

# **Deregulace cytokinetiky (možnosti ovlivnění)**

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

**A. Kozubík**

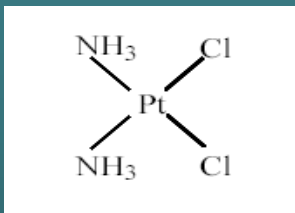
**Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., (*Oddělení cytokinetiky*)  
Ústav experimentální biologie, PŘF MU  
(*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů*)  
Brno**

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

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

Dvojmocné Pt(II)  
(reaktivní s DNA)

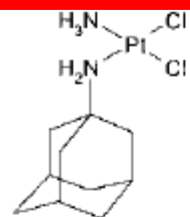
LA-9



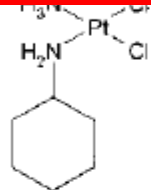
Cisplatina (II)

Syntetizované F. Žákem a spol.,  
PLIVA – Lachema

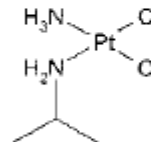
Zak *et al.*, 2004, J Med Chem,



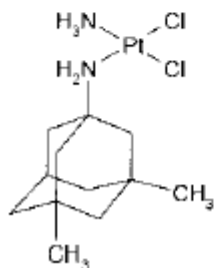
LA-9 436,26 g/mol



LA-5 382 g/mol

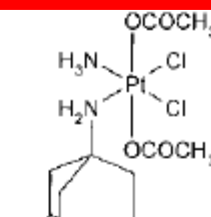


LA-6 344,12 g/mol

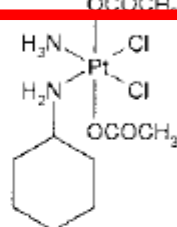


LA-13 464,32 g/mol

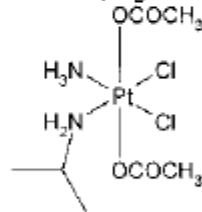
redukce



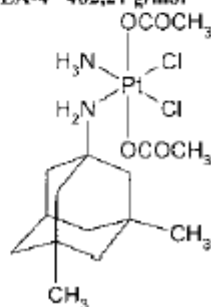
LA-12 554,35 g/mol



LA-2 502,28 g/mol



LA-4 462,21 g/mol



LA-15 582,78 g/mol

Výhoda: lipofilní

čtyřmocné Pt(IV)  
(s DNA nereaktivní)

LA-12

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

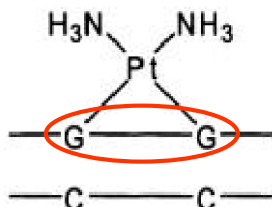
# Biologické „cíle“ cisplatiny (adukty s DNA)

*Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs*

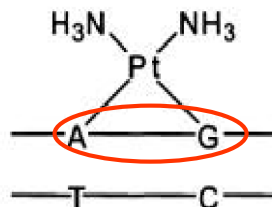
*Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, Vol. 2, No. 4 3*

Typy DNA !  
aduktů

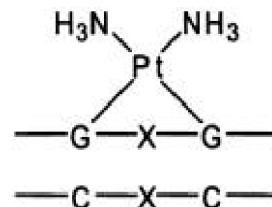
Intra-  
(80-90%)



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



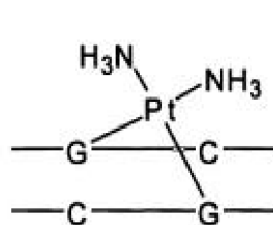
1,2 ApG intrastrand  
(20-25%) !



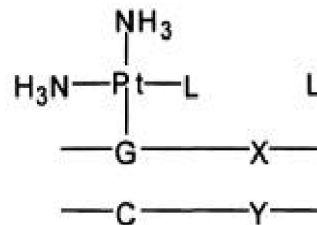
1,3 GpXpG intrastrand  
(~2%)

a frekvence  
jejich výskytu

Inter-



1,2 GpG interstrand  
(<1%)

