

# Úloha lipidových komponent v buněčných signalizacích a využití protinádorových farmak

(vybrané modely a metody detekce)

**A. Kozubík**

Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)

Ústav experimentální biologie, PŘF MU

(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)

**Brno**

# MOŽNÉ CÍLE VÝZKUMU

**Poznání mechanismů působení látek lipidové povahy, zejména VNMK a jejich derivátů, v mezi- a vnitrobuněčných komunikacích podílejících se**

**v regulaci cytokinetiky (proliferace, diferenciace a apoptózy) v kontextu jejich interakcí s**

- fyziologickými regulátory růstu,
- environmentálními polutanty
- vybranými farmaky.

**Jedním z praktických cílů je využít tyto znalosti v rámci přípravy lipidových nutričních preparátů, případně cytostatik.**

# Cisplatina

(*cis*-diamminedichloroplatinum(II), *cis*-DDP)

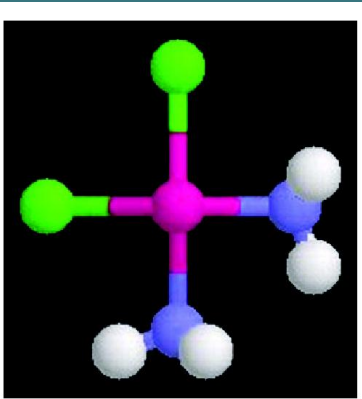
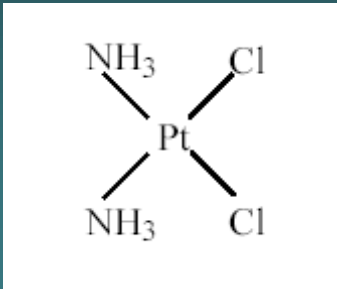
➤ Jedno z nejúčinnějších cytostatik a nejčastěji využívaných cytostatik;

➤ **Vykazuje klinickou účinnost proti mnoha malignitám epiteliálního původu, jako** nádorům plic, hlavy a krku, močového měchýře, avšak zejména při léčbě nádorů **varlat a ovarií**

## OMEZENÍ

1) vážné **nepřízivé vedlejší účinky** (adverse reactions), včetně renální a gastrointestinální toxicity, periferální neuropatie, asthenie apod.

2) Využitelnost k těmto cytostatikům omezuje jak „přirozená“ (**inherent, intrinsic**), tak **získaná rezistance buněk**.



Cisplatin structure courtesy of Mitch Miller (Net-Genics, Cleveland).

# Biologické cíle cis-DDP (adukty cisplatina-DNA)

## ➤ Jaderná DNA -

- hlavní cíl působení *cis*-DDP v buňce

Viz. experimentální důkazy za posledních 30 let,  
(Jamieson, ER. *et al.*, J Chem Rev, 1999)

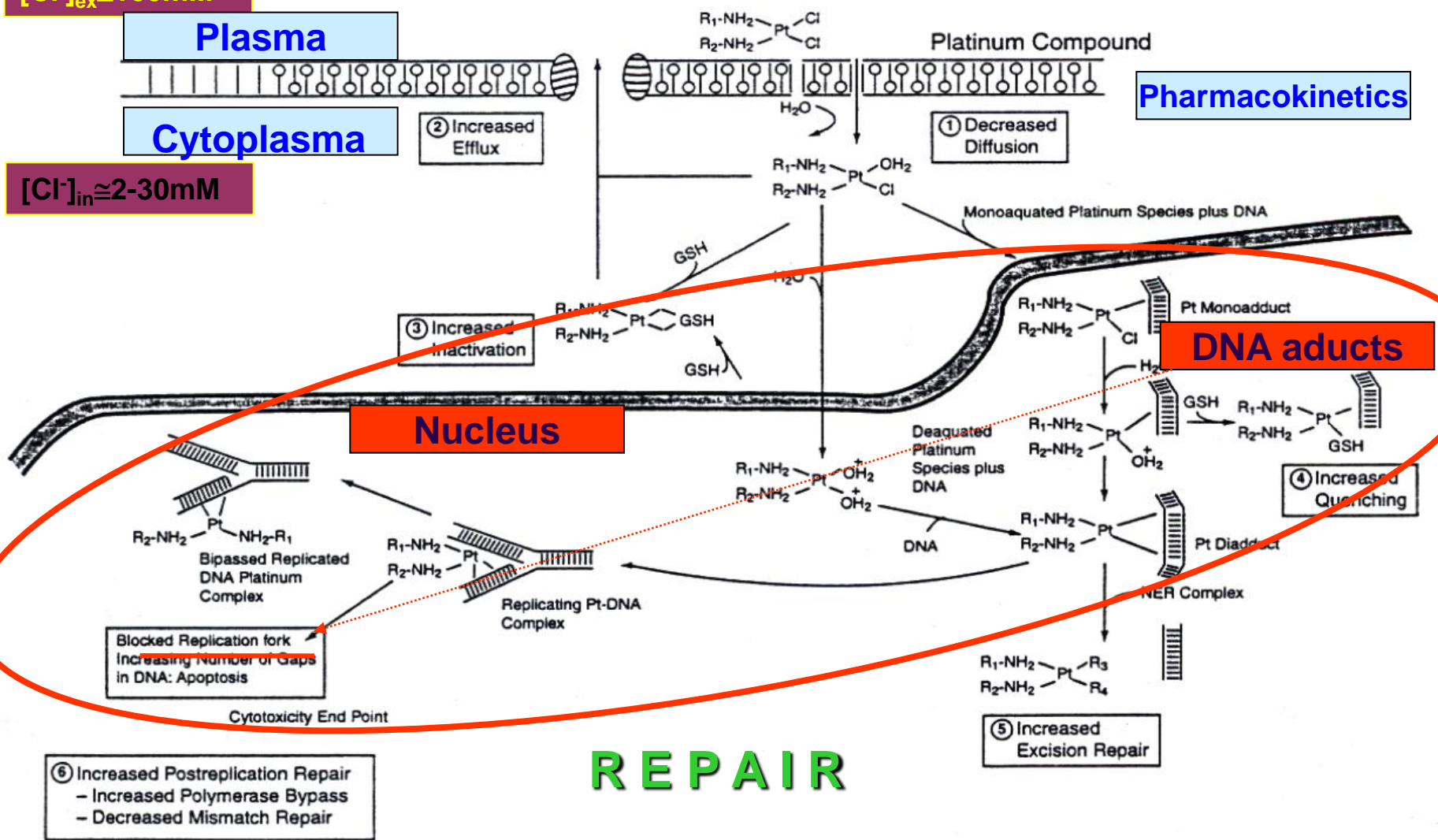
# „Uptake“ a cytotoxické působení cisplatiny(II).

$[Cl^-]_{ex} \approx 100mM$

**Plasma**

**Cytoplasm**

$[Cl^-]_{in} \approx 2-30mM$



**REPAIR**

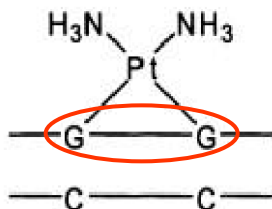
# Biologické „cíle“ cisplatiny (adukty s DNA)

*Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs*

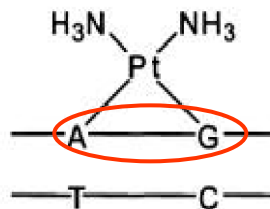
*Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, Vol. 2, No. 4 3*

Typy DNA !  
aduktů

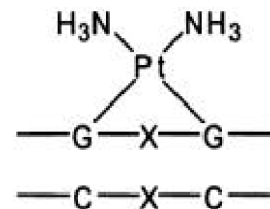
Intra-  
(80-90%)



1,2 GpG intrastrand  
(60-65%) !!



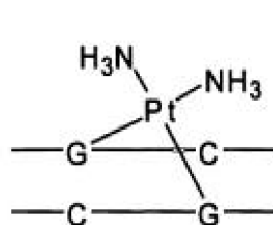
1,2 ApG intrastrand  
(20-25%) !



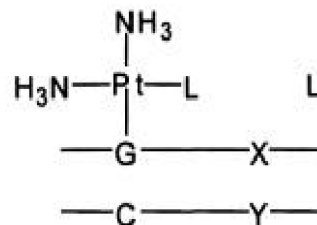
1,3 GpXpG intrastrand  
(~2%)

a frekvence  
jejich výskytu

Inter-



1,2 GpG interstrand  
(<1%)



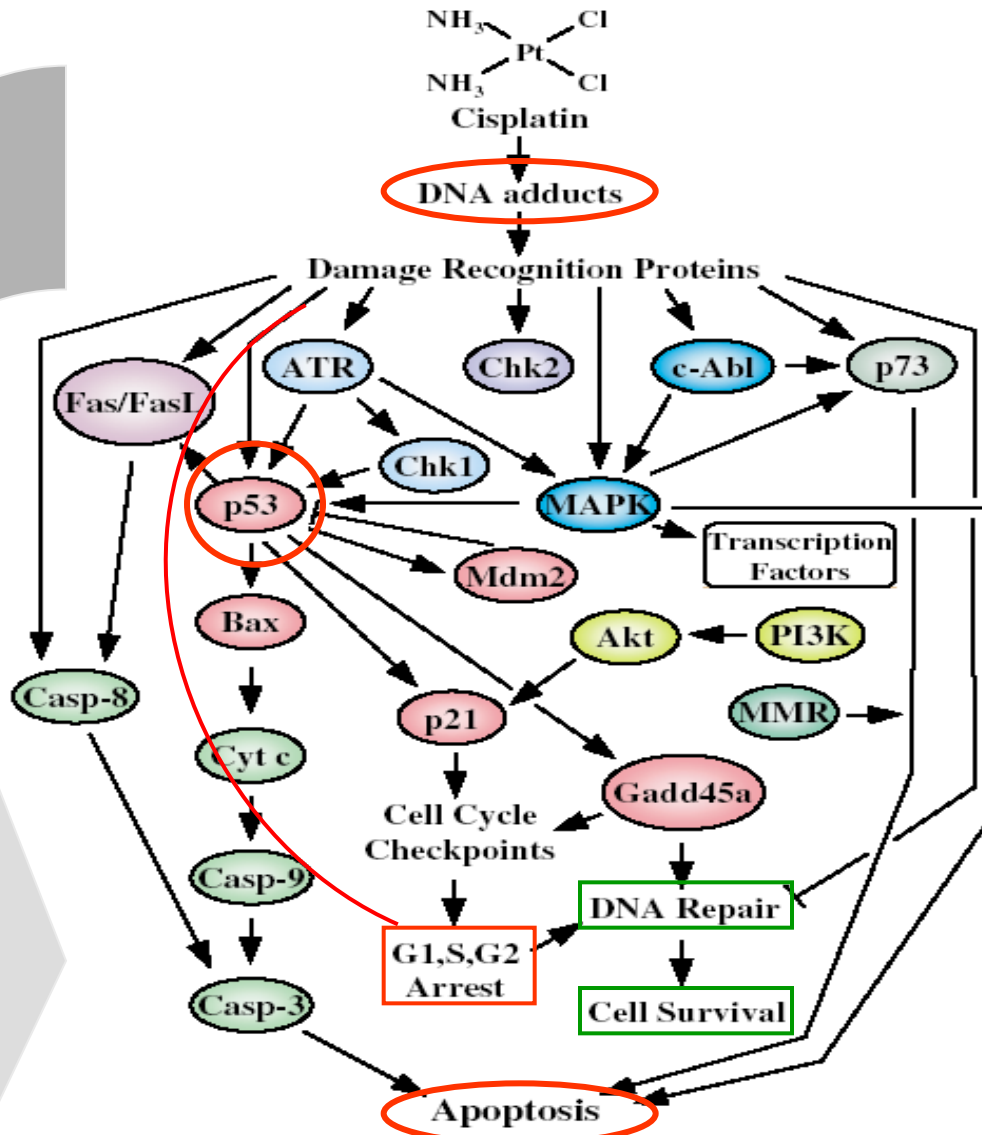
monofunctional  
G-adduct

L = Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O, S-R

mono-

Fig. (2). Types of cisplatin-DNA adducts and their frequency of formation.

- Bylo ale prokázáno, že **cis-DDP inhibuje růst** nádorových buněk **v koncentracích výrazně nižších** než ty, **které jsou potřebné k inhibici syntézy DNA !!!!!**
- Otvírá se tak nový prostor, kde je třeba stávající „dogmata“ přehodnotit a přesunout pozornost k dalším, již prokázaným, cílům působení pt-derivátů.
- Hlavní oblast těchto dalších účinků souvisí s buněčnými signalizacemi zapojenými v regulaci cytokinetiky.
- To naznačuje **nové možnosti cílených modulací** efektů pt-cytostatik.



**Figure 1** An overview of pathways involved in mediating cisplatin-induced cellular effects. Cell death or cell survival will depend on the relative intensity of the signals generated and the crosstalk between the pathways involved. Some of the signaling discussed in the text has been omitted for clarity

Molekulární podstata  
cytotoxického  
působení **cisplatiny**  
iniciované adukty DNA

B. smrt závisí na  
relativní intenzitě  
Signálů

LA-12 ?



