

# **Deregulace cytokinetiky (možnosti ovlivnění)**

**(homeostáza, zdraví a regenerace organismu)**

**A. Kozubík**

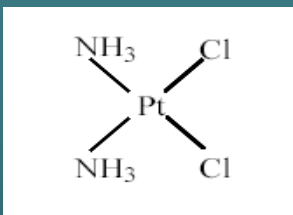
**Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)  
Ústav experimentální biologie, PŘF MU  
(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)  
Brno**

# **Deregulace cytokinetiky: Další příklady jejího ovlivnění**

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

Dvojmocné Pt(II)  
(reaktivní s DNA)

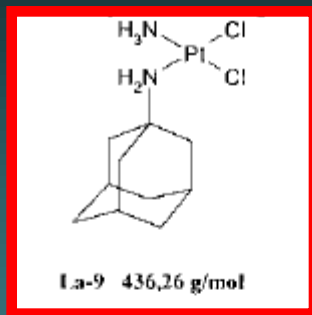
LA-9



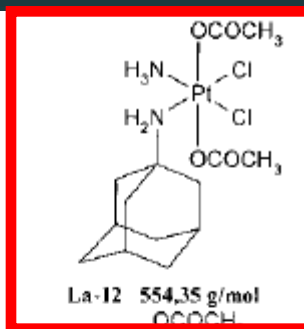
Cisplatina (II)

Syntetizované F. Žákem a spol.,  
PLIVA – Lachema

Zak et al., 2004, J Med Chem,



redukce

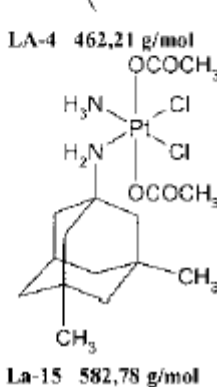
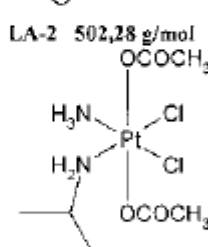
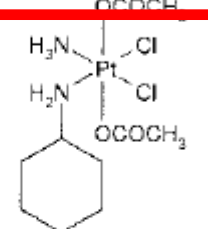
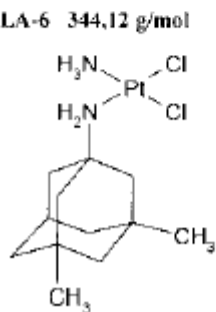
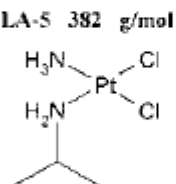
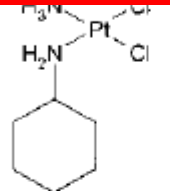


Výhoda: lipofilní

čtyřmocné Pt(IV)  
(s DNA nereaktivní)

LA-12

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



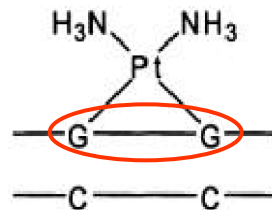
# Biologické „cíle“ cisplatiny (adukty s DNA)

*Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs*

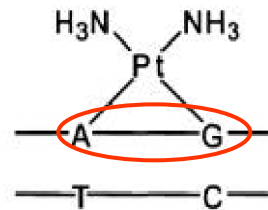
*Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, Vol. 2, No. 4 3*

Typy DNA !  
aduktů

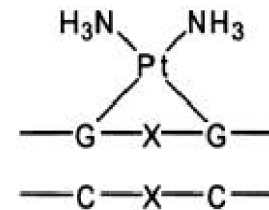
Intra-  
(80-90%)



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



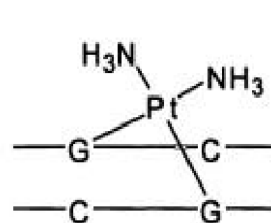
1,2 ApG intrastrand  
(20-25%) !



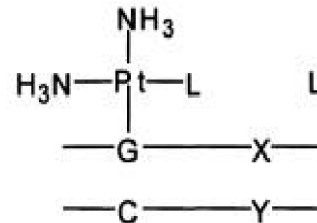
1,3 GpXpG intrastrand  
(~2%)

a frekvence  
jejich výskytu

Inter-



1,2 GpG interstrand  
(<1%)