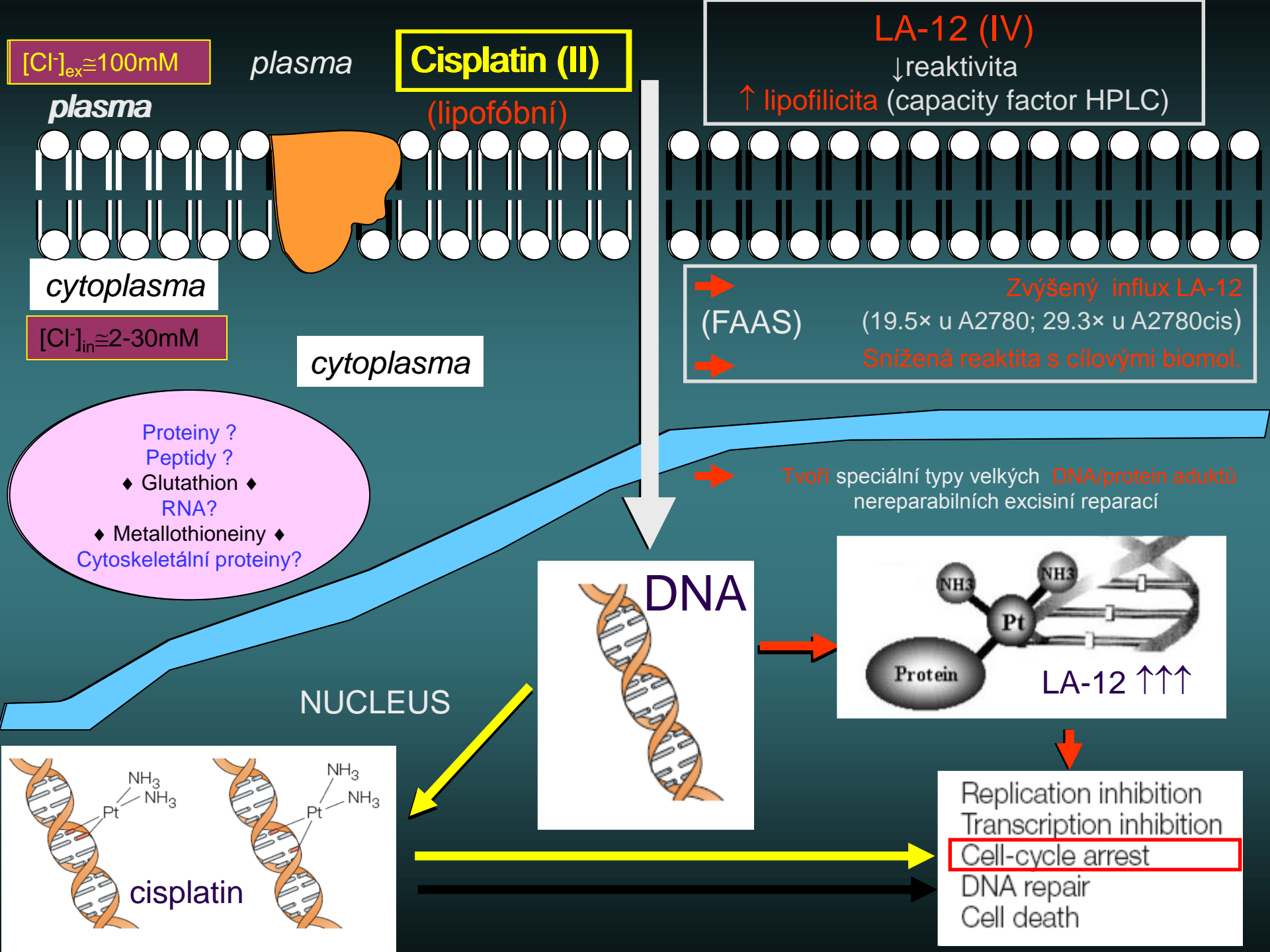


monofunctional  
G-adduct

mono-

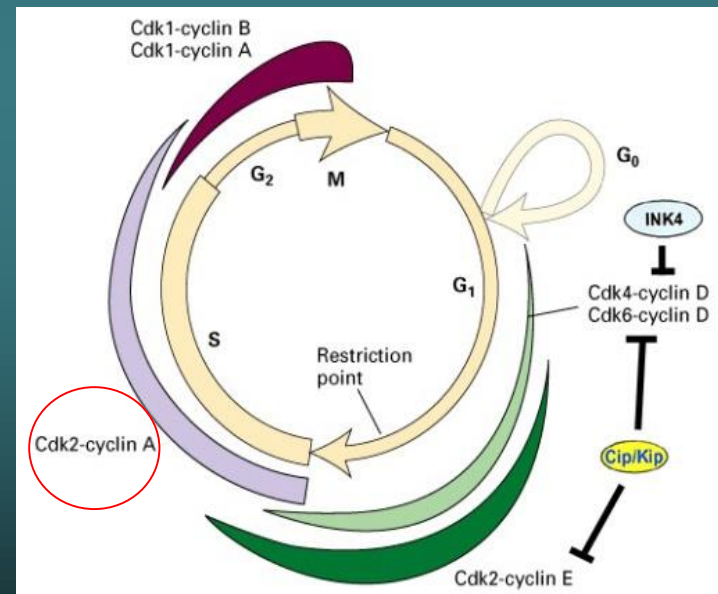
L = Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O, S-R

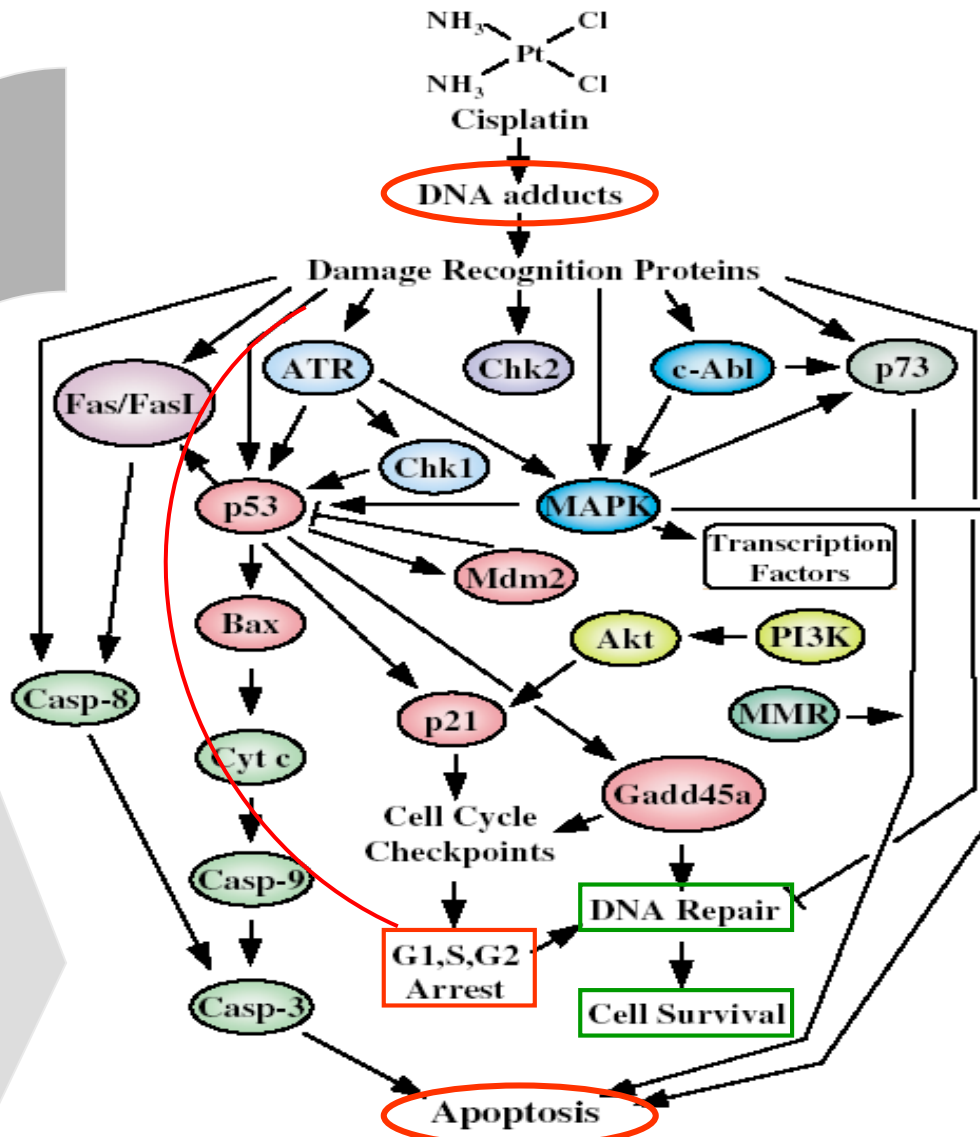
Fig. (2). Types of cisplatin-DNA adducts and their frequency of formation.