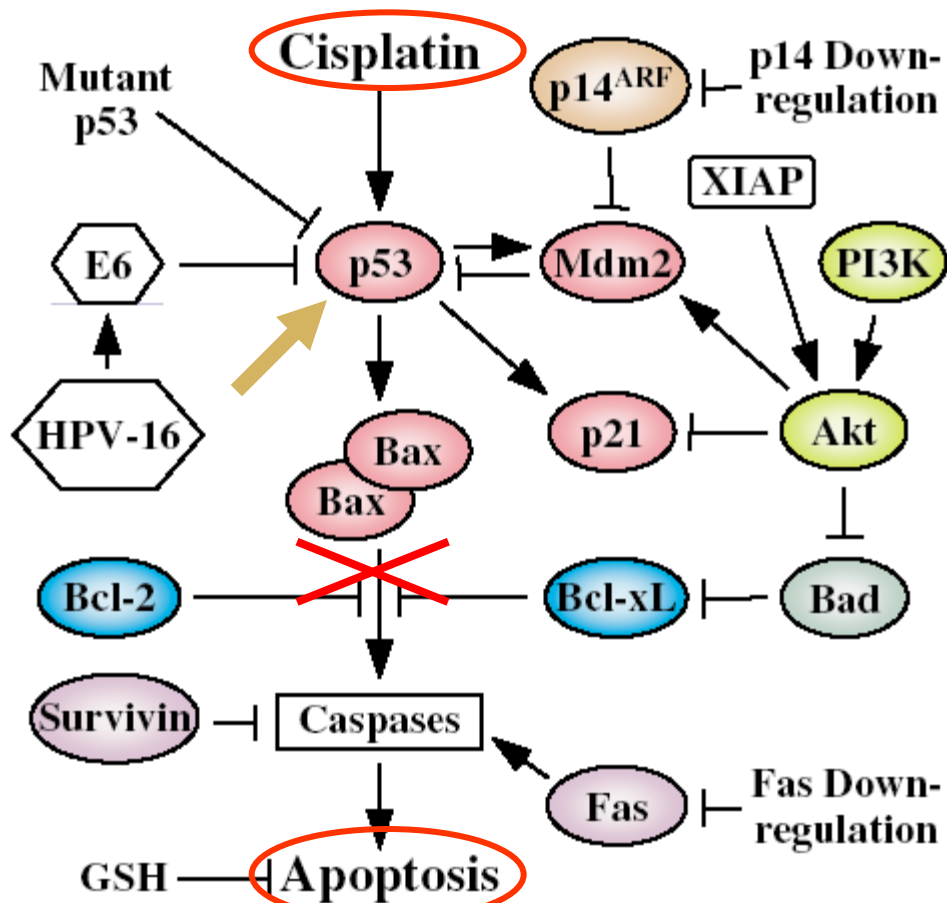


Figure 6 Disruption of p53-dependent apoptotic pathway in cisplatin-resistant tumor cells

U buněk rezistentních k cisplatině je f-ace p53 (dráhy vedoucí k apoptóze) narušena.

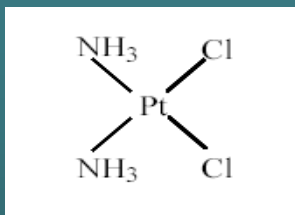
Přispívají k tomu

změny v regulaci proteinů r. Bcl, Fas, Survivinu, Glutathionu

# Adamantylaminové Pt(II) a Pt(IV) komplexy

Dvojmocné Pt(II)  
(reaktivní s DNA)

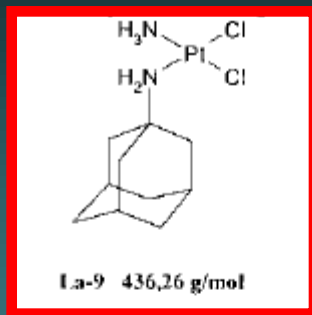
LA-9



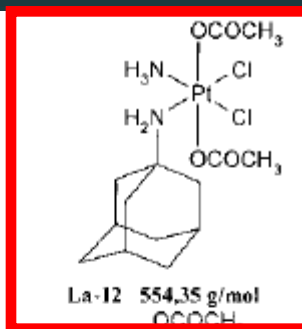
Cisplatina (II)

Syntetizované F. Žákem a spol.,  
PLIVA – Lachema

Zak et al., 2004, J Med Chem,



redukce

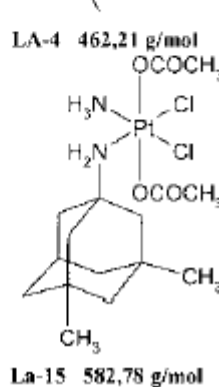
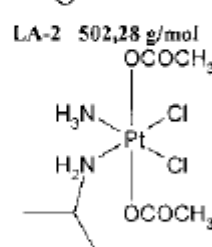
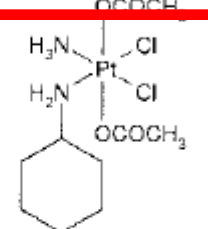
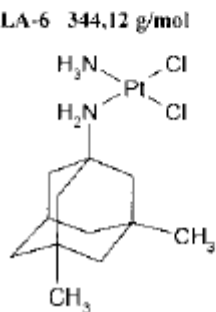
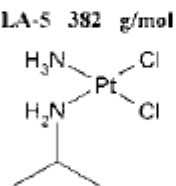
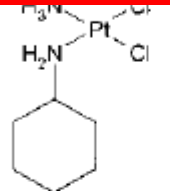


Předpokládaná  
výhoda: lipofilicita

čtyřmocné Pt(IV)  
(s DNA nereaktivní)

LA-12

JM-216  
(1. z řady  
v klinickém  
zkoušení)



# Cytotoxicita Pt komplexů u CisDDP - Rezistentních nádorových linií (24hodinová kontinuální expozice)

Cancer cell line	IC <sub>50</sub> (μM)	
	cisDDP	Pt-IV
Chronic myelogenous leukaemia K562	>80	3
Chronic myelogenous leukaemia KG-1	48	2
Acutemyelogenous leukaemia ML-2	>80	1
Mouse mellanoma B16	>80	6
Colon cancer HT-29N	>80	12
Colon cancer HT29	50	8
Colon cancer HCT116	>80	9
Lung carcinoma A427	63	6
Breast carcinoma HBL100	63	6
Breast carcinoma MCF-7	71	8
Lung carcinoma CORL23/CTR	>80	25
Ovariancarcinoma A2780	4	4
Ovariancarcinoma A2780/cis	40	3
Ovariancarcinoma A2780/cis90	>80	7

Žák et al J.Med.Chem.:  
47,761-3,2004

# „Dose-response“ křivky (MTT test)

Nejcitlivější k cis-DDP z panelu senzitivních ovariálních buněk (H134, IGROV-1, OVCAR-3), s nejnižším % apoptózy (6-14%) (Kofschoten, G.M. et al., Gyn. Oncol., 2002)

Získaná rezistence udržovaná přidavkem cisplatinu do kultivačního média (výsl. konc. 1  $\mu\text{M}$ , každá 2. pasáž)

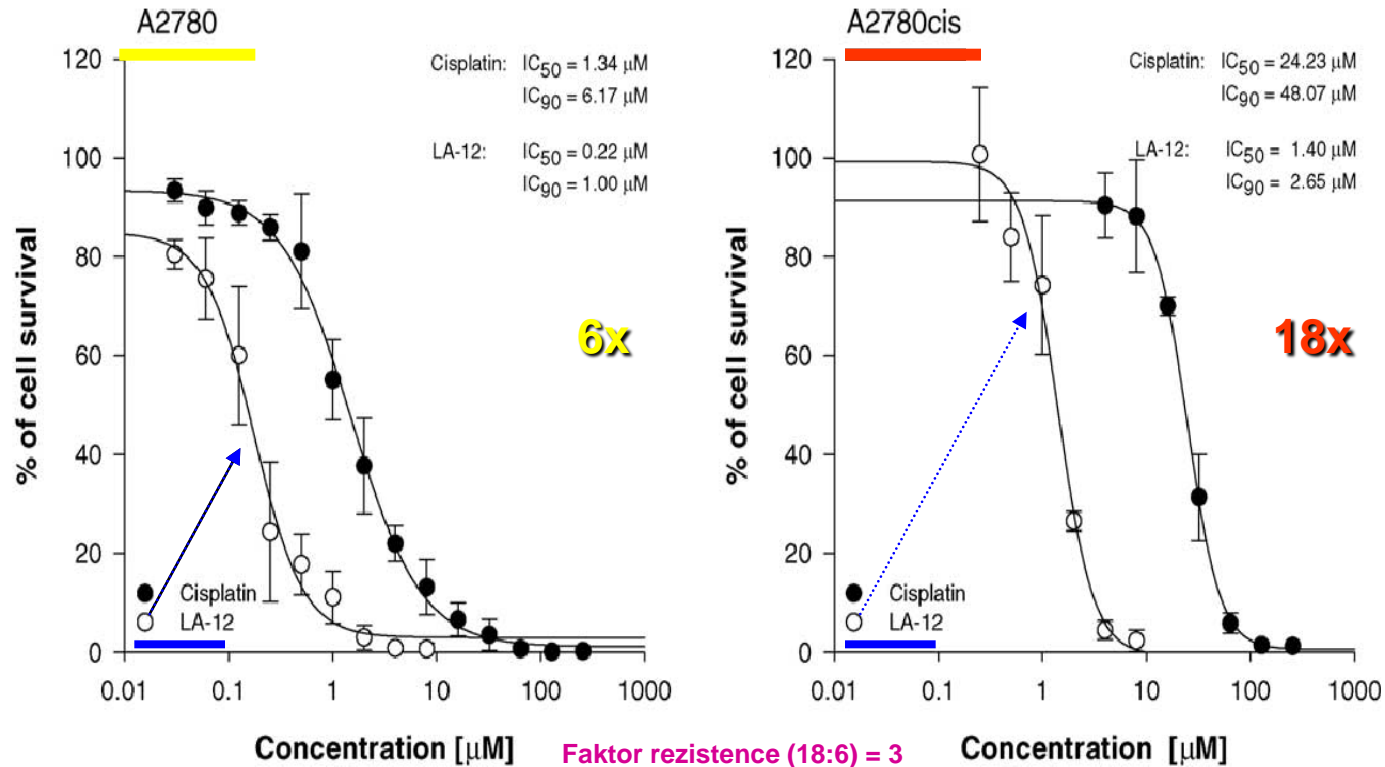
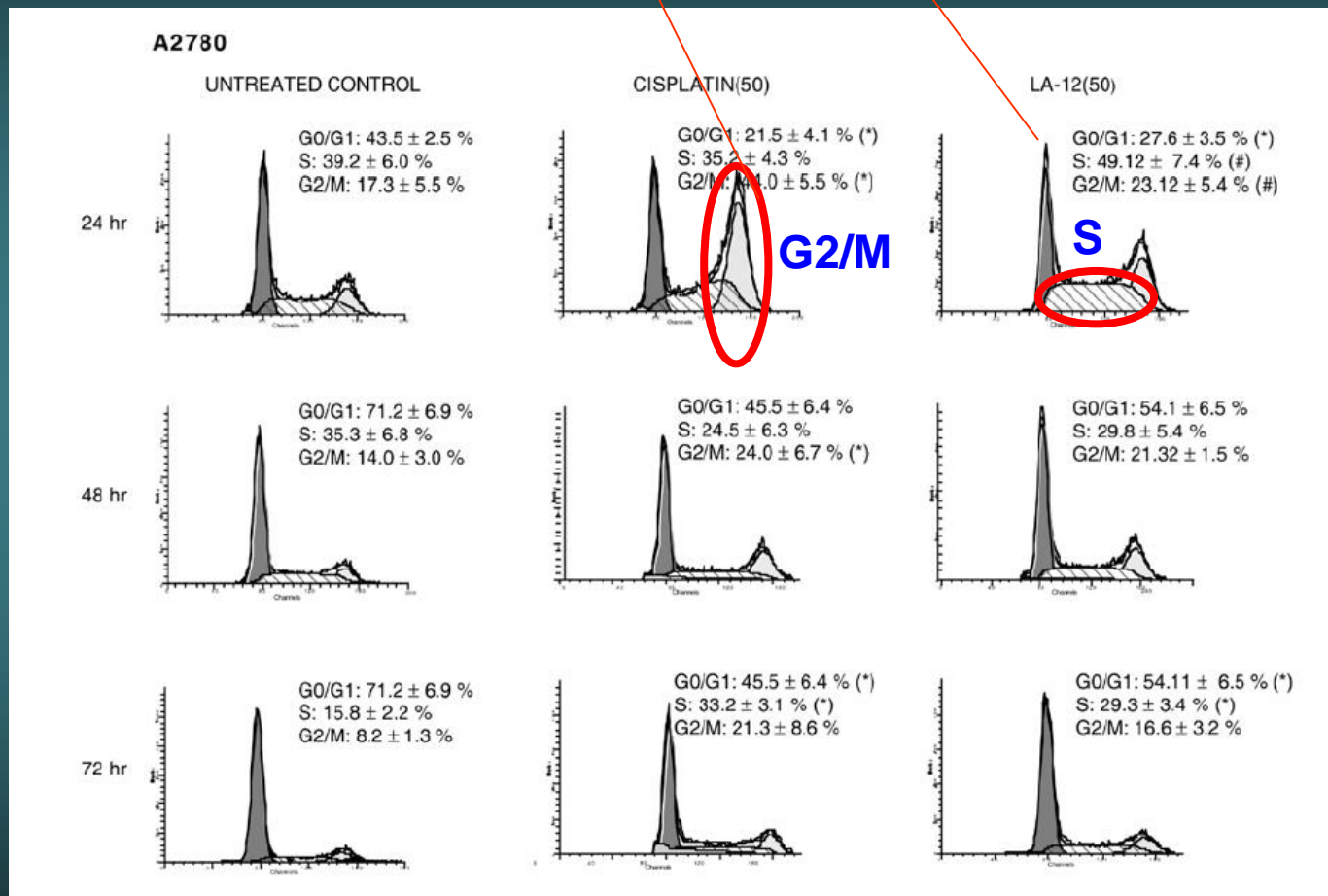