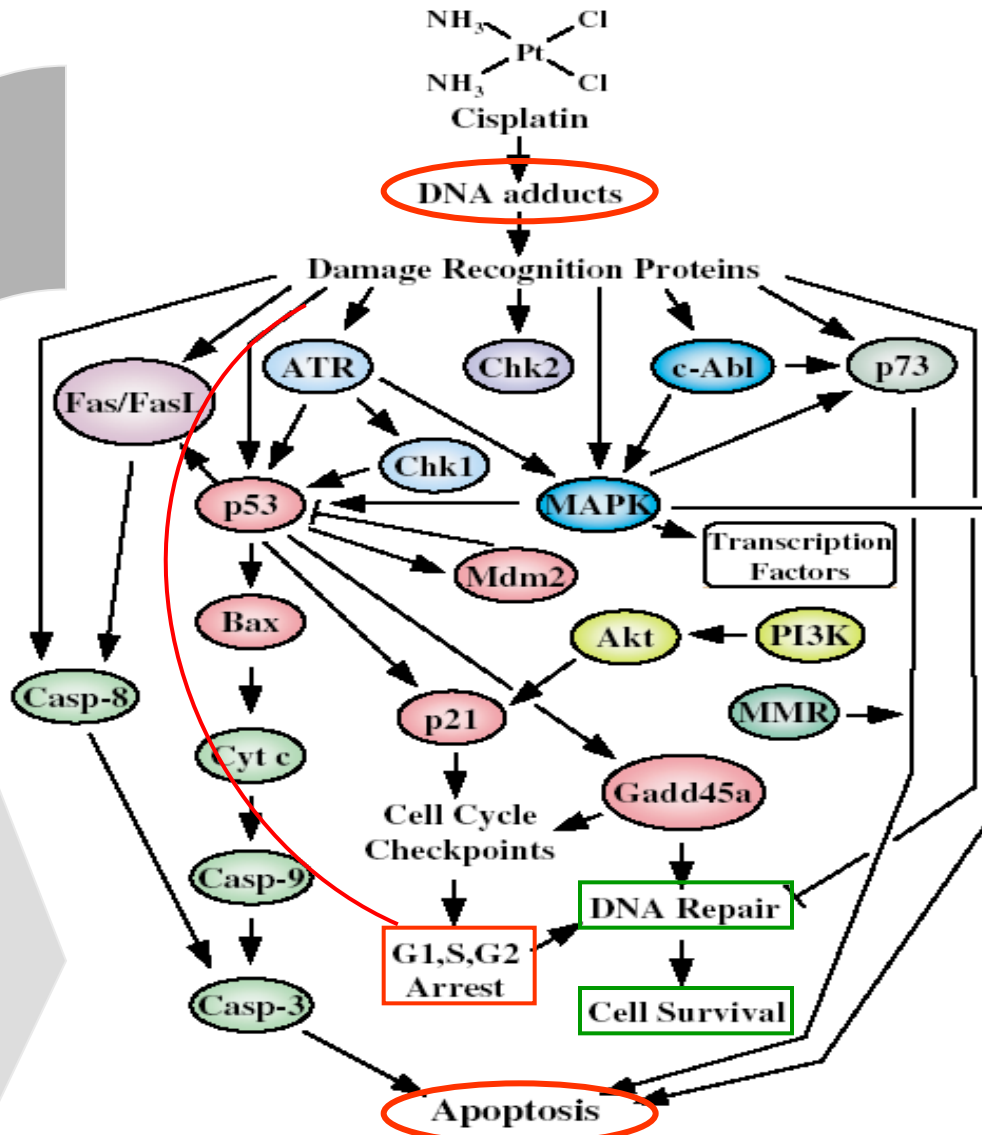


monofunctional  
G-adduct

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

mono-

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



**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 ?

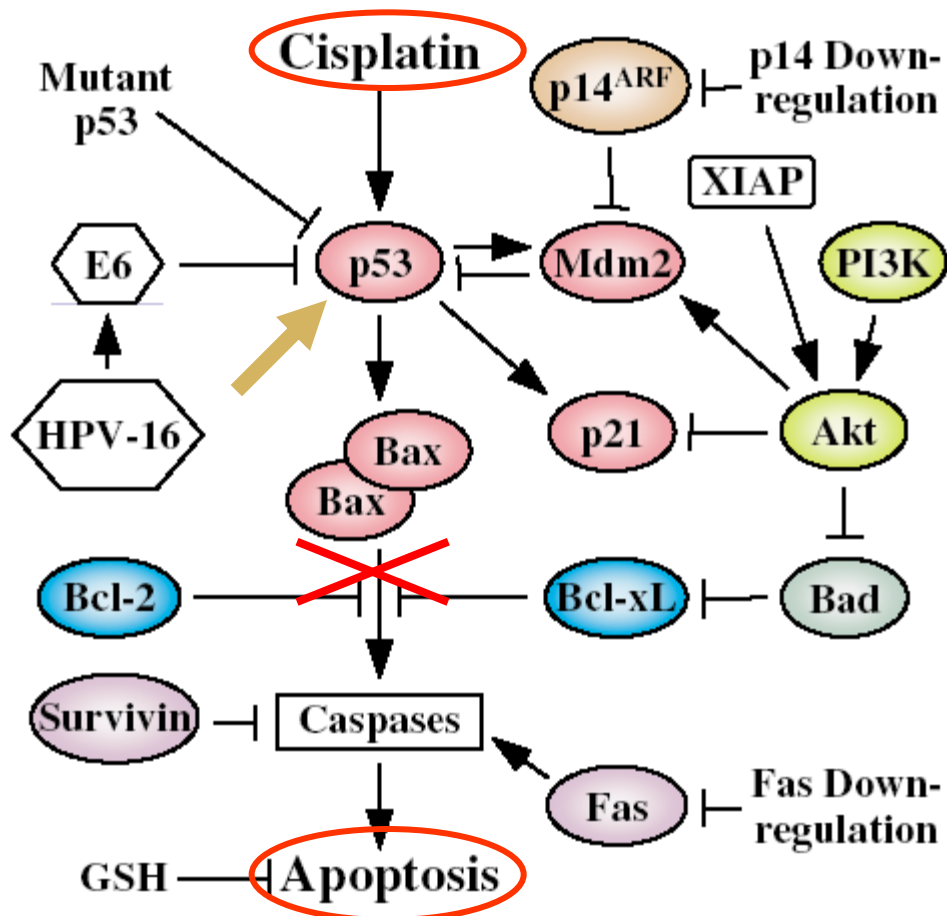


Figure 6 Disruption of p53-dependent apoptotic pathway in cisplatin-resistant tumor cells