## Úloha vybraných 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)





**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 **cisplatin**  
 iniciované adukty DNA

B. smrt závisí na  
 relativní intenzitě  
 Signálů

LA-12 ?

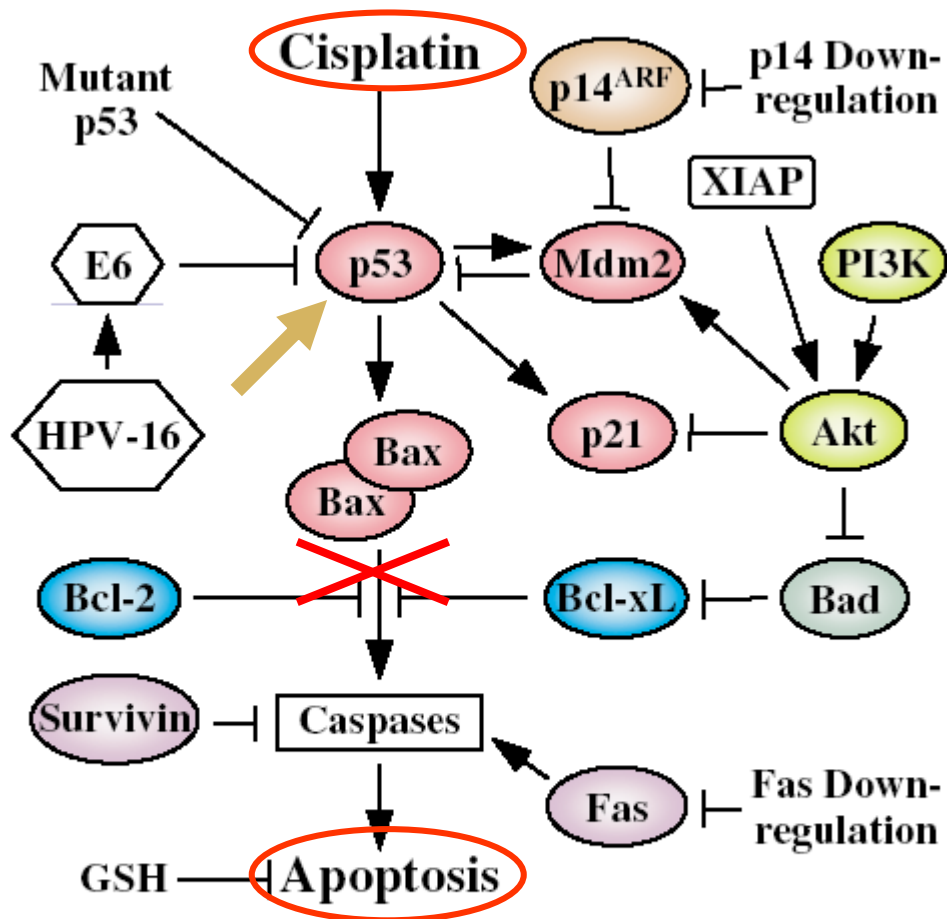


Figure 6 Disruption of p53-dependent apoptotic pathway in cisplatin-resistant tumor cells