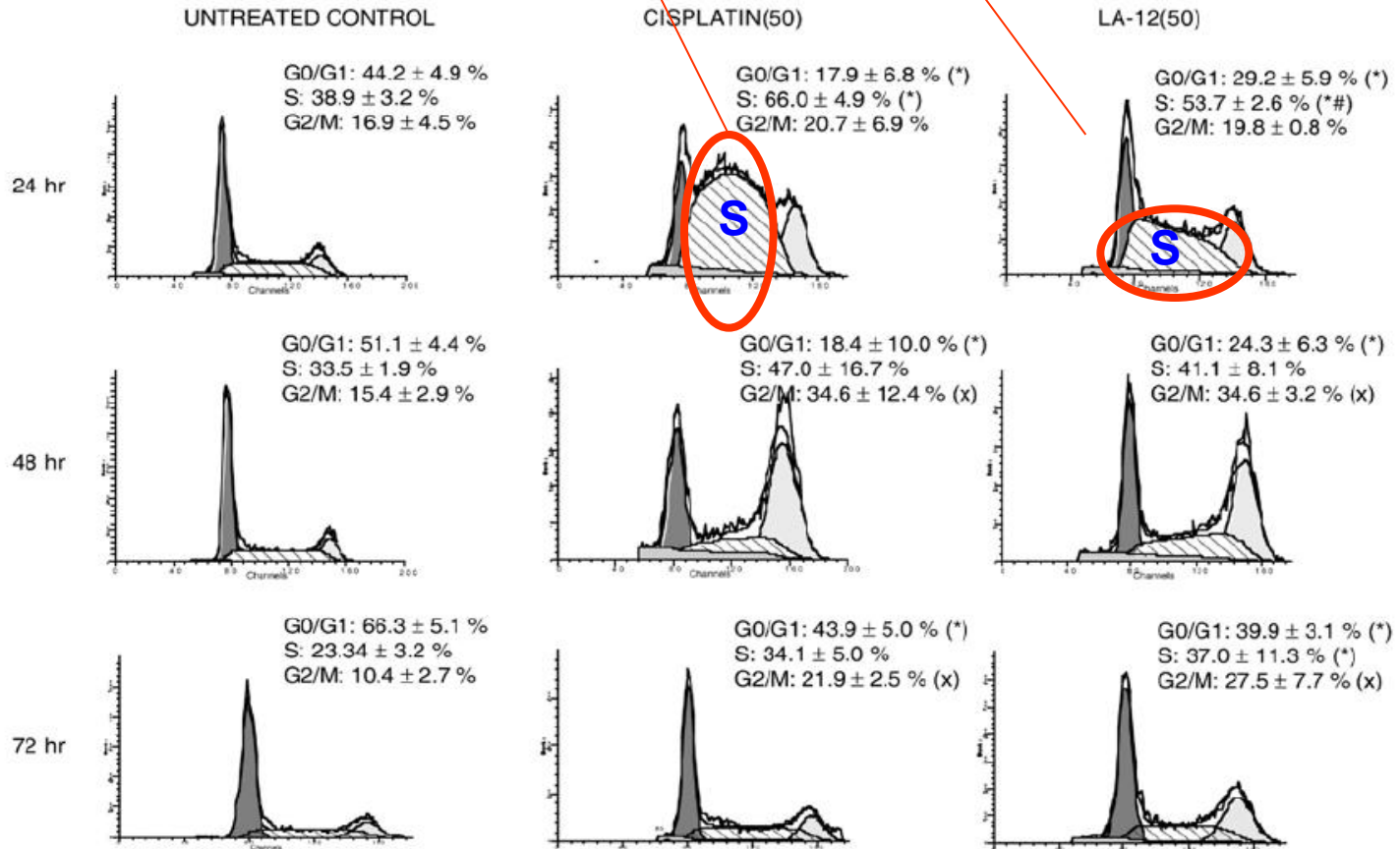
Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3  $\mu\text{M}$  and 256  $\mu\text{M}$  were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% ( $IC_{50}$ ) and 90% ( $IC_{90}$ ) are displayed for both derivatives. The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviations (S.D.) of at least three independent experiments; all concentrations were tested in three replicates.

# Rozdílný vliv cisplatiny a LA-12 na buněčný cyklus A2780 (single staining)



# Rozdílný vliv cis-DDP a LA-12 na buněčný cyklus A2780cis

## A2780cis

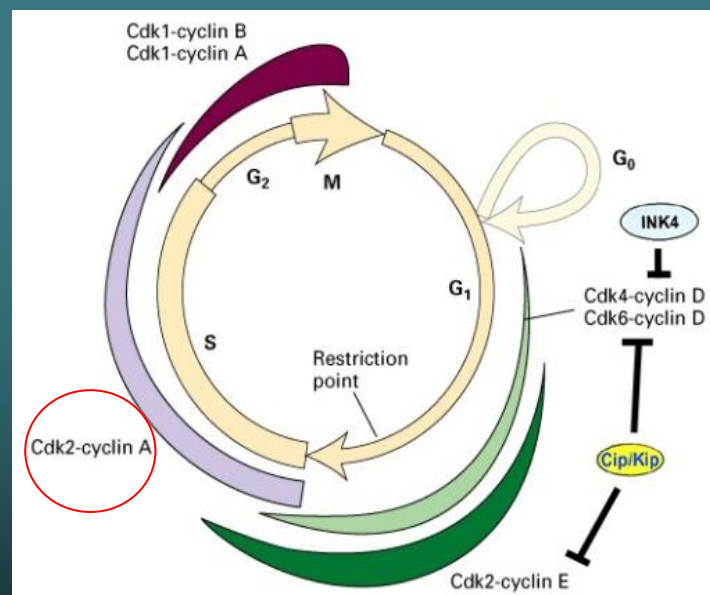


**Závěr: účinky LA-12 a cisplatiny na b. cyklus se liší dynamikou a jsou u ovariálních nádorových linií lišících se rezistencí rozdílné.**

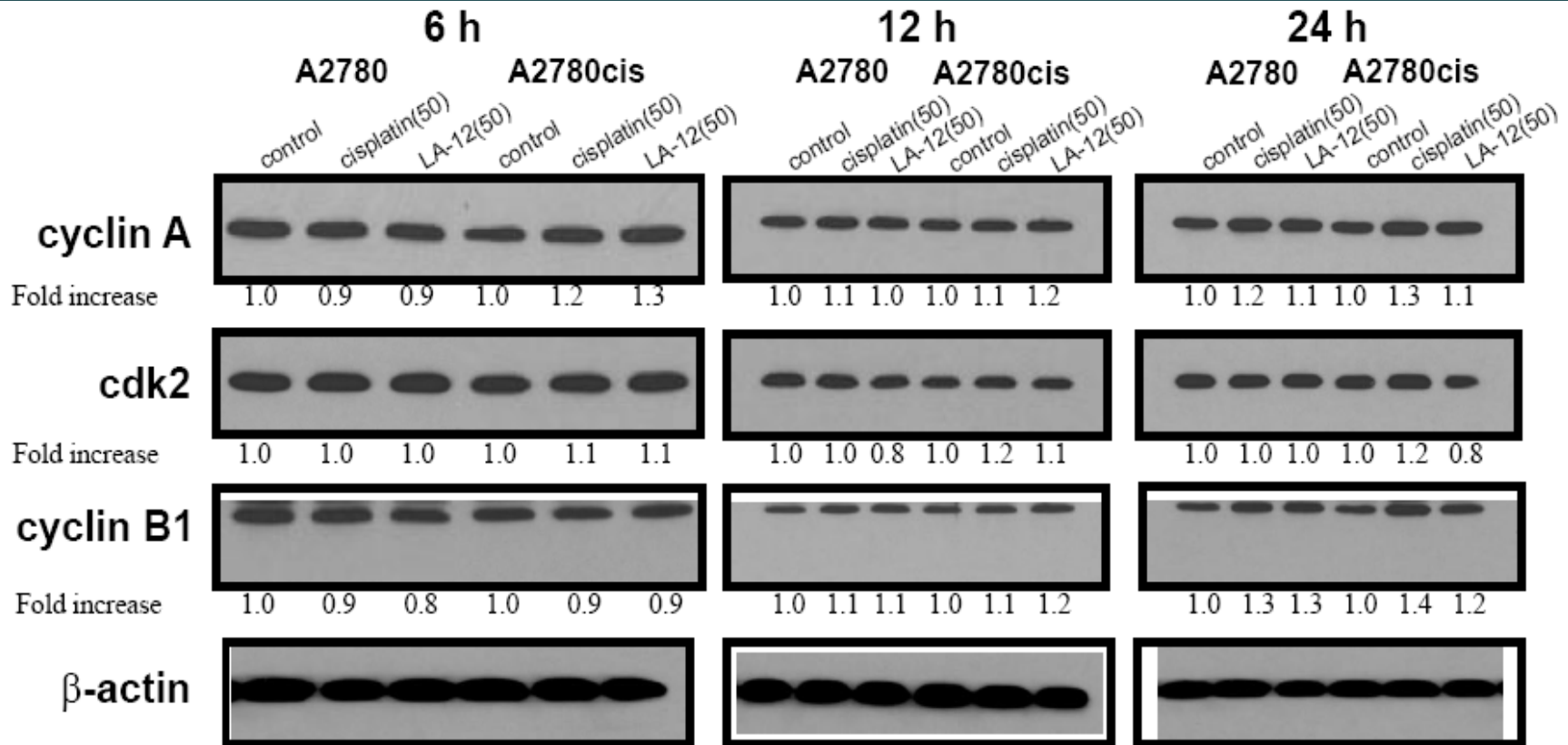
**ROZDÍLNÉ mechanismy.....**

**Detekovány hladiny proteinů:**

- **Cyklin A, B1, cdk2** (+ regulace b. cyklu);
- **p21, Gadd45 $\alpha$**  („p53 target genes“ - regulace b. cyklu);
- **Bax** (apoptóza);
- **Gadd 45 $\alpha$**  („DNA repair“);
- **Mdm2** (regulace stability p53)



# Hladiny proteinů regulujících buněčný cyklus (*cyklin A, B1, cdk2*) u buněk **A2780** a **A2780cis** po působení LA-12 a cisplatinu



Nebyly pozorovány žádné změny



# Expres p53 a PARP (Western b.) u A2780 a A2780cis

p53

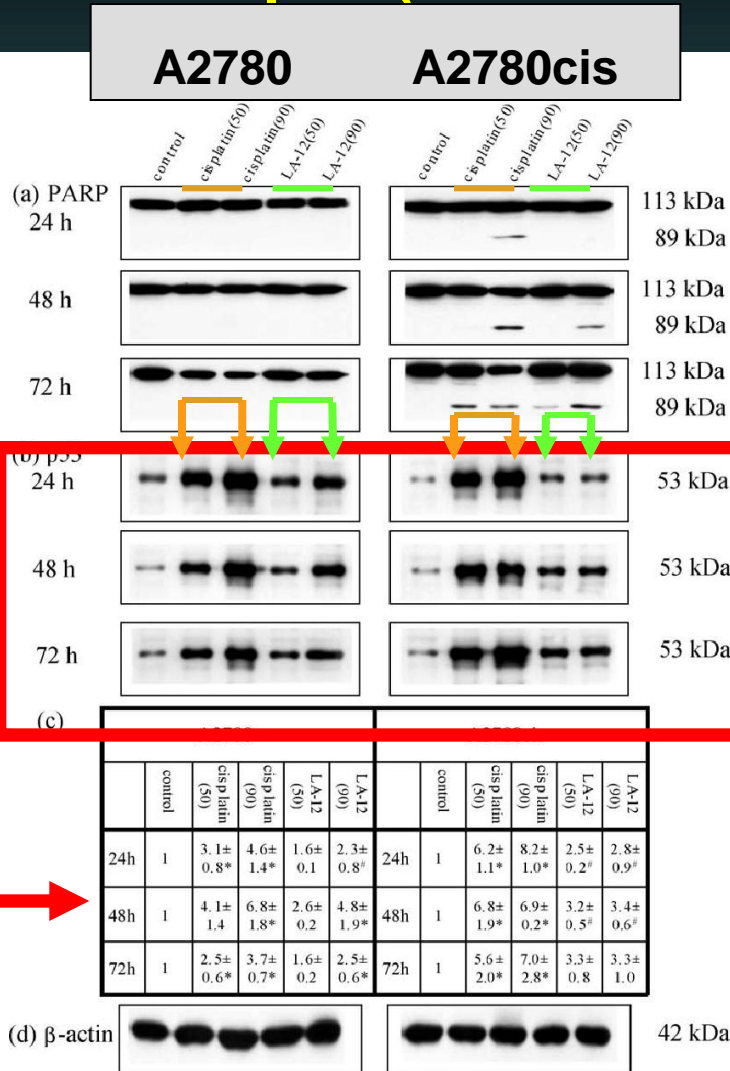


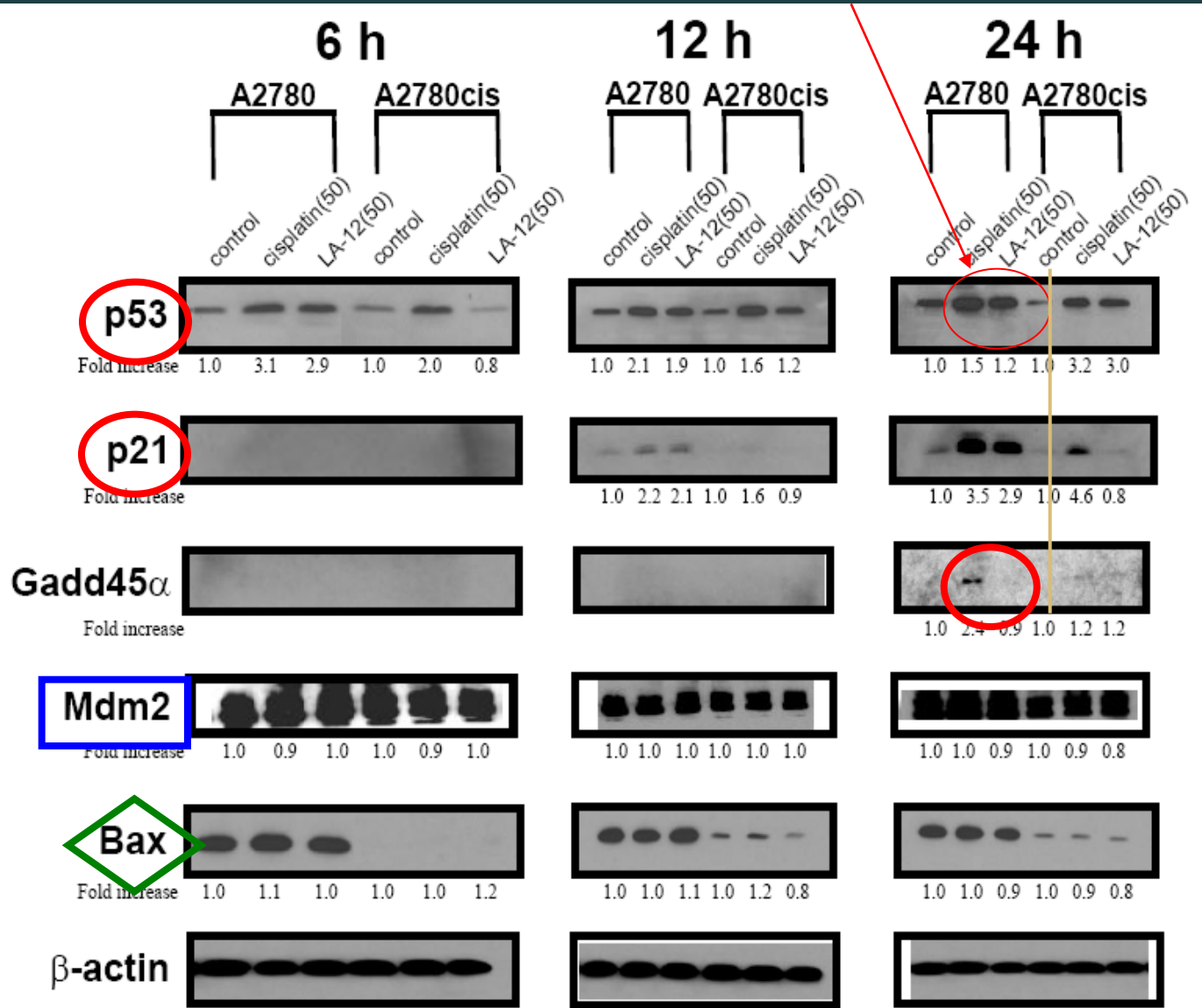
Fig. 8. Western blot analyses of (a) PARP (upper panel) and (b) p53 (middle panel) protein levels in A2780 (left panel) and A2780cis cells (right panel). The cells were not exposed (untreated controls) or exposed to IC<sub>50</sub> or IC<sub>90</sub> concentrations of cisplatin or LA-12 and harvested at 24 h, 48 h, and 72 h of sustained drug treatment. One representative experiment of at least three is presented. Table (c) contains values of p53 expression quantified by densitometry (mean ± S.D. of at least three independent experiments). The symbols (\*) denote significant difference ( $p < 0.05$ ) from untreated control; (#) denote significant difference ( $p < 0.05$ ) between equitoxic cisplatin and LA-12 effects. Equal loading is documented by detection of (d) β-actin (bottom panel).