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

**Přispívají k tomu**

změny v regulaci proteinů r. Bcl, Fas,

Survivinu, Glutathionu

# „Dose-response“ křivky (MTT test)

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

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

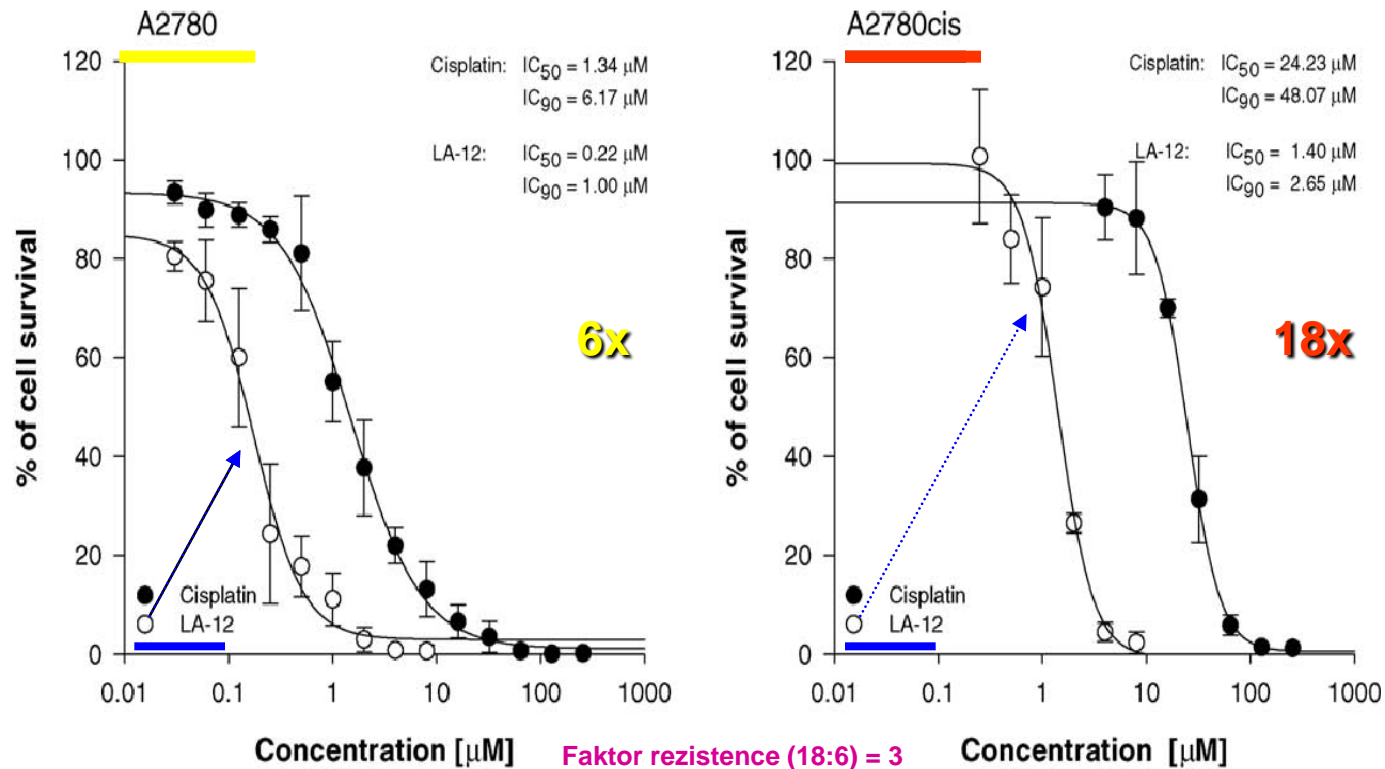
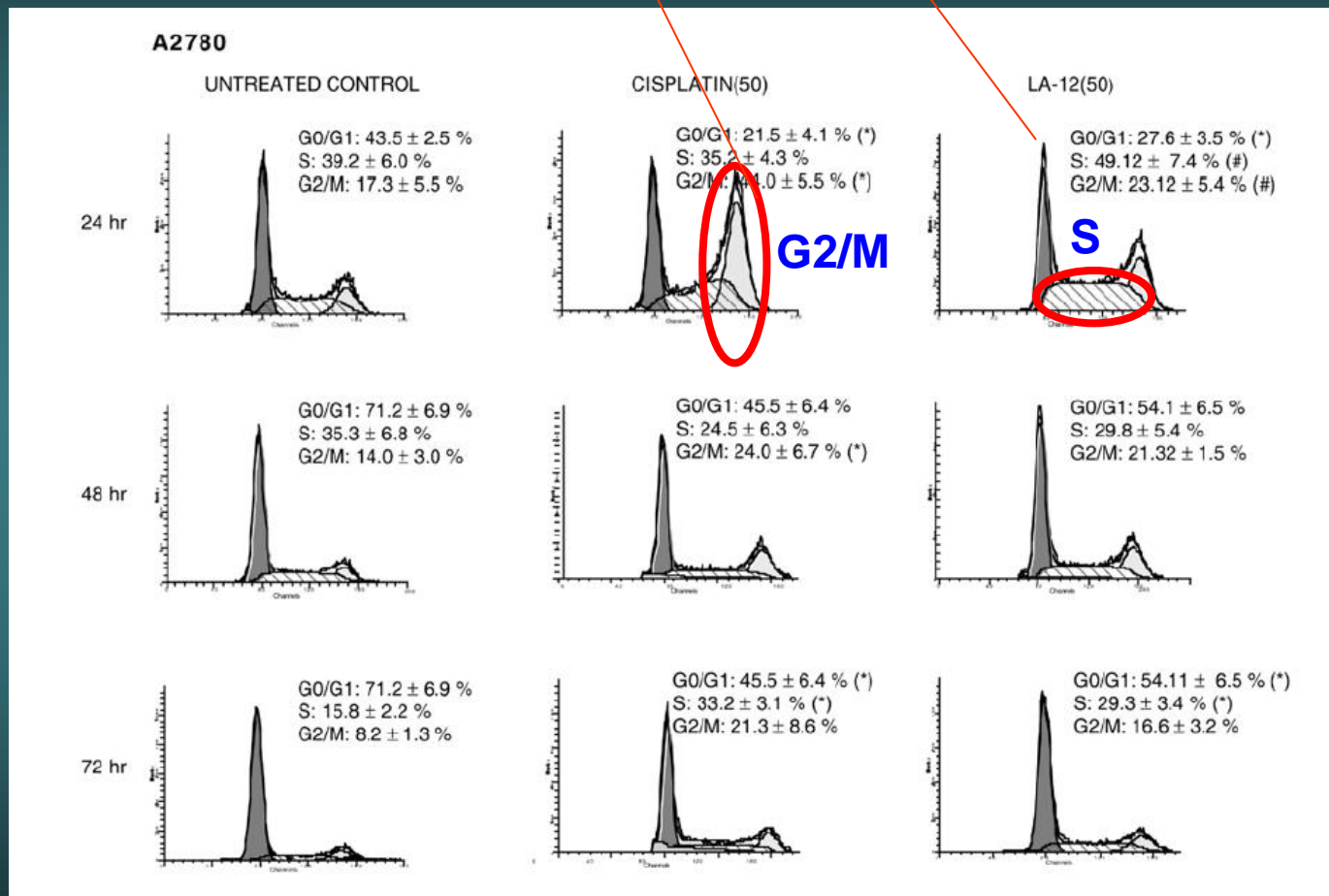


Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3  $\mu\text{M}$  and 256  $\mu\text{M}$  were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting 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.

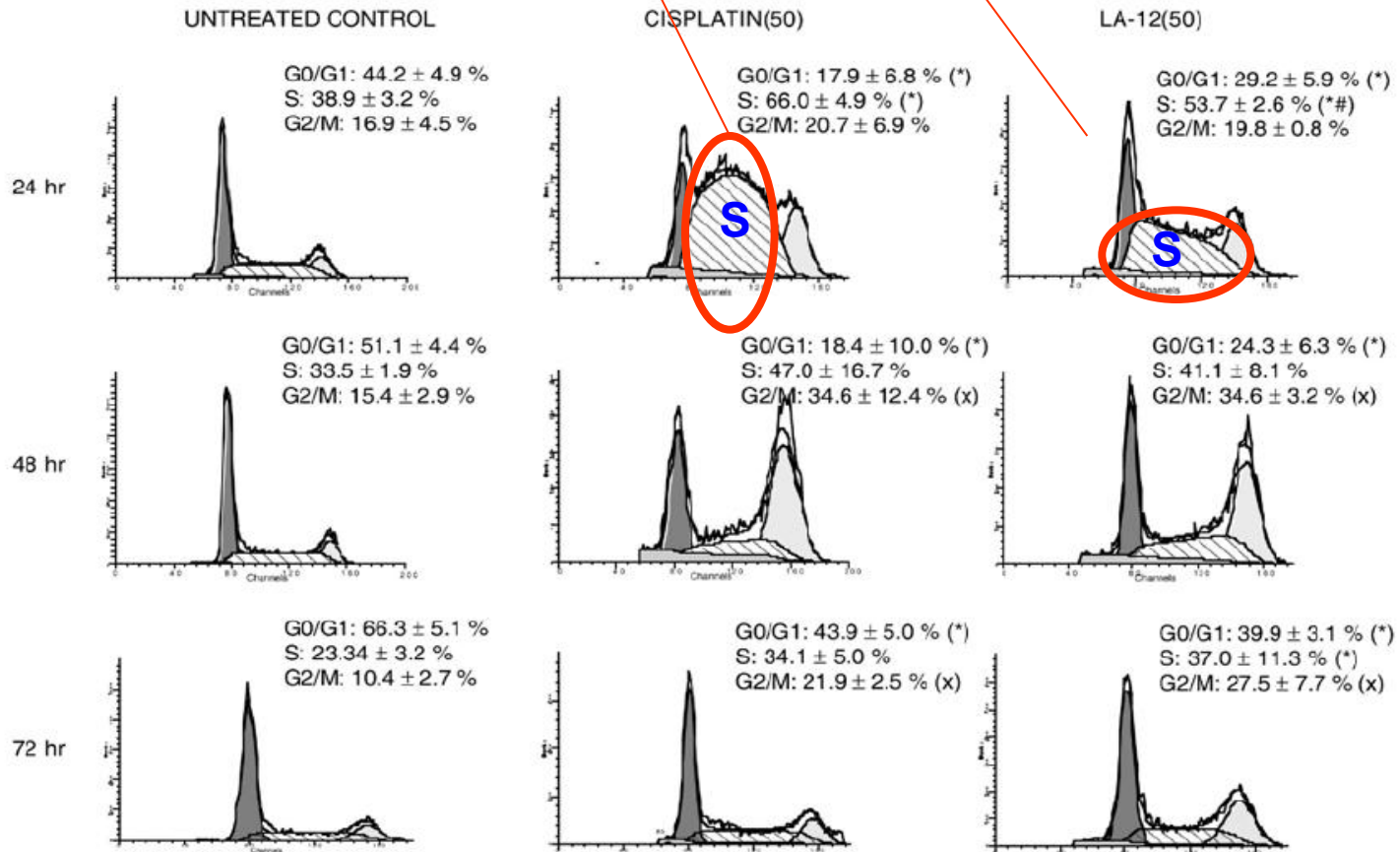
# Rozdílný vliv cisplatiny a LA-12 na buněčný cyklus A2780 (single staining)