**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)

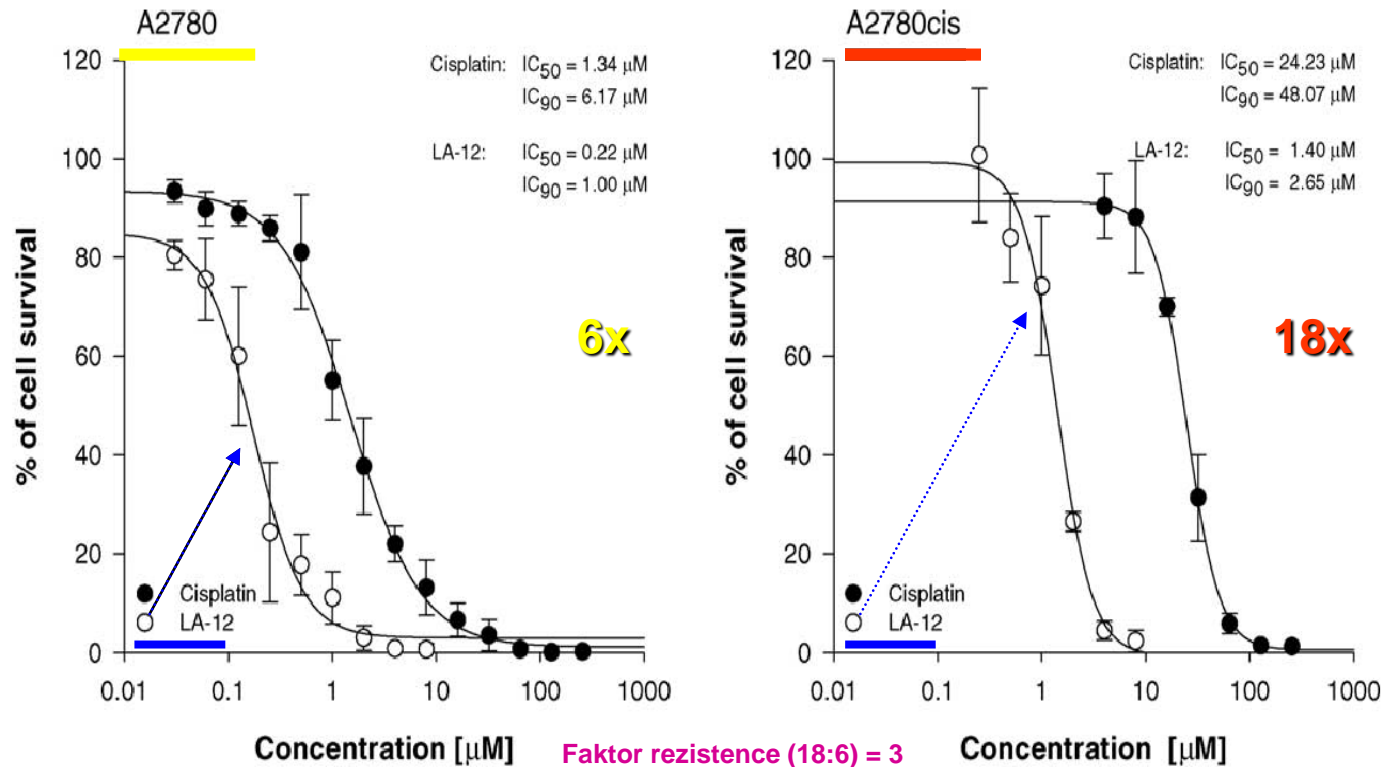
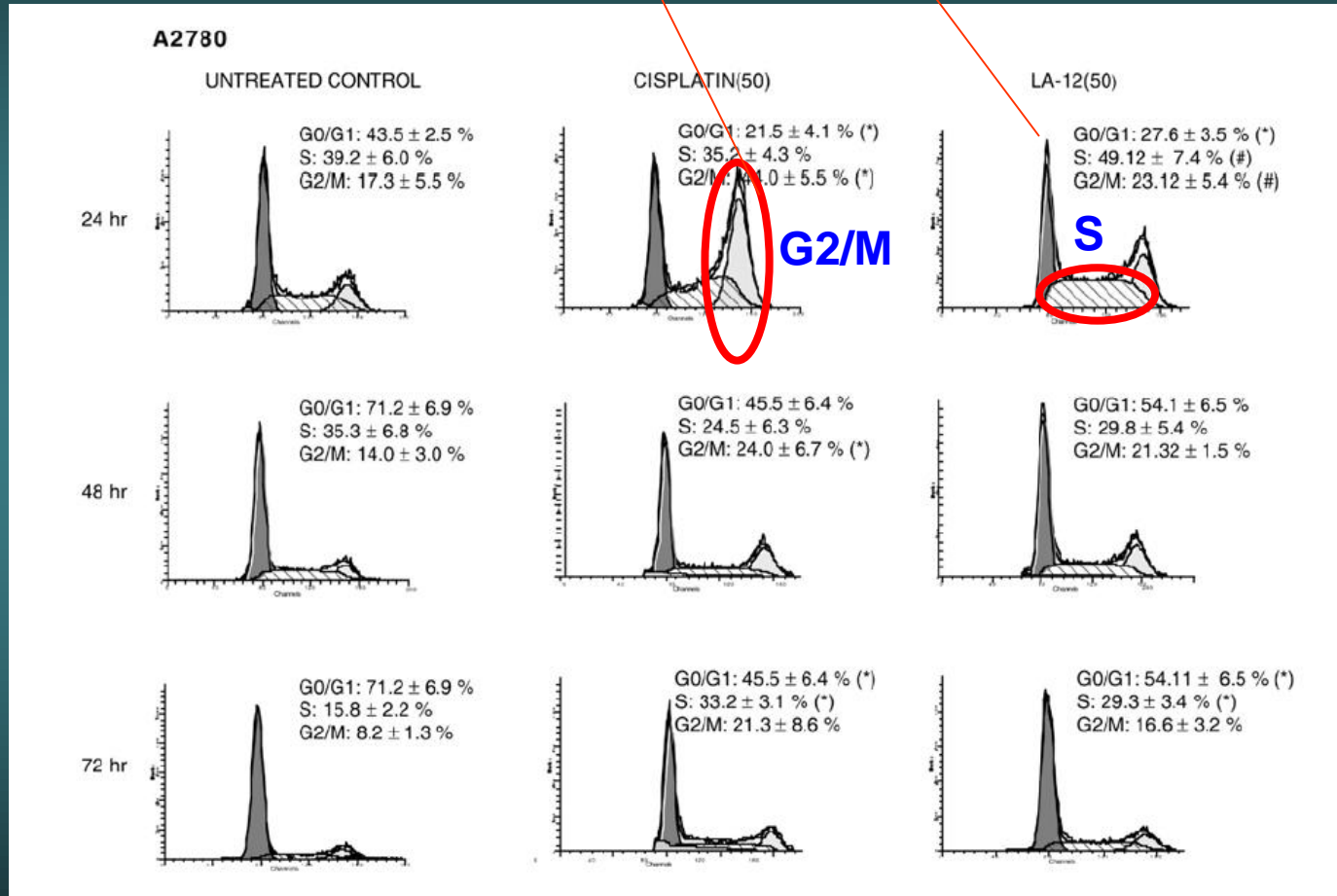


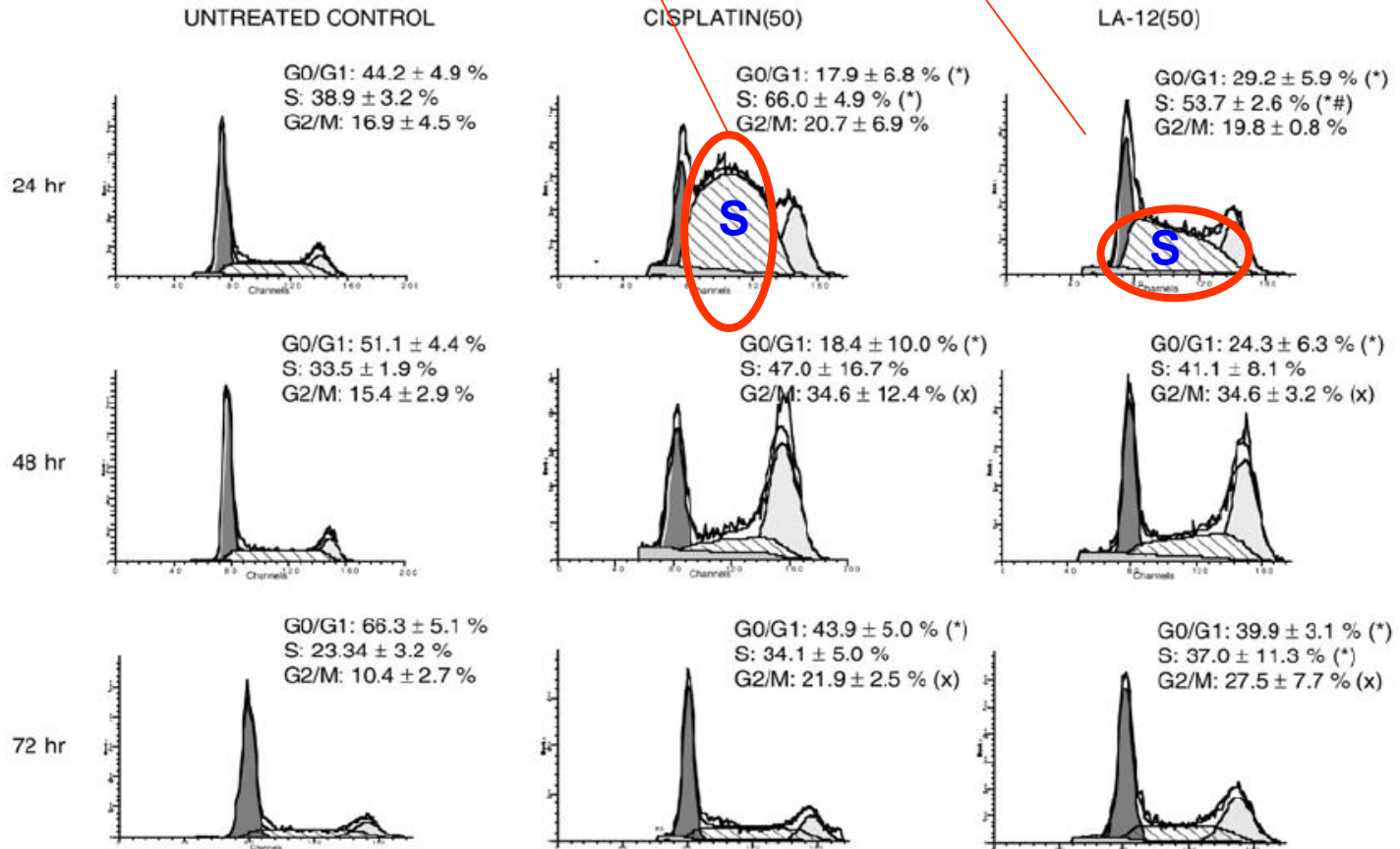
Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3  $\mu\text{M}$  and 256  $\mu\text{M}$  were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting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