Equitoxické koncentrace cis-DDP indukují vyšší expresi proteinu p53 (teoreticky vyšší poškození DNA, než po apl. LA-12 a tudíž by cis-DDP měla působit efektivněji),

Nebylo tomu tak, tzn. že by musí existovat jiné, např. s poškozením DNA nesouvisející mechanismy působení LA-12 !!!!!

(viz i pokusy, kdy po působení ci-DDP dochází k poškození buněk a k zástavě růstu v koncentracích nižších, které nevedou k tvorbě aduktů s DNA)

# Detekce produktů genů activatelných p53 spojených se zástavou b. cyklu, „DNA repair“ a apoptózou po působení cisplatiny nebo LA-12



Analýzy potvrzující dřívější data u b. A2780

v časnějších int.

Zvýšení exprese Gadd45 $\alpha$  u buněk A2780 po působení cisplatiny

Žádné změny na úrovni hladin

Mdm2 a Bax

## Hledány další možné mechanismy působení

Předpoklad, že

u obou studovaných pt - cytostatik, lišících se lipofilicitou dochází k významným rozdílům již v dostupnosti do buňky.

↑ Prokázáno

Vzhledem ke své lipofilicitě, LA-12 proniká velmi snadno do buněk

???? může reagovat s DNA a dalšími molekulami ?????



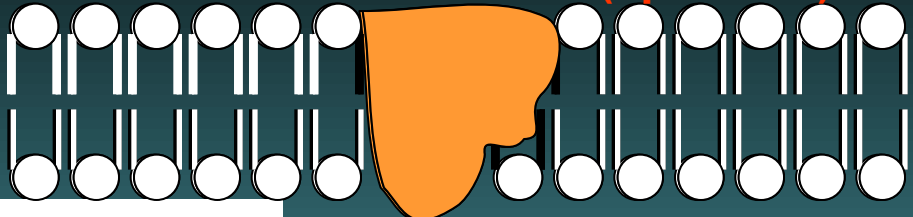
$[Cl^-]_{ex} \approx 100mM$

plasma

**Cisplatin (II)**  
(lipofóbní)

**LA-12 (IV)**  
↓ reaktivita  
↑ lipofilicita (capacity factor HPLC)

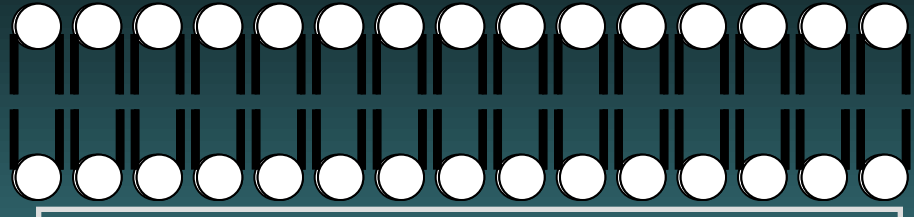
plasma



cytoplasma

$[Cl^-]_{in} \approx 2-30mM$

cytoplasma

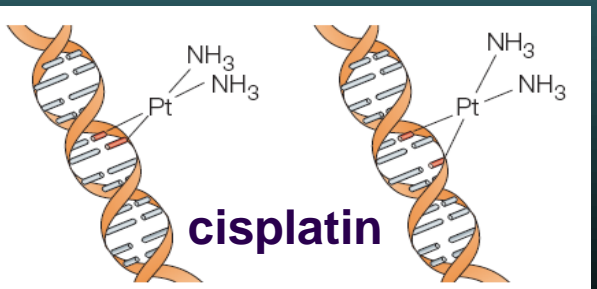
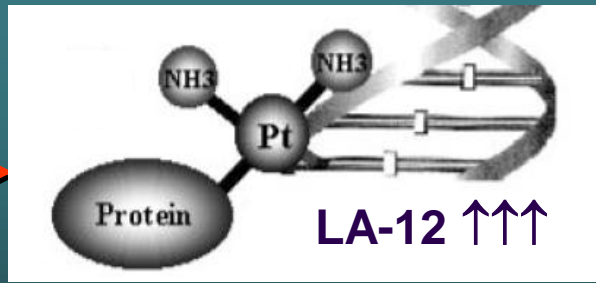


→ **Zvýšený influx LA-12 (FAAS)** (19.5× u A2780; 29.3× u A2780cis)  
→ **Snížená reaktivita s cílovými biomol.**

Proteiny ?  
Peptidy ?  
◆ Glutathion ◆  
RNA?  
◆ Metallothioneiny ◆  
Cytoskeletální proteiny?

→ **Tvoří speciální typy velkých DNA/protein aduktů nereparabilních excisní reparací**

NUCLEUS

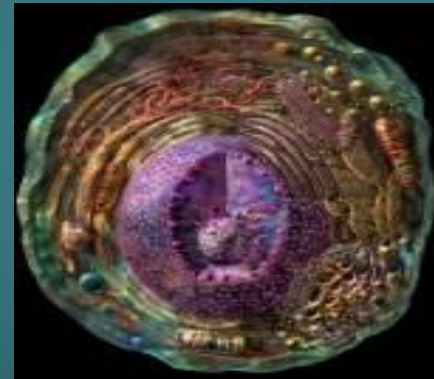


Replication inhibition  
Transcription inhibition  
**Cell-cycle arrest**  
DNA repair  
Cell death

**Naše doposud prezentované výsledky, i když plně nevysvětlují rozdíly v působení **cisplatin** a **LA-12**, se zařazují mezi ty přístupy, které výzkum platinových cytostatik posouvají do nových oblastí.**

**Platinová cytostatika** mohou (kromě DNA) reagovat s dalšími buněčnými strukturami jako jsou např:

- RNA,
- proteiny,
- cytoskeletální filamenta,
- thioly- obsahující molekuly
- membranové fosfolipidy.



**Odvozené mechanismy mohou být významnou součástí signálních kaskád regulujících dělení a smrt buněk**

# Modulace cytokinetiky látkami tukové povahy

## - závěry-

**Lipidy** a zejména jejich složky **vysoce nenasycené kyseliny** (PUFAs), včetně jejich metabolitů **eikosanoidů**,

patří mezi významné epigeneticky působící faktory schopné ovlivnit jak **dělení a zánik normálních**,

ale i transformovaných buněčných populací, tak **proces maligní transformace**.

# Hlavní mechanismy působení PUFAs v buněčných signalizacích

---

- 1) přímé ovlivnění aktivity transkripčních faktorů regulujících expresi genů významných z hlediska cytokinety
- 2) produkce eikosanoidů působících na přenos signálů růstových faktorů, cytokinů a imunitní systém
- 3) produkce reaktivních kyslíkových metabolitů vznikajících peroxidací lipidů.



# Dílčí shrnutí (teoreticko praktické dopady)

**Lipidy** jsou nejen významným zdrojem energie, ale představují i jedny z hlavních stavebních kamenů buněk.

Kromě strukturní úlohy (jako složky membránových fosfolipidů) je neméně podstatná řada jejich funkčních vlastností.

Změny spektra mastných kyselin (**MK/VNMK**) v membránových strukturách mají **dopad nejen na fyzikálně-chemické vlastnosti** (*fluiditu, konformaci apod.*), ale zejména na interakce receptorů s jejich ligandy.

**MK/VNMK** tak hrají důležitou úlohu v přenosu signálů a fungují jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory b. signalizační sítě.

Proto patří mezi významné faktory schopné ovlivnit jak dělení a zánik normálních ale i transformovaných buněčných populací, tak proces maligní transformace.



# Hlavní mechanismy působení PUFA v buněčných signalizacích

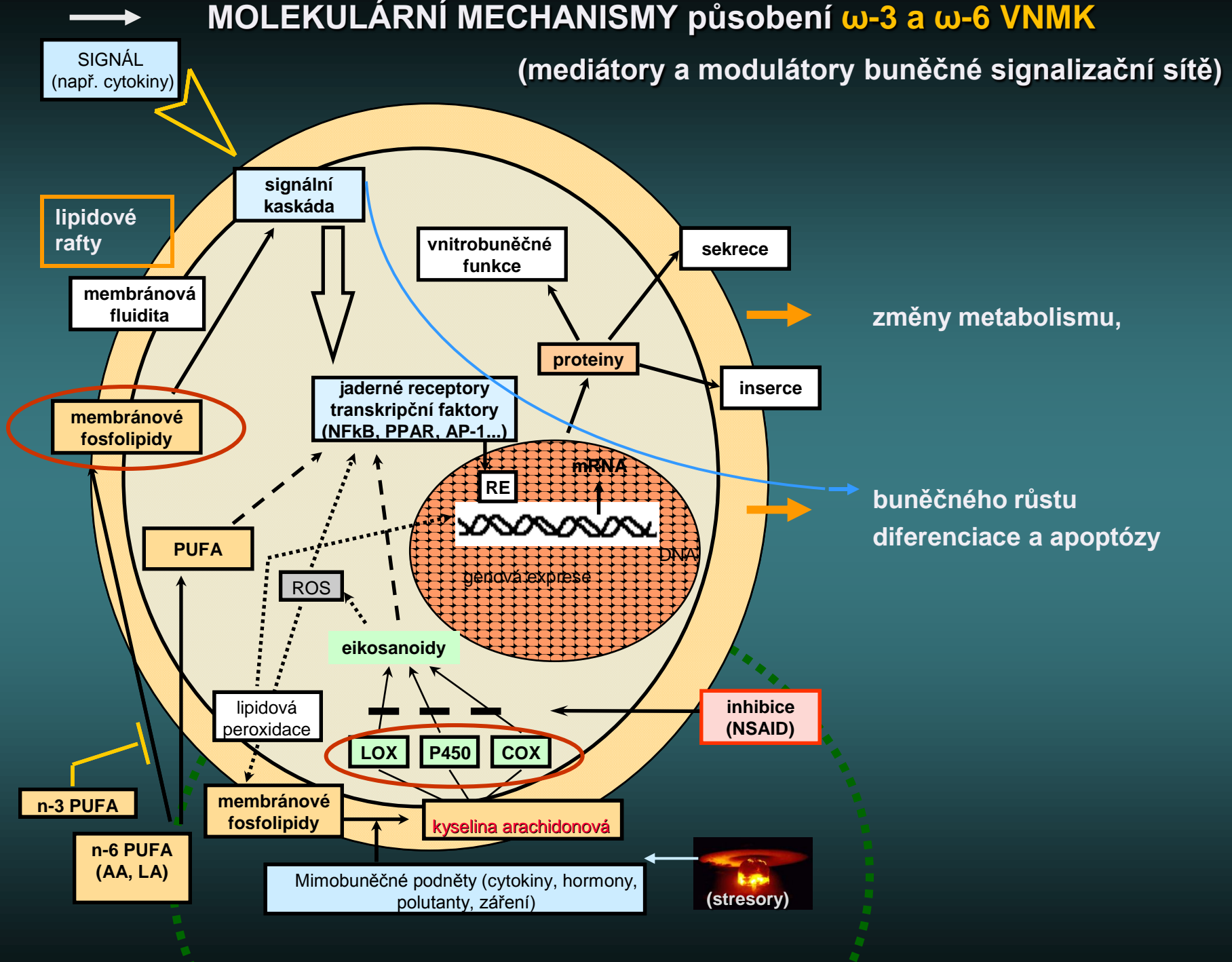
- 1) **přímé ovlivnění** aktivity transkripčních faktorů regulujících expresi genů významných z hlediska cytokinetiky
- 2) **produkce eikosanoidů** působících na přenos signálů růstových faktorů, cytokinů a imunitní systém
- 3) **produkce reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS)** vznikajících *peroxidací lipidů*.