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

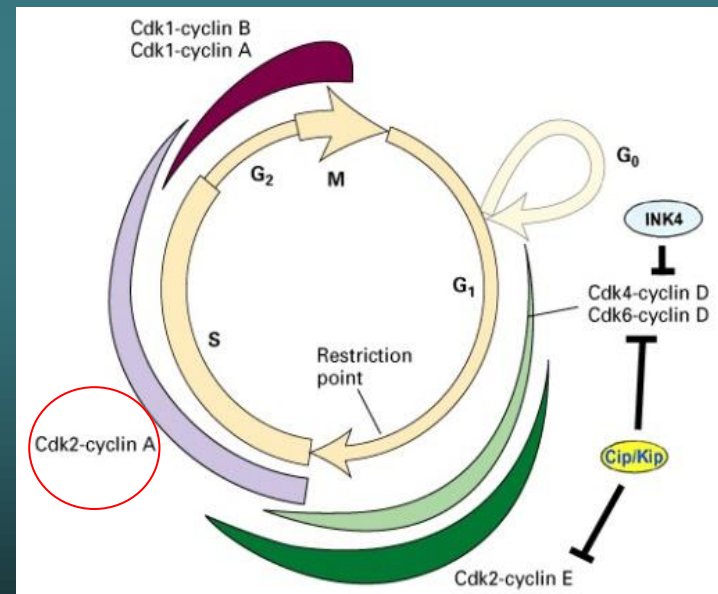
## A2780cis



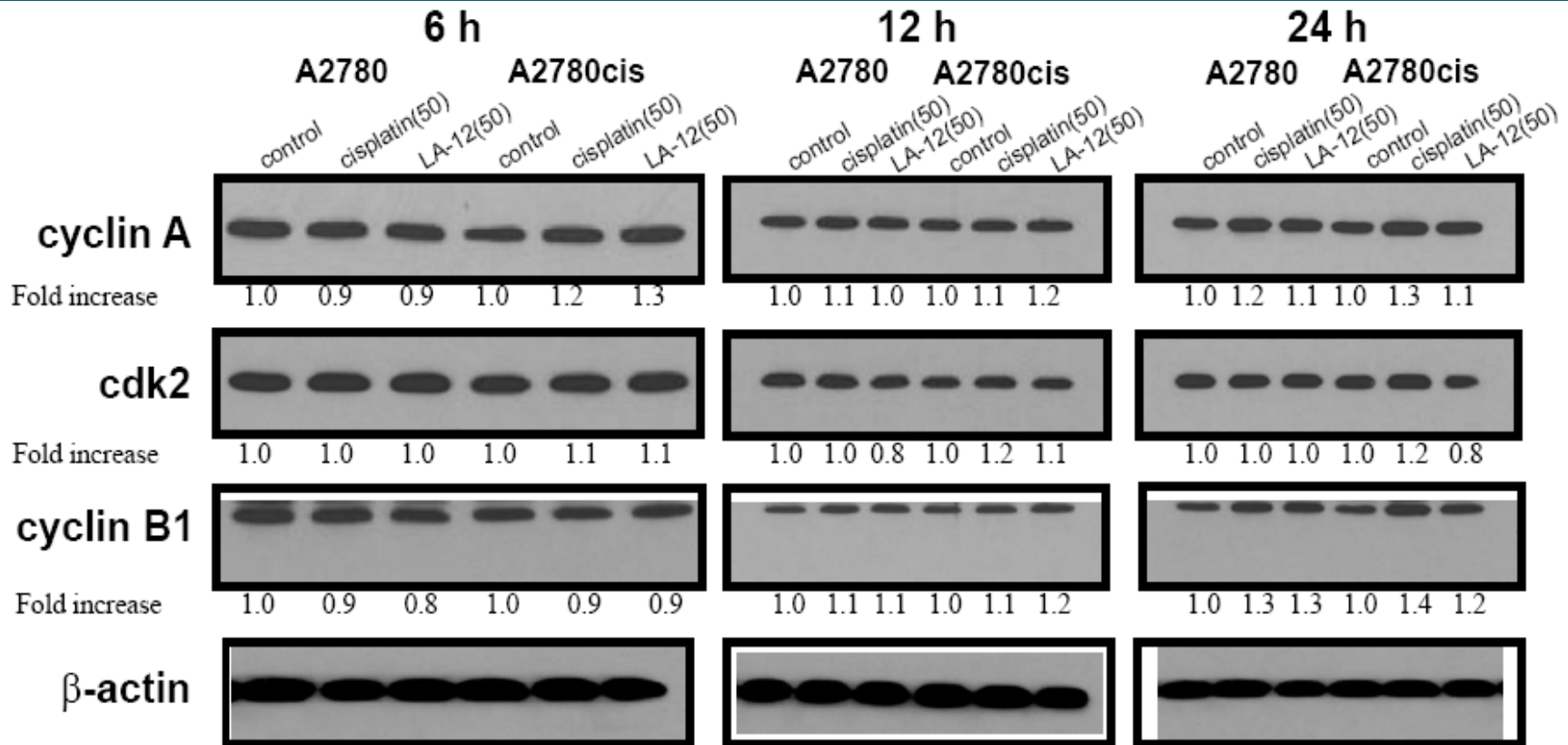
# Účinky LA-12 a cisplatiny na b. cyklus jsou u ovariálních nádorových linií rozdílné.