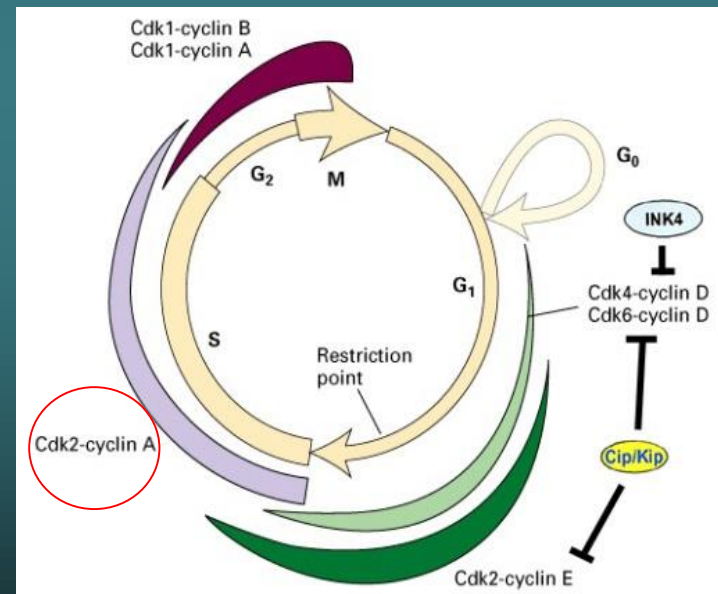
## A2780cis



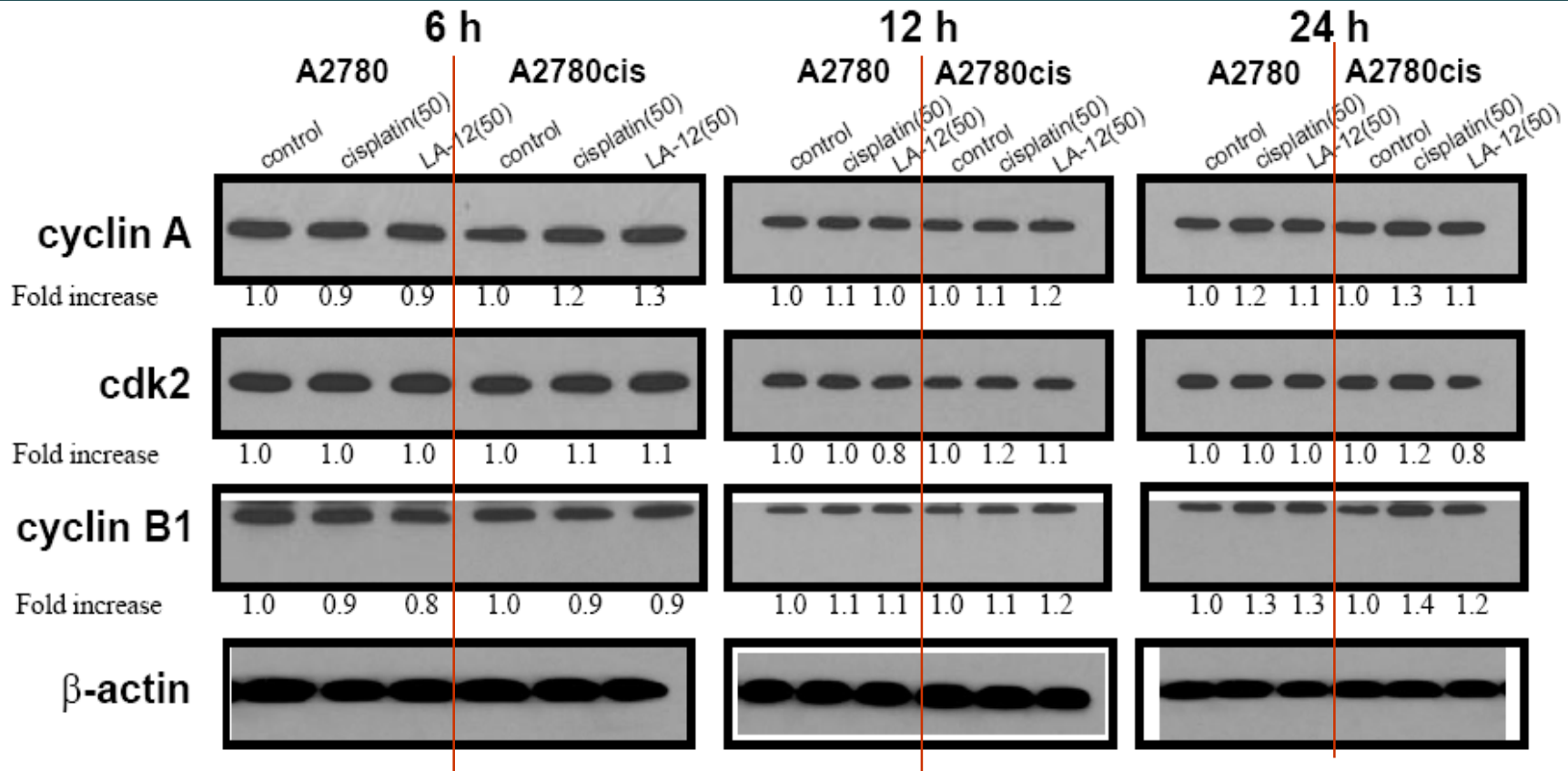
# Účinky LA-12 a cisplatiny na b. cyklus jsou u ovariálních nádorových linií rozdílné.