**Významným faktorem je množství lipidů v potravě.**

**Vysoké koncentrace VNMK (anebo přílišná aktivace lipidového/fosfolipidového Metabolismu) mohou nepříznivě ovlivnit buněčné funkce.**

# MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení $\omega$ -3 a $\omega$ -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)



# Předpoklad:

Ize očekávat, že alespoň některé **příznivé efekty působení LA-12**

**by mohly být spojeny s interakcemi této látky se složkami buněčných membrán**



# Výsledky reflektující úvahy o potenciálním zapojení fosfolipidových struktur v mechanismech účinků pt-cytostatik

Lze vyslovit předpoklad, že

**u obou námi studovaných pt - cytostatik, lišících se lipofilicitou dochází k významným rozdílům již v dostupnosti do buňky.**

Dále, je známo, že

**k rezistenci buněk k cis-DDP může přispívat složení a distribuce fosfolipidových komponent v membránách.**

**Významné rozdílnosti v „seskupování“ lipidů**

**(tzv. „lipid packing“, FCM, merocyanin)**

**jsme prokázali i v našich předběžných pokusech**

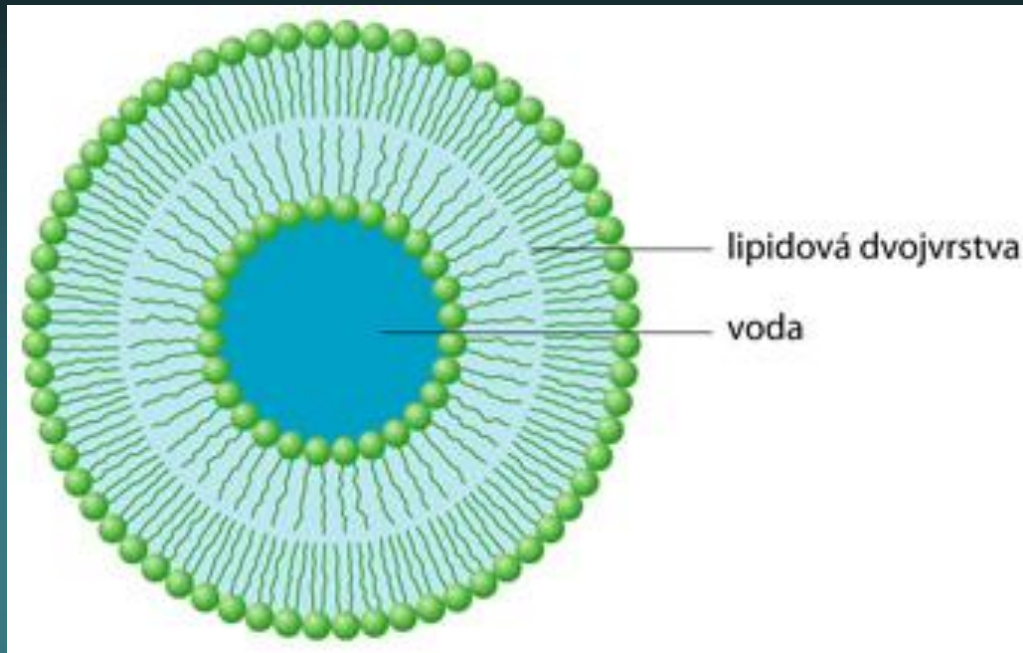
**u buněk A2780 a A2870cis.**

Naše další předběžné výsledky s využitím kalorimetrie provedené na umělých lipozomálních strukturách naznačily:

že zatímco ani cisDDP ani LA-12 samy o sobě nemění **vlastnosti lipozómů**,

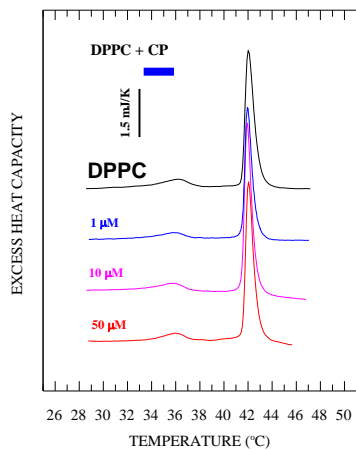
přidání AA významně mění charakter termogramu ve smyslu zvýšení membránové fluidity.

Kombinace AA s cis-DDP anebo s LA-12 naznačily tendence k fázové separaci (*změny nebo objevení se druhého píku*), kdy se tyto píky liší po kombinaci AA s cis-DDP od kombinace AA s LA-12.

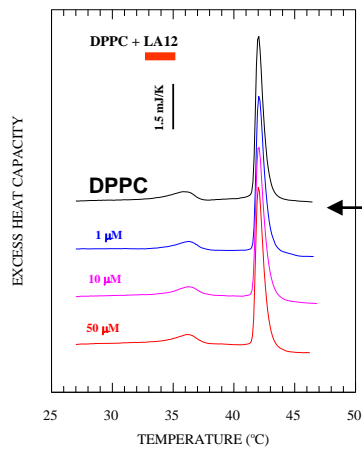


Vznik

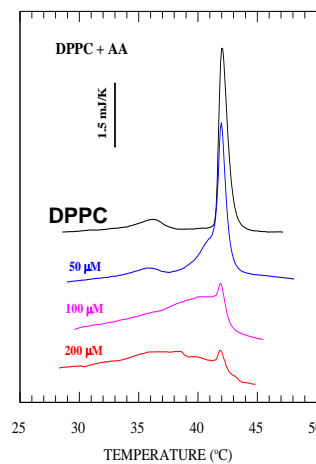
suspenze vhodných polárních lipidů (např. lecithin) + působením ultrazvuku



Vliv CP na DPPC multilamelární lipozómy

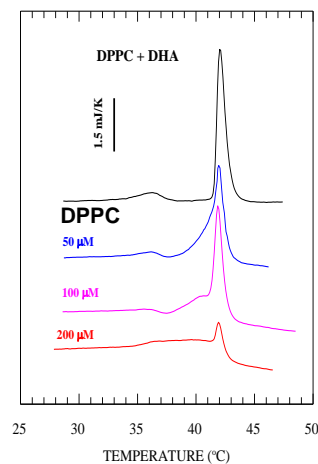


Vliv LA 12 na DPPC



Vliv AA

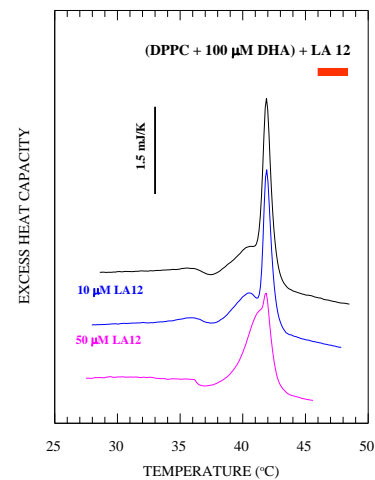
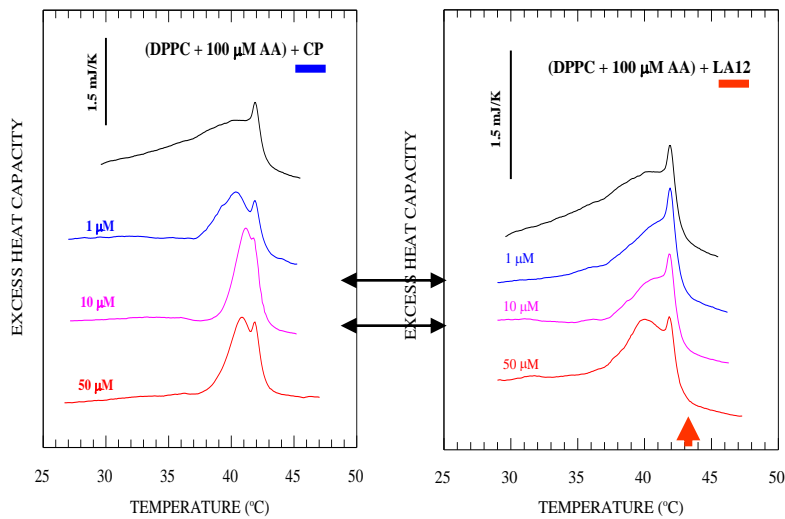
Po 50 μM AA pozorujeme snížení píku odpovídajícího předpřechodu a zároveň rozšířování hlavního fázového přechodu - zvýšení fluidity??? přičemž se entalpie přechodu nemění.



Vliv DHA

je zřejmé, že tendence změny je podobná jako po AA.

## Rozdíly cisplatina (CP) vs LA-12



# Naše další předběžné výsledky naznačily

(provedené na umělých lipozomálních strukturách využitím kalorimetrie)

**že zatímco** ani cisDDP ani LA-12 samy o sobě **nemění vlastnosti lipozómů**, přidání AA významně mění charakter termogramu ve smyslu zvýšení membránové fluidity.

**Kombinace** AA s cis-DDP anebo s LA-12 naznačily tendence k fázové separaci (změny nebo objevení se druhého píku).

Tyto **píky se** po kombinaci AA s cis-DDP vs. AA s LA-12 **lišily**.

## Je známo

**že k rezistenci** buněk k cis-DDP **může přispívat složení a distribuce** fosfolipidových komponent v membránách.

### **Významné rozdílnosti v „seskupování“ lipidů**

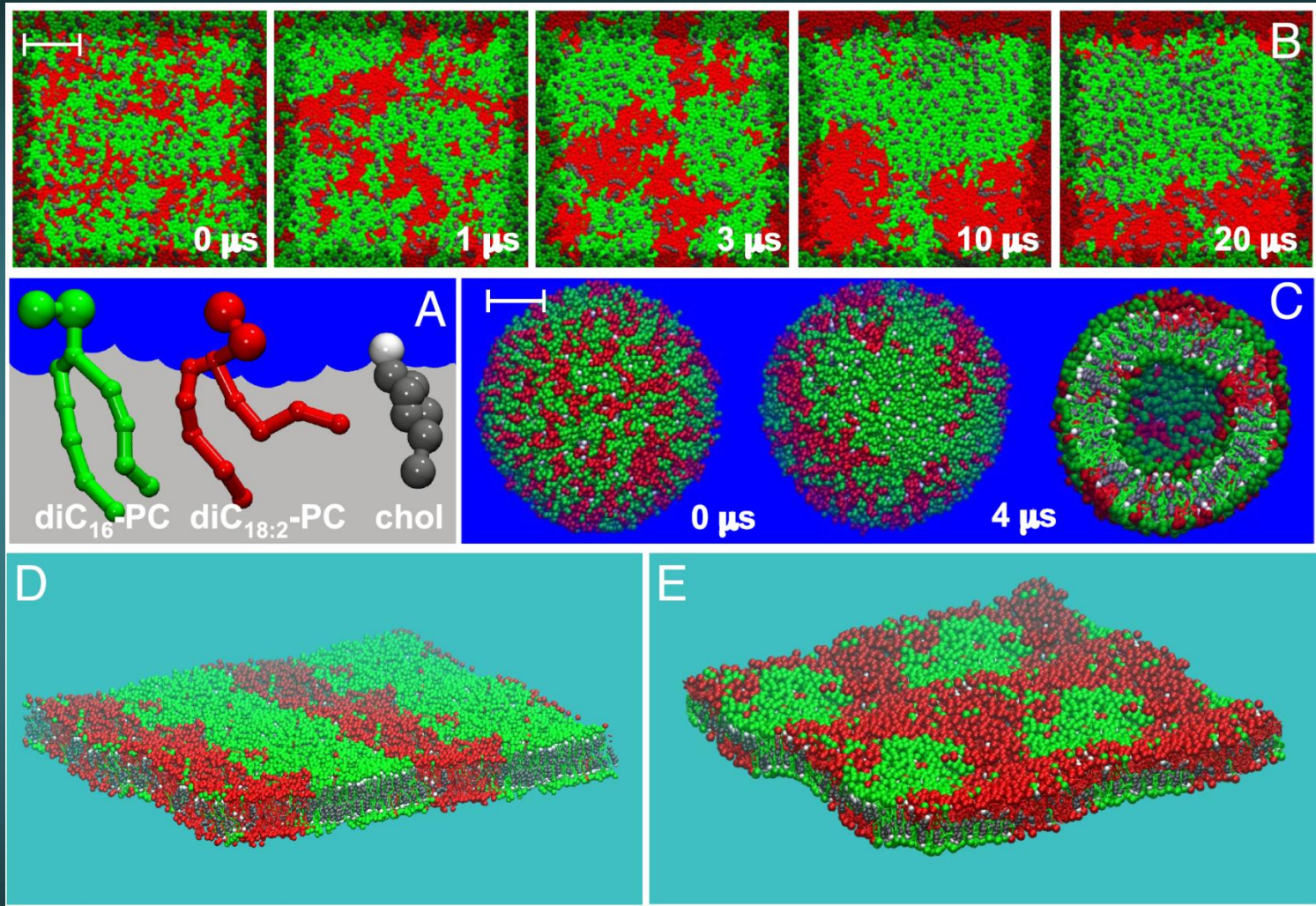
tzv. „**lipid packing**“, FCM, merocyanin - váže se na „rozvolněnou“ strukturu lipidů (zvýšení fluorescence) – cca odráží míru fluidity

**jsme prokázali** i v předběžných pokusech

u nádorových buněk ovárií A2780 a A2870cis (se získanou rezistencí).



# Dynamický charakter biologických membrán (model)



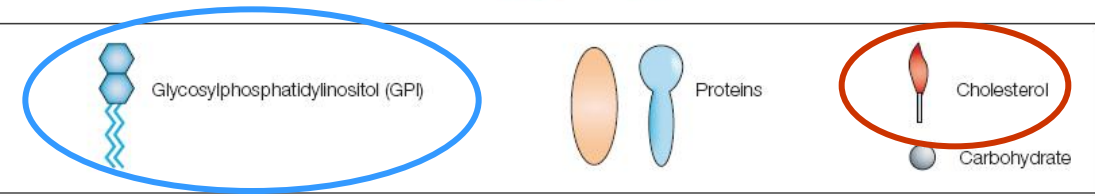
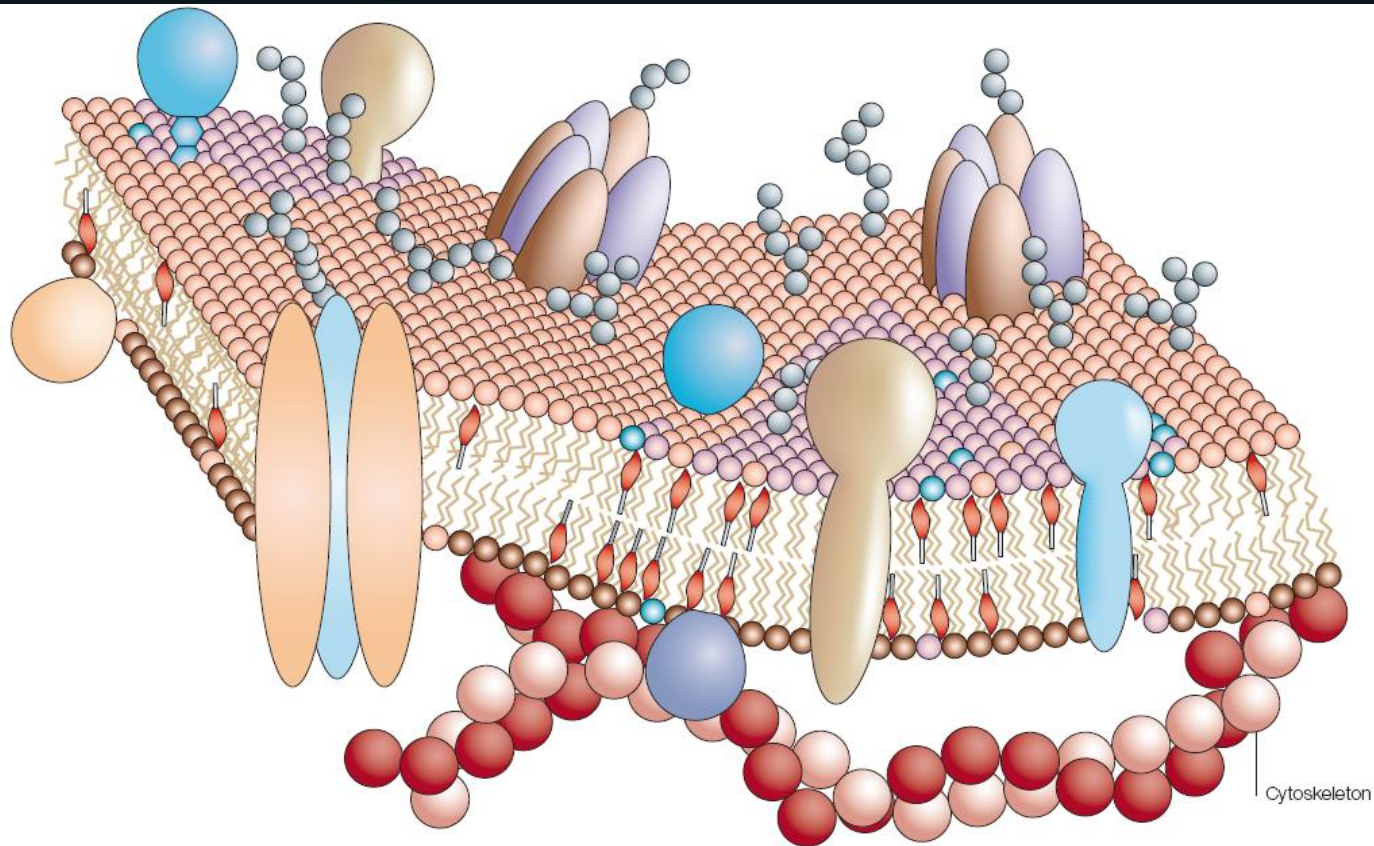