## 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)



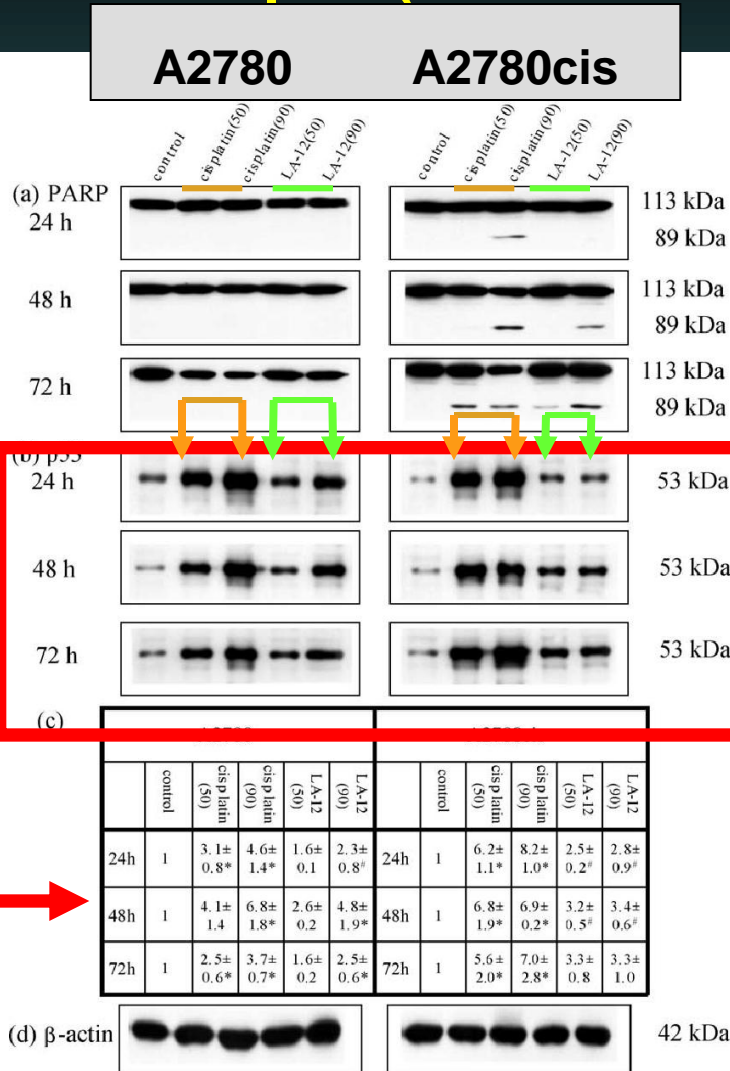
# Hladiny proteinů regulujících buněčný cyklus (*cyklin A, B1, cdk2*) u buněk **A2780** a **A2780cis** po působení LA-12 a cisplatinu