## 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)



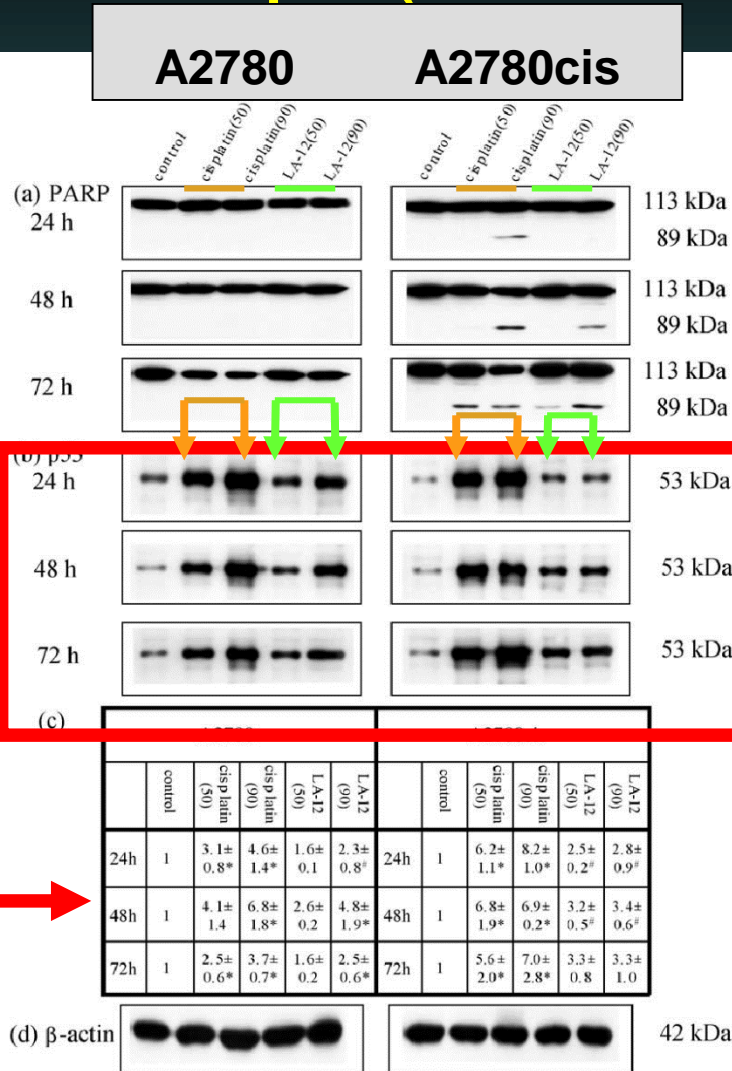
# Hladiny proteinů regulujících buněčný cyklus (*cyklin A, B1, cdk2*) u buněk A2780 a A2780cis po působení LA-12 a cisplatiny



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),

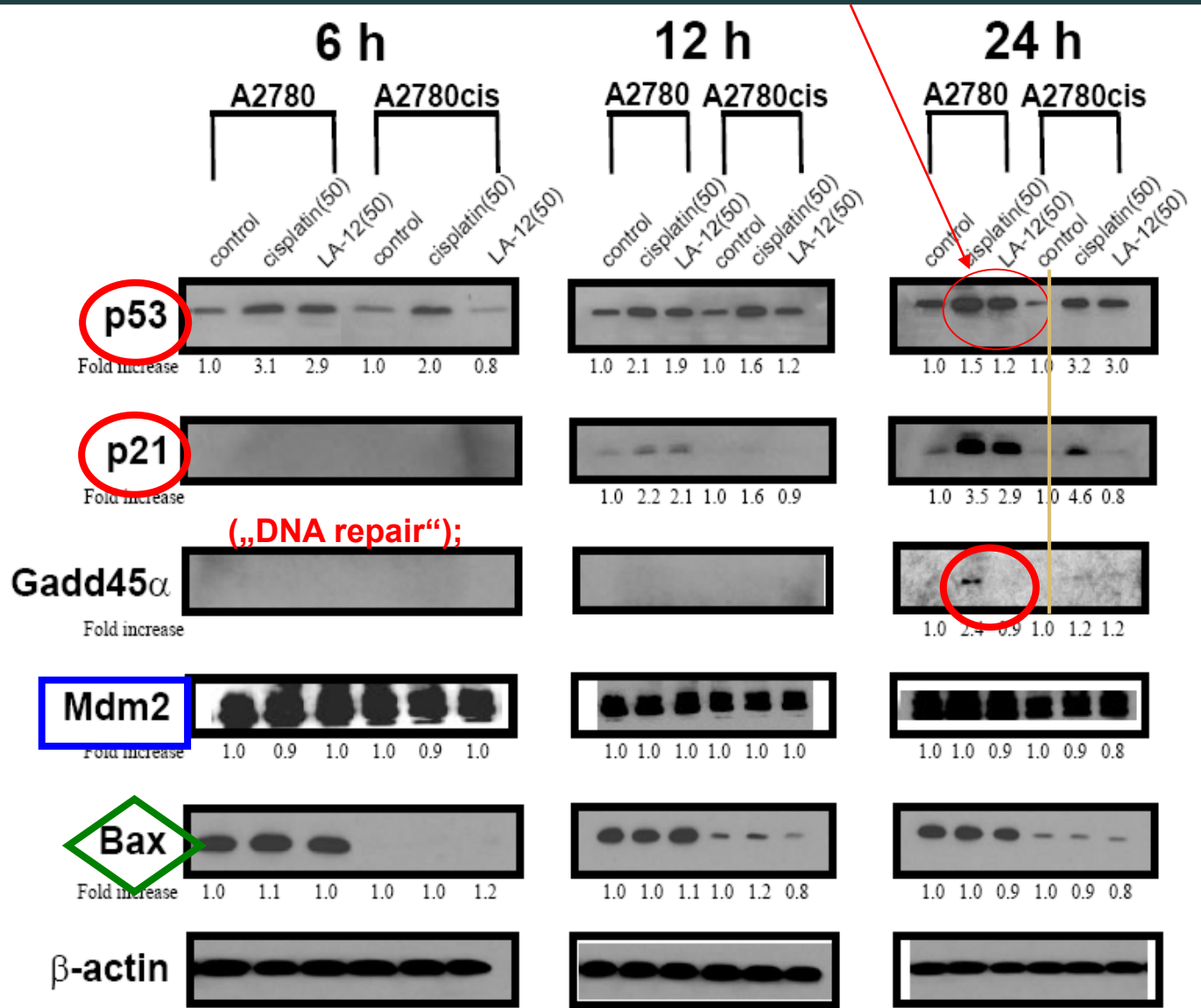
Nebylo tomu tak, tzn. že by musí existovat jiné, např. s poškozením DNA nesouvisející mechanismy působení LA-12 !!!!!