Figure 2 | **The Fluid-Mosaic-Model of the cell membrane.** Like a mosaic, the cell membrane is a complex structure made up of many different parts, such as proteins, phospholipids and cholesterol. The relative amounts of these components vary from membrane to membrane, and the types of lipids in membranes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

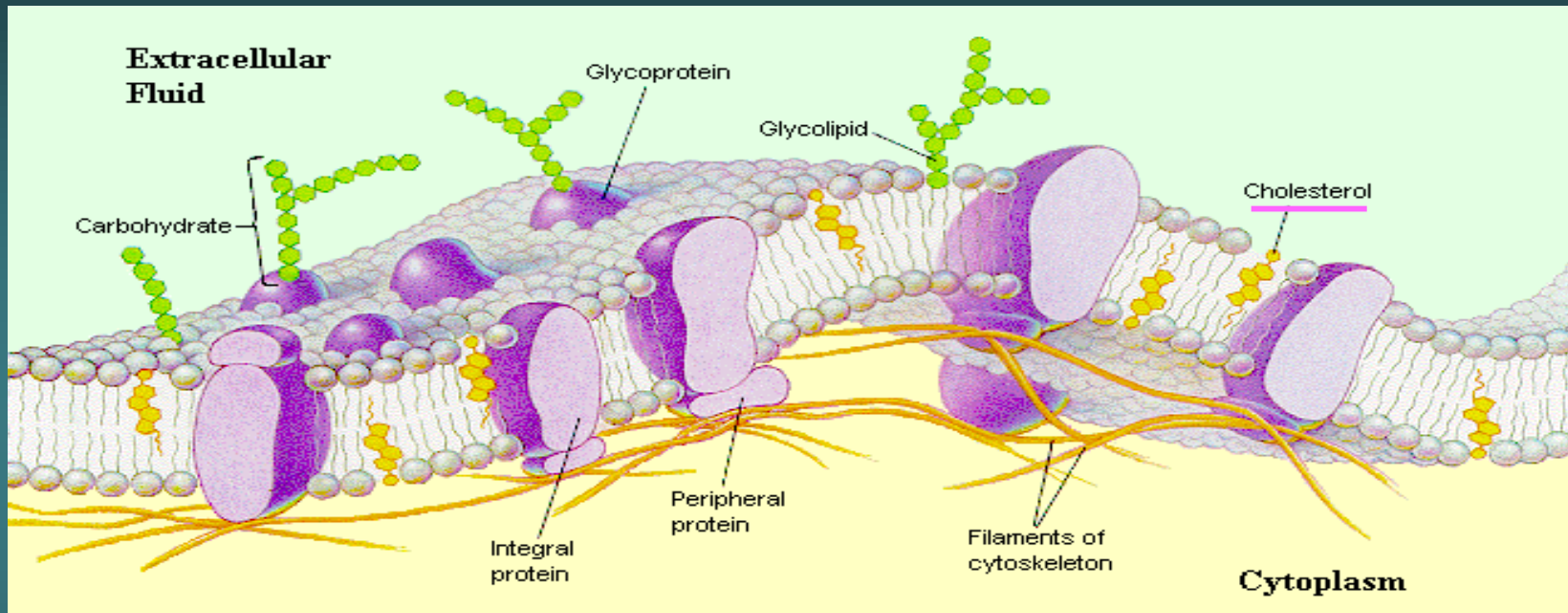
Pietsch J et al.,  
Nature Reviews,  
October 2004

**Zajištění většiny biologických funkcí se neobejde bez unikátních interakcí lipidových komponent <sup>1)</sup> s dalšími biologicky významnými molekulami. Jejich modulace mohou významně měnit intenzitu a také směr sign. transdukce**

1) např. tzv. **lipidových raftů** – membránových **lipidových mikrodomén** obohacených o **glykosfingolipidy** a

# Východisko:

→ Zajištění většiny biologických funkcí se neobejde bez unikátních interakcí lipidových komponent s dalšími biologicky významnými molekulami.



## Pokrok v pochopení významu struktur obsahujících lipidy

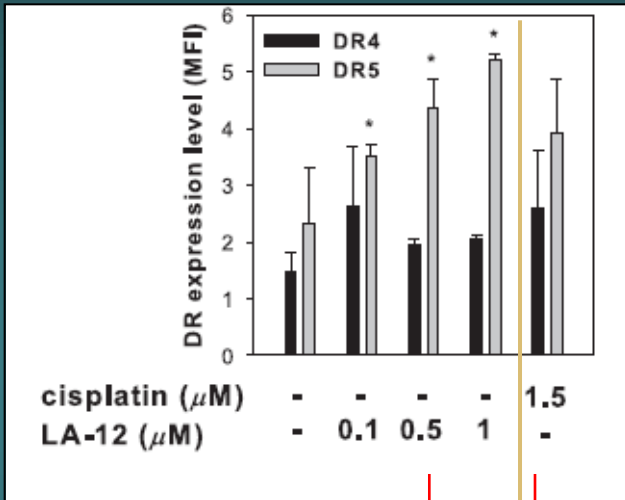
(např. tzv. lipidových raftů – membránových lipidových mikrodomén obohacených o glykosfingolipidy a cholesterol)

závisí na rozvoji metodologií orientovaných na poznání struktury a funkce *těchto, ale i jiných unikátních uskupení*, jejichž modulace mohou významně měnit intenzitu a také směr signálové transdukce.

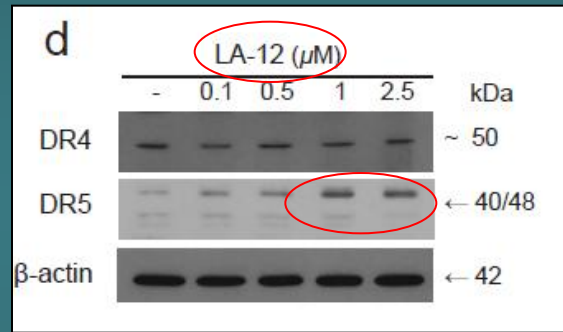
# LA-12 indukuje „upregulaci“ proteinů DR5, mRNA a zvyšuje zastoupení DR5 v lipidových raftech

Zastoupení DR5 a DR4 v membránách

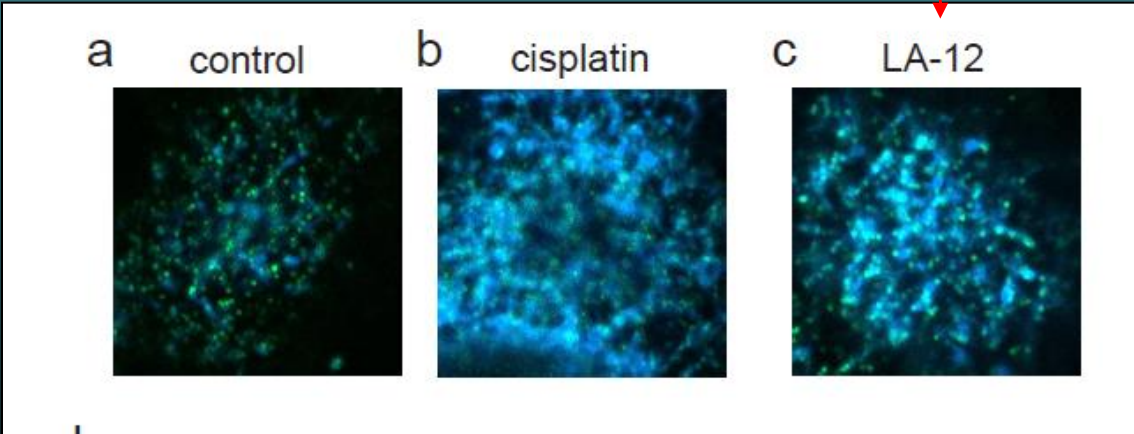
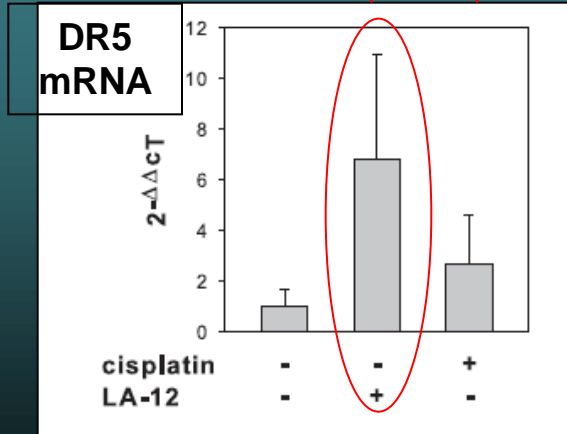
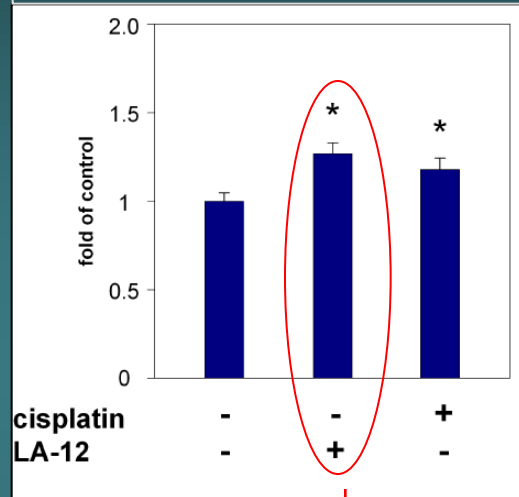
— HCT 116 —



Celkové hladiny DR5



Celkové zastoupení DR5 (rafty)



Lokalizace DR5 v lipidových raftech

**Olga Vondálová Blanářová, Árpád Szöőr, Iva Jelínková, Belma Skender, Karel Souček, Viktor Horváth, Alena Vaculová, Ladislav Anděra, Petr Sova, János Szöllősi, Jiřina Hofmanová, György Vereb, and Alois Kozubík**

*Cisplatin and a potent platinum(IV) complex-mediated enhancement of TRAIL-induced cancer cells killing is associated with modulation of upstream events in the extrinsic apoptotic pathway*

***Carcinogenesis: 32(1), 42-51, 2011***

# Studie *in vitro*: (Machala)

Žák F., Turánek J., Kroutil A., Sova P., Mistr A., Poulová A., Mikolin P., Žák Z., Kašná A., Záluská D., Neča J., Šindlerová L., Kozubík A.:

*Platinum(IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: **synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity** against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines.*

**J. Med. Chem. 2004 Jan 29; 47(3):761-3.**

Turánek J., Kašná A., Neča J., Kvardová V., Knötigová P., Záluská D., Horváth V., Šindlerová L., Kozubík A., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A.:

*New platinum (IV) complex with adamantylamine ligand as a promising anticancer drug: **Comparison of in vitro cytotoxic potential** towards A2780/cisR cisplatin-resistant cell line within homologous series of platinum (IV) complexes.*

**Anticancer Drugs. 2004; 15:537-543.**

---

Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák, F., Mistr, A., Turánek J.:

*High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in **overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro.***

**Biochem. Pharmacol. 2005; 69:373-383.**

Horváth V., Blanářová, O., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Kozubík A.,:

*Platinum(IV) complex with adamantylamine **overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells.***

**Gynecol. Oncol. 2006; 102:32-40**

## Studie *in vivo* :

Sova P, Mistr A, Kroutil A, Zak F, Pouckova P, Zadinova M.:  
*Preclinical anti-tumor activity of a new oral platinum(IV) drug LA-12.*  
*Anticancer Drugs.* 2005;16:653-7.

Sova P, Chladek J, Zak F, Mistr A, Kroutil A, Semerad M, Slovak Z.:  
*Pharmacokinetics and tissue distribution of platinum in rats following single and multiple oral doses of LA-12 [(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)].*  
*Int. J. Pharm.* 2005;288:123-9.

Cermanova J, Chladek J, Soval P, Kroutil A, Semerad M, Berankova Z, Siroky P, Surova I.:  
*Single-dose pharmacokinetics of a novel oral platinum cytostatic drug ([OC-6-43]-bis[acetato][1-adamantylamine]amminedichloroplatinum [IV]) in pigs.*  
*Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2004; 26:679-85.