Nebyly pozorovány žádné změny

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

p53

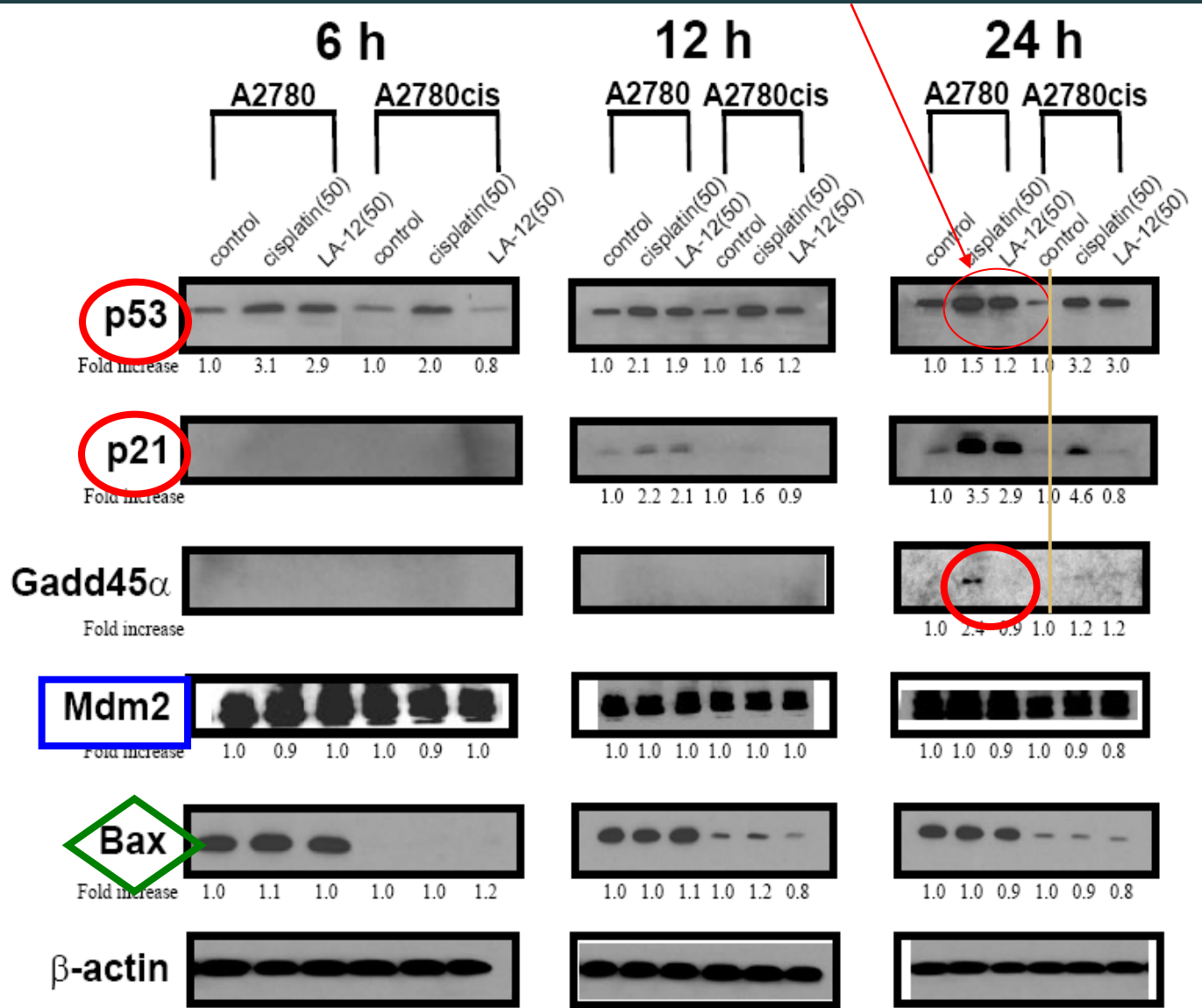


Equitoxické koncentrace cis-DDP indukují vyšší expresi proteinu p53 (teoreticky vyšší poškození DNA, než po apl. LA-12 a tudíž by cis-DDP měla působit efektivněji),

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

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).

# 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

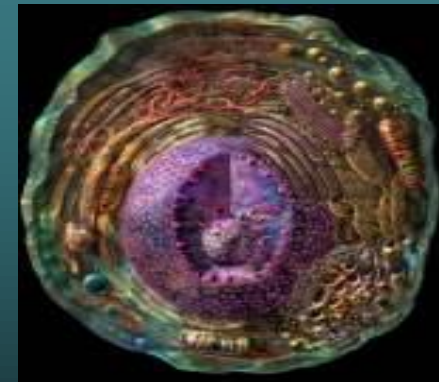
**Tyto naše výsledky**, i když plně nevysvětlují působení **cisplatiny a LA-12**, se zařazují mezi ty přístupy, které **výzkum platinových cytostatik posouvají do nových oblastí**.

**Studie z poslední doby** ukazují, že **cisplatina inhibuje růst nádorových buněk v koncentracích, které jsou významně nižší, než konc. potřebné pro inhibici syntézy DNA**.

**To naznačuje, že mohou existovat i jiné mechanismy působení než ty, které jsou primárně založeny na poškození DNA**

**Platinová cytostatika** mohou reagovat s dalšími buněčnými strukturami (komponenty) jako jsou:

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



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

# Předpoklad:

Vzhledem ke své lipophilicitě, lze očekávat, že alespoň některé **příznivé efekty působení LA-12** by mohly být (alespoň částečně),

**spojeny s interakcemi této látky se složkami b. membrán**

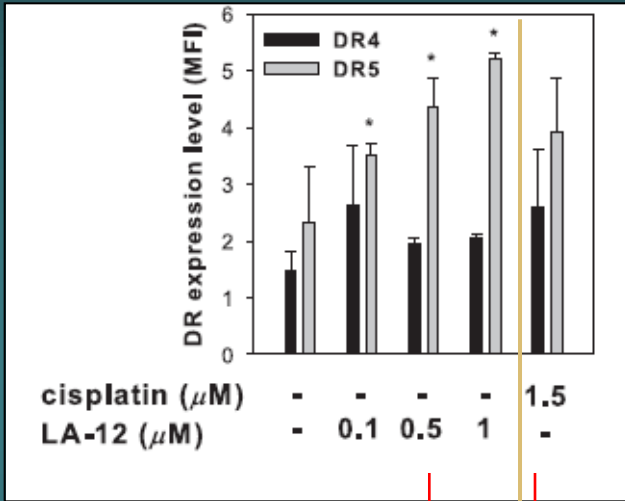
*(anebo by mohly být modulovány ovlivněním membranového složení).*



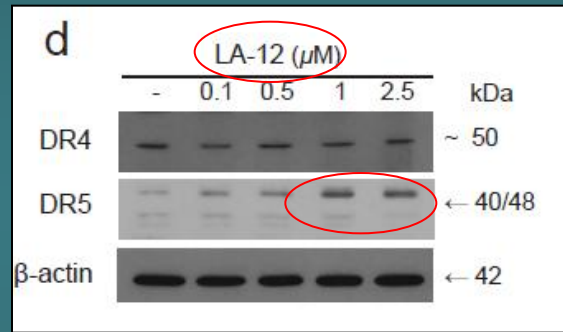
# LA-12 indukuje „upregulaci“ DR5 mRNA, celkových povrchových proteinů, a zvyšuje zastoupení DR5 v lipidových raftech