PARP-substrát kaspázy

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 Gadd45α u buněk A2780 po působení cisplatiny

Žádné změny na úrovni hladin

Mdm2 a Bax

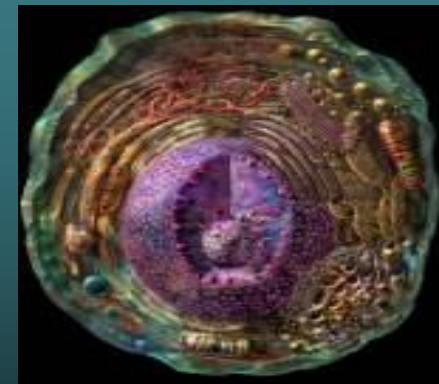
**Tyto výsledky**, i když plně nevysvětlují působení **cisplatiny a LA-12**, se zařazují mezi ty přístupy, které **výzkum platinových cytostatik posouvají do nových oblastí**.

**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),

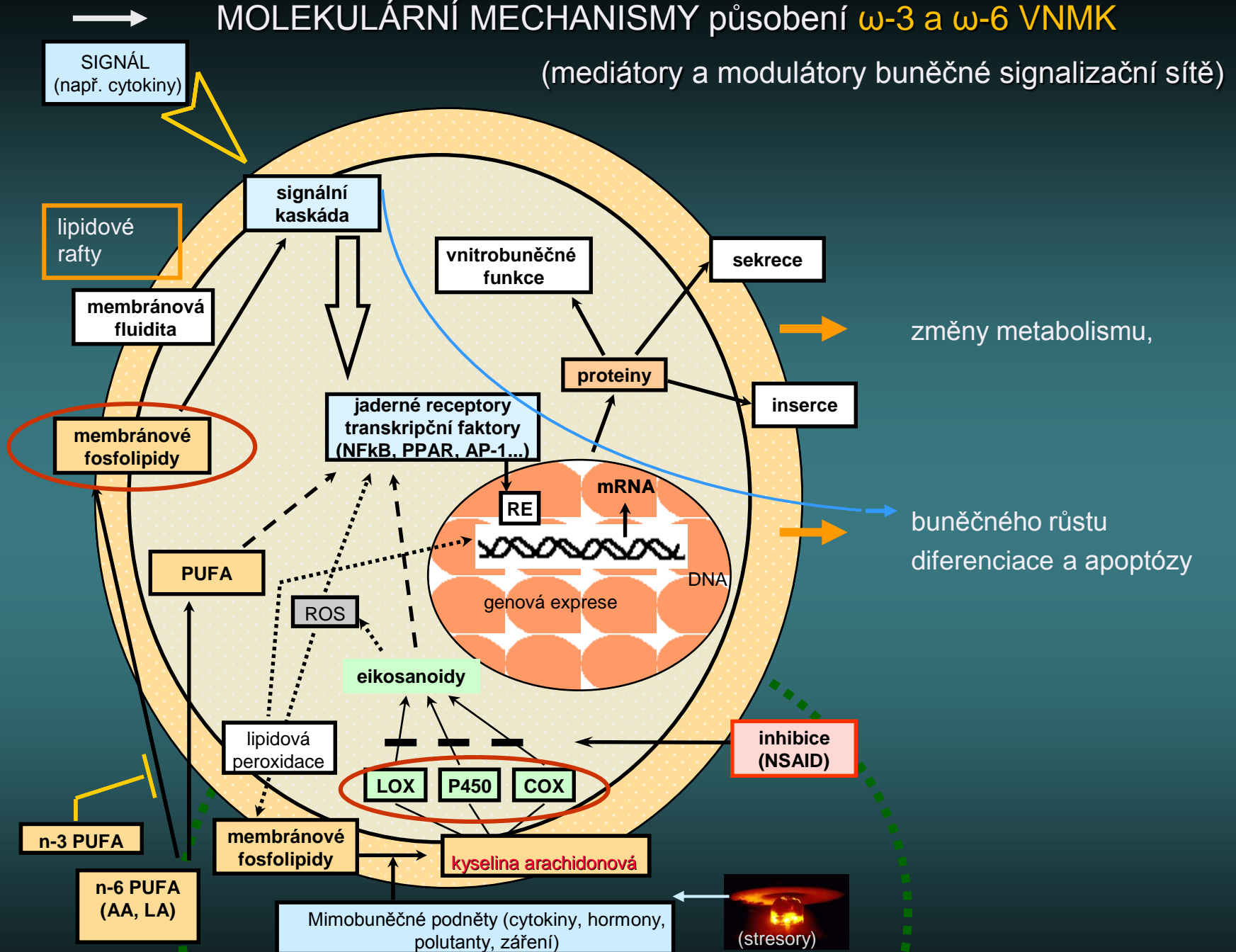
**spojeny s interakcemi této látky se složkami b. membrán**

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



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

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)