**Ukončena 1. fáze klinického hodnocení**

## Tyto výsledky naznačují, že

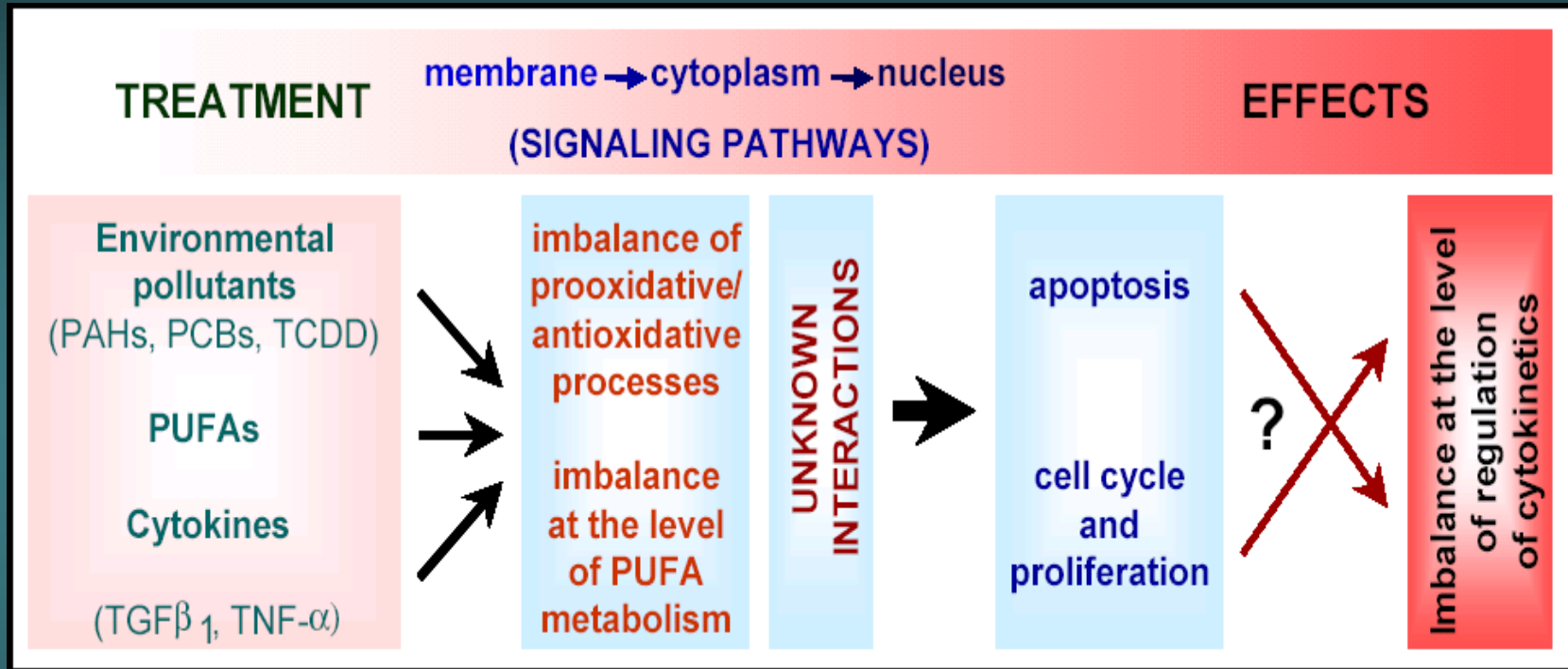
- 1) **změny fosfolipidového metabolismu** by mohly souviset s rezistencí nádorových buněk k cis-DDP
- 2) **signální dráhy zahrnují fosfolipidové komponenty** by mohly být součástí mechanismů působení pt-cytostatik **jiných než těch, které přímo souvisí s poškozením DNA**

Proto cílená modulace fosfolipidového metabolismu, *(založená např. na využití speciálních lipidových výživ)*

by mohla být jednou z nových strategií vedoucích k posílení účinků pt-cytostatik.




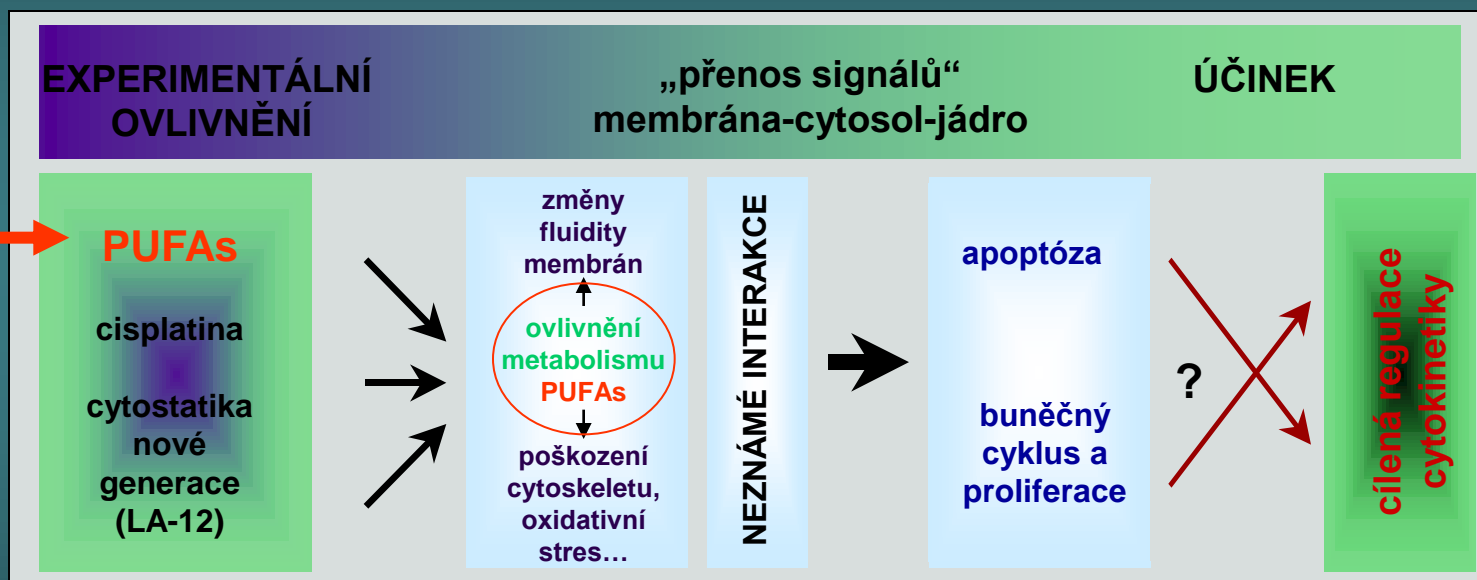
# Podstata návrhu projektu



# Využití mechanismů působení pt-cytostatik jiných než těch, které přímo souvisí s poškozením DNA

Posílení terapeutických efektů ? 

Lipidové výživy vhodného složení 



Podstata možných návrhů projektů – prozatím neuzavřeno

# Další možné cíle

## Studium molekulárních mechanismů odpovědných za apoptózu indukovanou platinovými cytostatiky a TRAIL

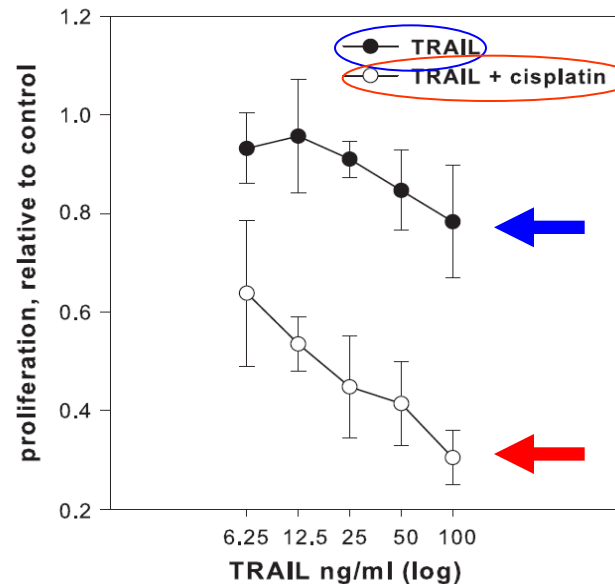
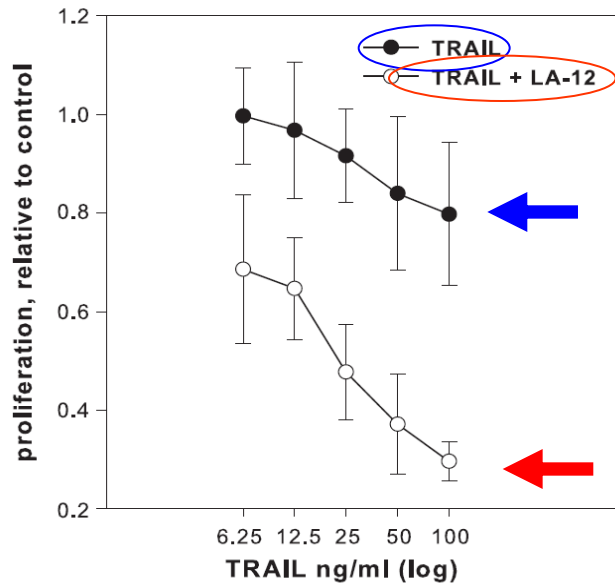
- Úloha vybraných proteinů zodpovědných za prokázanou potenciaci apoptózy po kombinovaném působení LA-12/ TRAIL  
*(p53, NF-kappaB, iniciální a efektorové caspázy, inhibitory endogenních caspas, rodina proteinů Bcl-2 proteinů atd.)*
- Sledování kombinovaného působení Pt cytostatik a TRAIL na buňky odvozených z dalších typů nádorů a na normální buňky
- Srovnání efektů LA-12 a dalších konvenčně užívaných platinových cytostatik

# LA-12 nebo cisplatina posilují cytotoxické působení TRAILu u nádorových buněk kolonu a prostaty

Koncentrace LA-12 nižší 18x

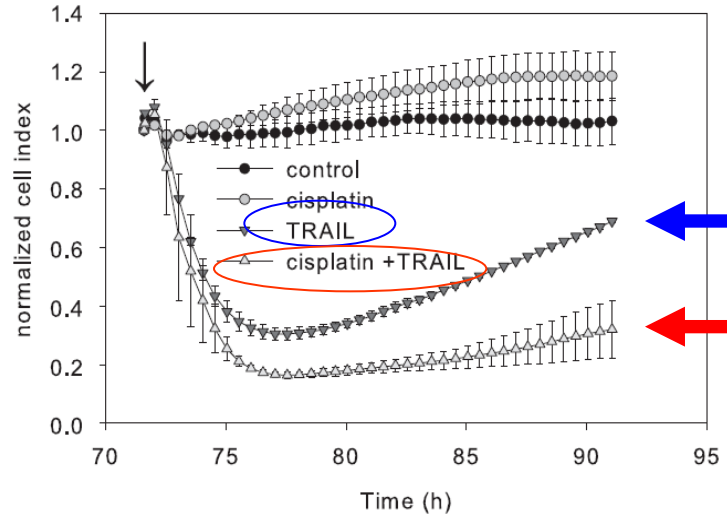
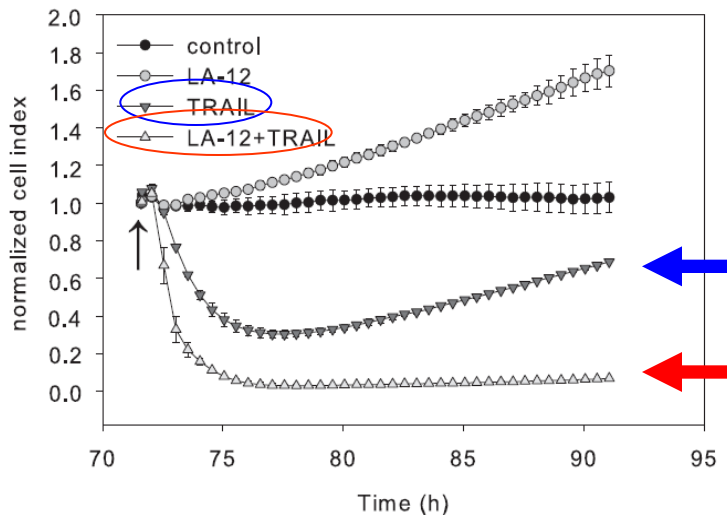
HCT-116

LA-12/cDDP 24 h, TRAIL 24 h



WST

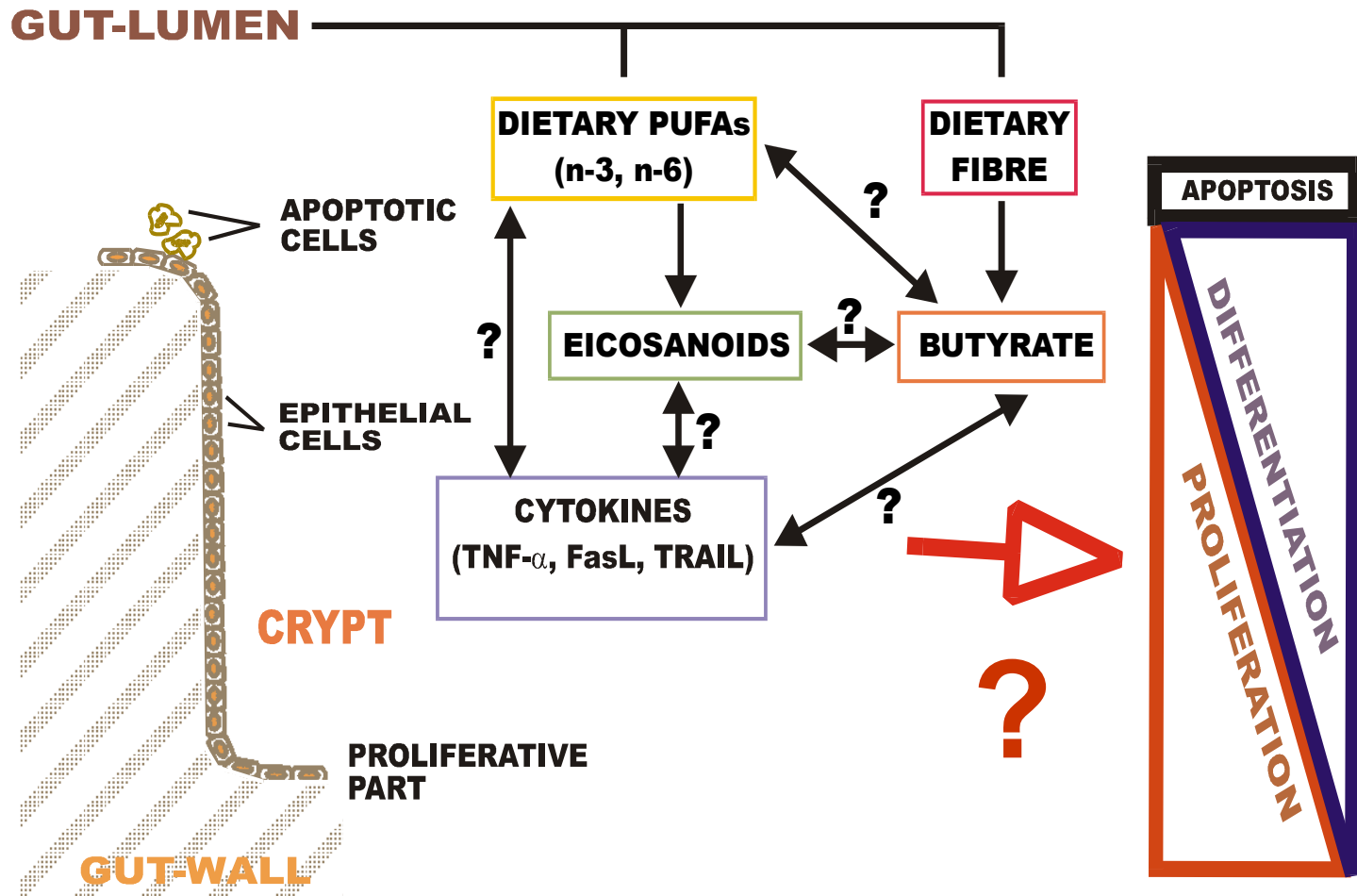
xCELLigence



Podobné výsledky získány i u PC3 buněk

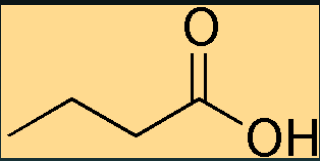


# Předpokládané interakce složek diety a endogenních regulátorů cytotkinetiky epiteliálních buněk kolonu (experimentální přístup)