Zastoupení DR5 a DR4 v membránách

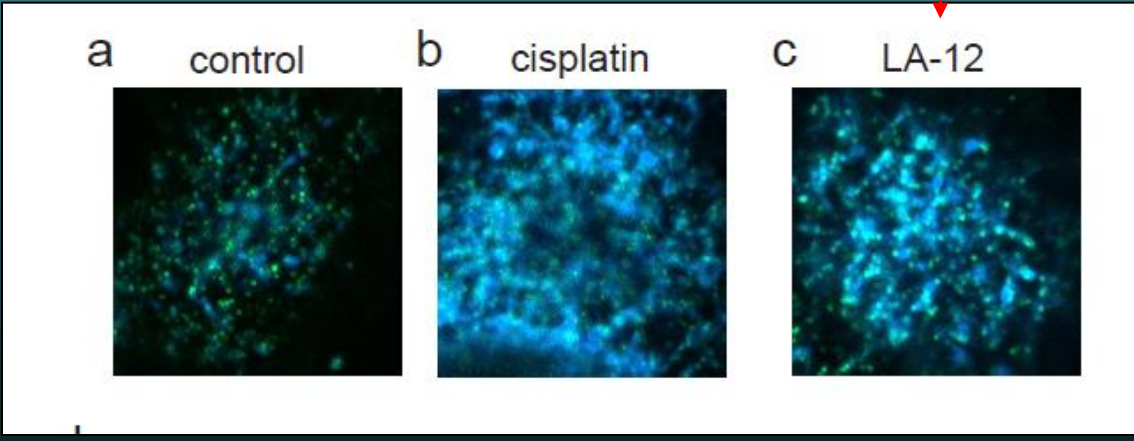
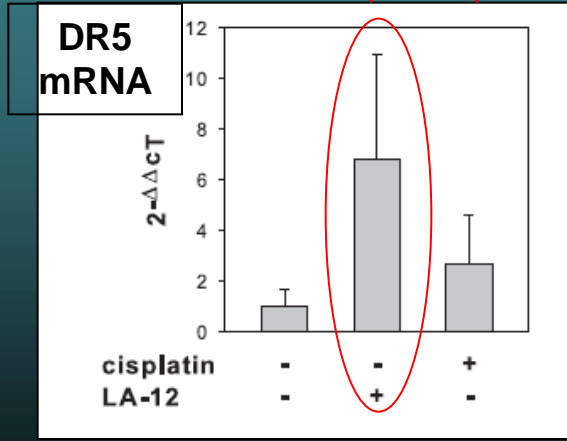
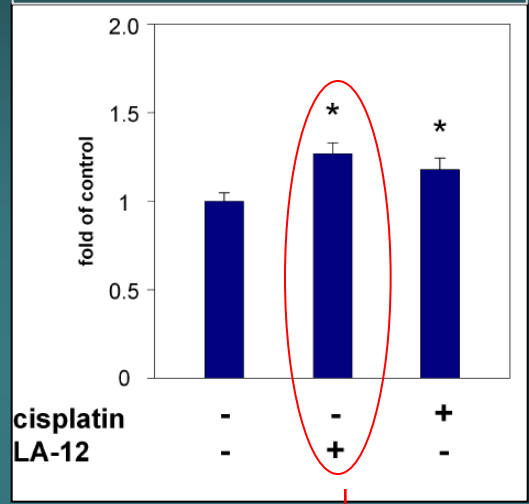
— HCT 116 —



Celkové hladiny DR5



Celkové hladiny DR5 (rafty)




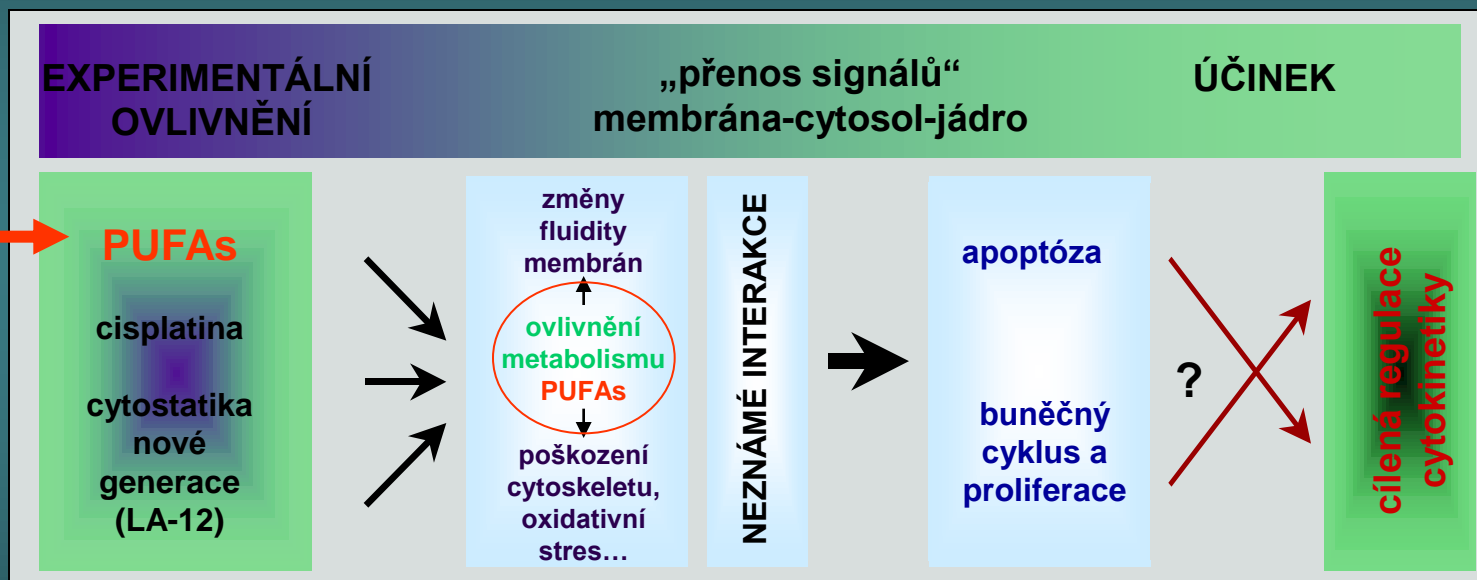
Lokalizace DR5 v lipidových raftech



# 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