Kovaříková M. et al. Eur J Cancer 2000  
 Kovaříková M. et al. Differentiation 2004  
 Hýžd'alová M. et al. Cytokine 2008

Hofmanová J. et al. Eur J Nutr 2005  
 Hofmanová J. et al. Cancer Letters 2005  
 Vaculová A. et al. Cancer Letters 2005  
 Hofmanová J. et al. Mol Nutr Food Res 2009



# Přechod adenom x karcinom

## Inhibiční účinky butyrátu

Buněčné línie

fetální colon  
FHC

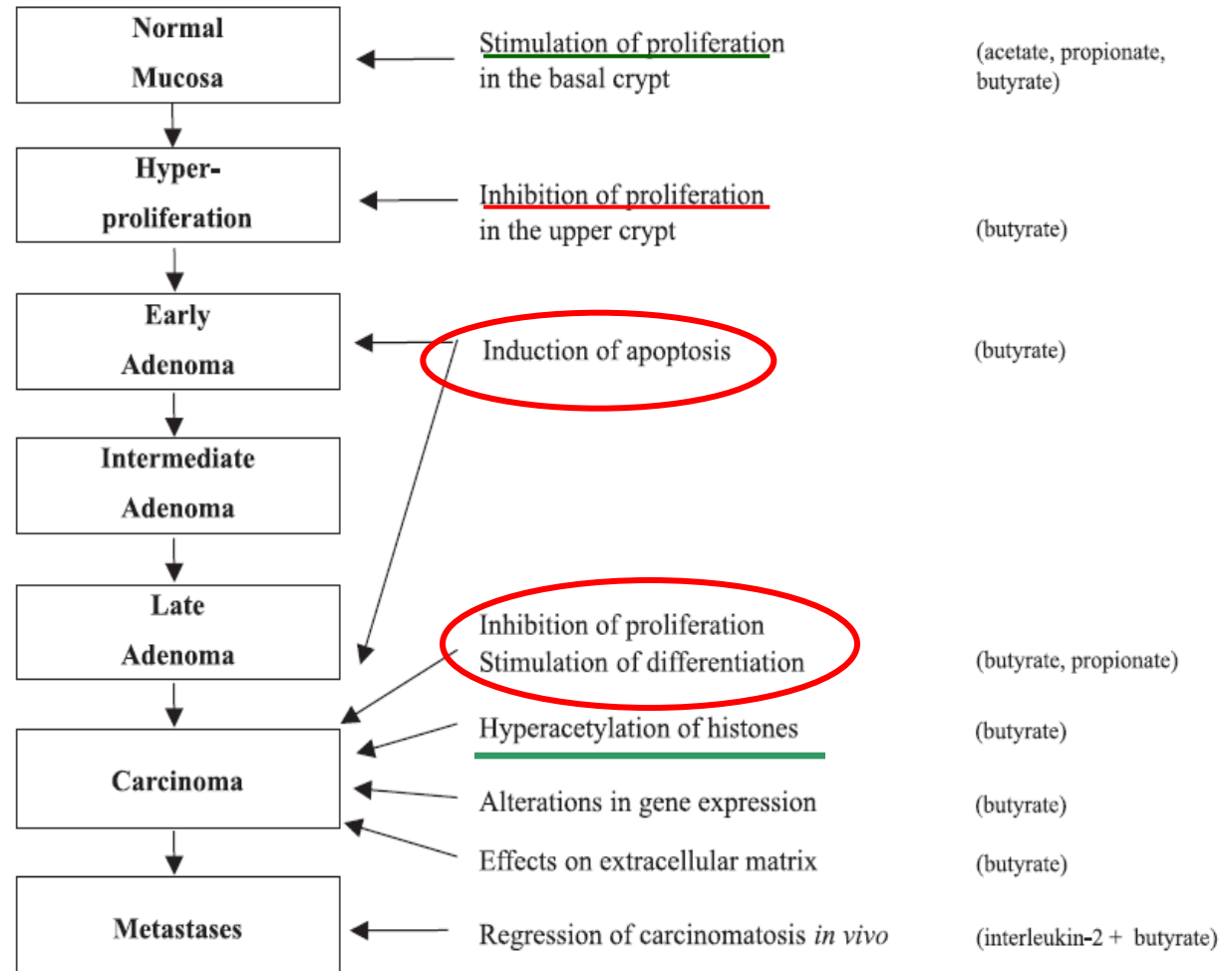
adenomy  
AA/C1  
RG/C2

adenocarcinomy  
HT-29

HCT116

lymf.  
metastáza  
SW-620

**Carcinogenní  
potenciál**



**AA (50µM)**

Roslinné oleje

**DHA**

Rybí oleje

**NaBt<sub>(3mM)</sub>**

Vláčina

Endogenní regulátory

TRAIL, TNFα,

anti-Fas

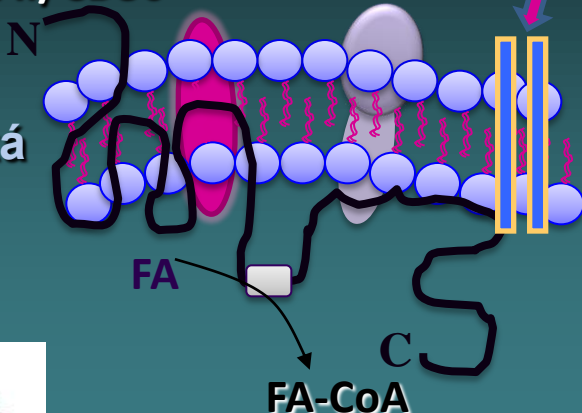
Receptory smrti  
DR4, DR5  
CD95

Metody využívané  
na různých úrovních  
buněčné organizace

plasmatická membrána

Plasmatická  
membrána

FAT/CD36



*Lipid packing*

*flow cytometrie (merocyanin 540)*

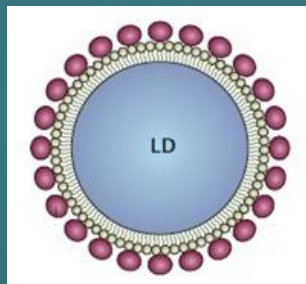
*Lipidové analýzy*

Phospholipidy (LC-MS)

Zastoupení MK (GC-MS)

paramet

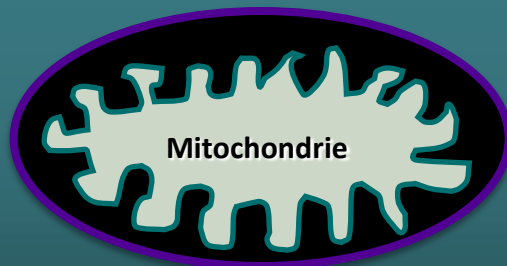
cytoplasma



Cytoplasma

Lipid droplets *flow cytometrie* - Nile Red

mitochondrie



Mitochondrie

ROS – *flow cytometrie* (DHR-123)

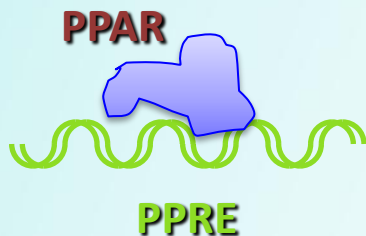
MMP – *flow cytometrie* (TMRE)

Bcl-2 rodina (Western blotting)

Jádro

Jádro

Transcriptční faktory, genová exprese



PPAR

PPRE

Proliferace

Diferenciace

Apoptóza



# PUFAs (AA, DHA) zvyšují citlivost nádorových buněk kolonu k apoptóze indukované butyrátem nebo cytokiny rodiny TNF

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

DOI 10.1002/mnfr.200800175

Mol. Nutr. Food Res. 2009, 53, S102–S113

Research Article

## Human fetal colon cells and colon cancer cells respond differently to butyrate and PUFAs

Jiřina Hofmanová, Alena Vaculová, Zuzana Koubková, Martina Hýžd'alová and Alois Kozubík

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 218 (2005) 33–41

CANCER  
Letters

[www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 229 (2005) 43–48



[www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

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

Alena Vaculová<sup>a</sup>, Jiřina Hofmanová<sup>a</sup>, Ladislav Anděra<sup>b</sup>, Alois Kozubík<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup>Laboratory of Cell Signalling and Apoptosis, Institute of Molecular Genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Rep

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

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

Jiřina 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

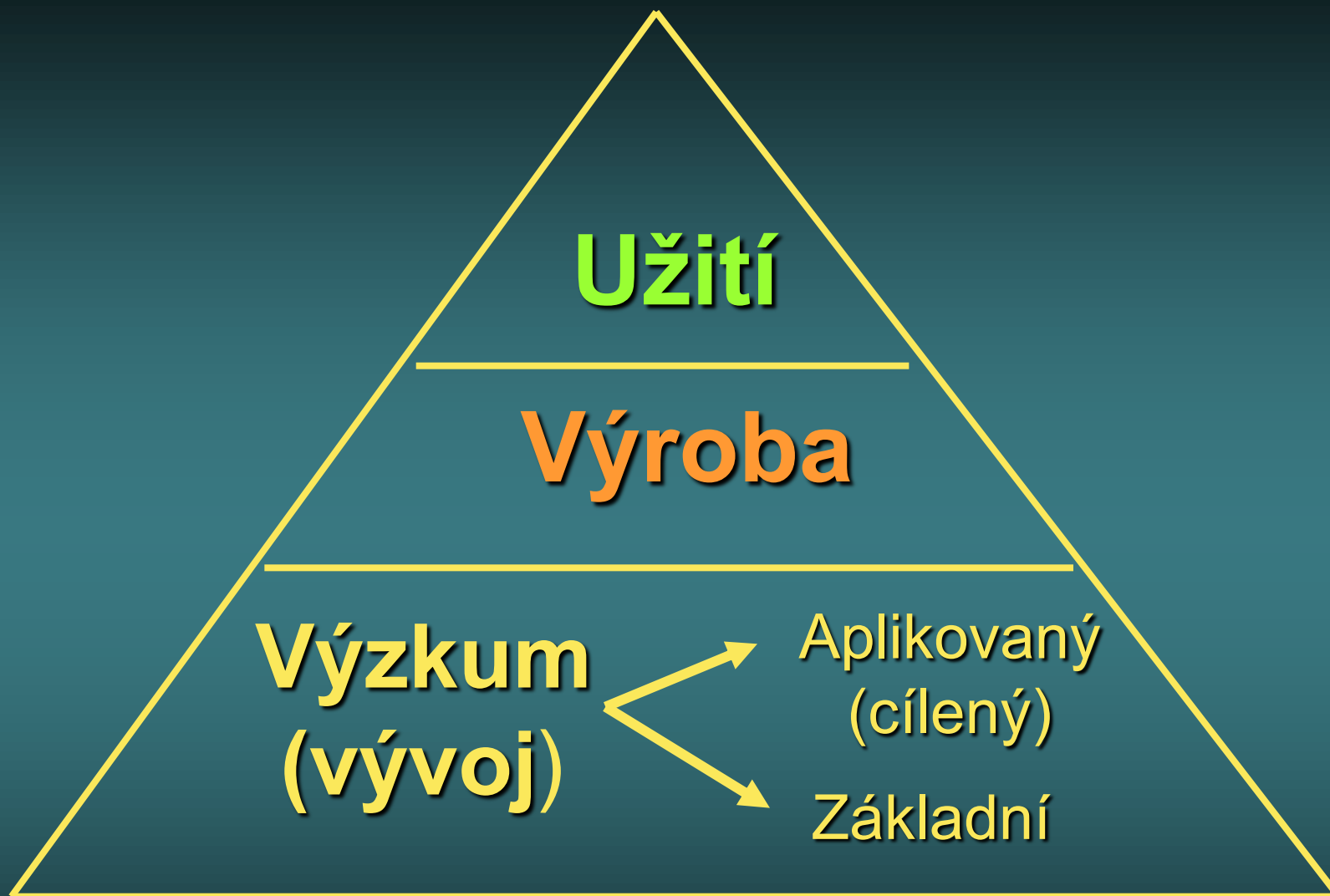
Received 15 June 2004; received in revised form 26 July 2004; accepted 29 July 2004

ONCOLOGY REPORTS 19: 567-573, 2008

## Response of normal and colon cancer epithelial cells to TNF-family apoptotic inducers

JIRINA HOFMANOVÁ, ALENA VACULOVÁ\*, MARTINA HYZD'ALOVÁ\* and ALOIS KOZUBÍK

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



Snaha o naplnění cyklu  
a důsledky pro finanční zajištění