# 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)

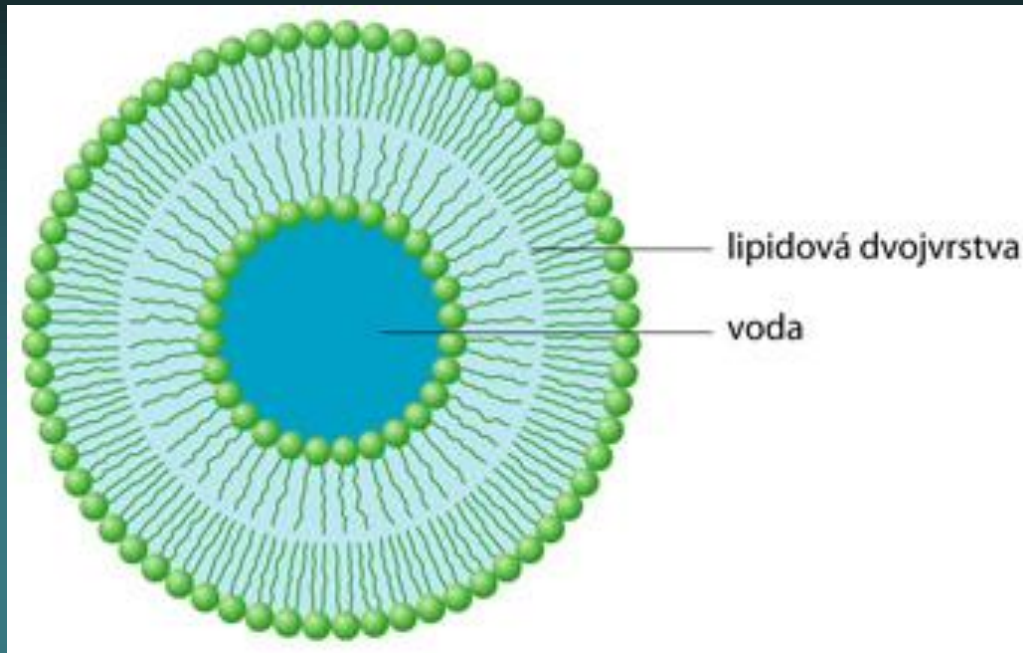
jsme prokázali i v našich předběžných pokusech

u buněk A2780 a A2870cis.

Naše další výsledky s využitím kalorimetrie provedené na umělých lipozomálních strukturách DPPC (1,2-dihexadecanoyl-/sn/-glycero-3-phosphocholine (DPPC PC(16:0/16:0) 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.

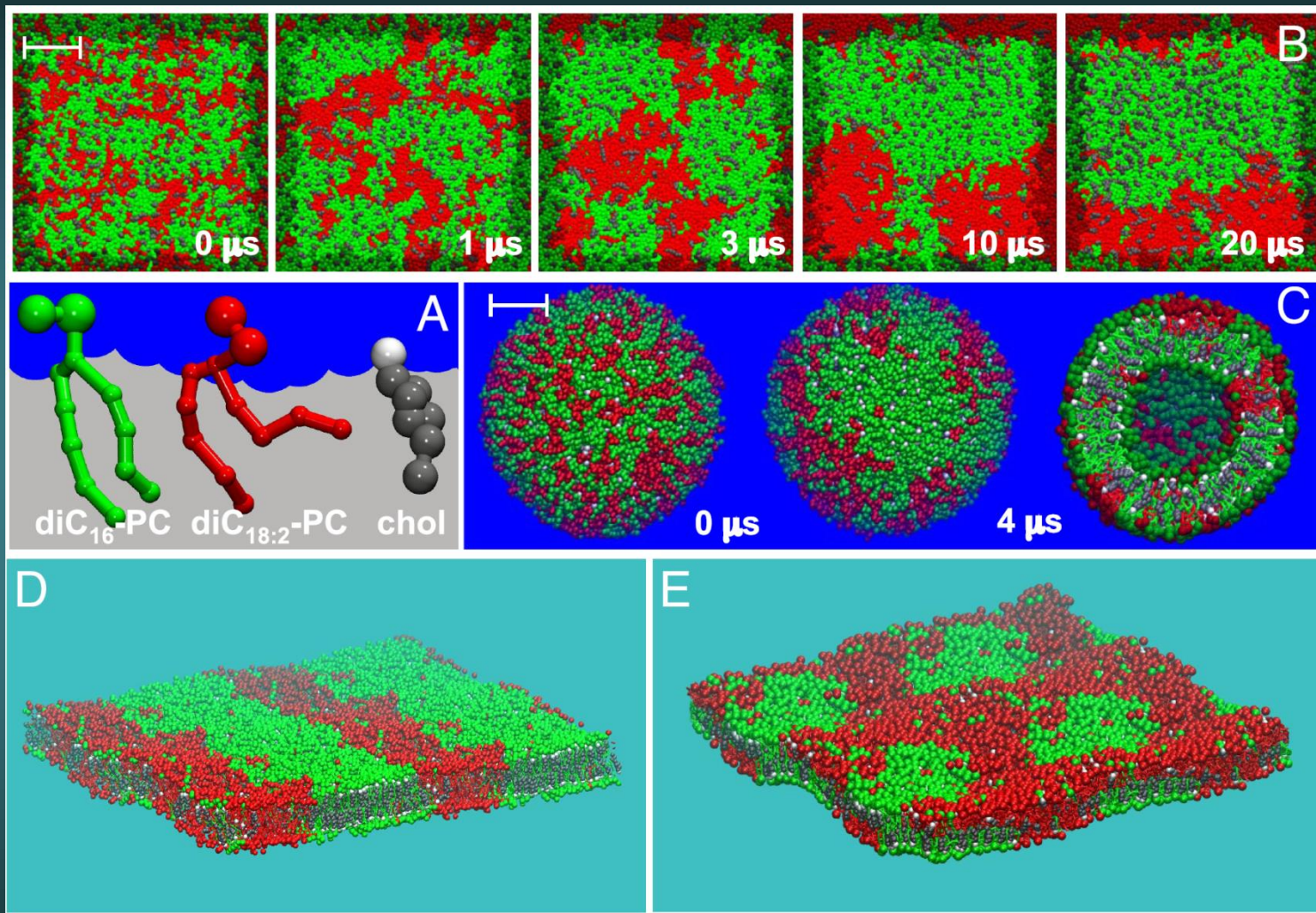
Kombinace AA s cis-DDP anebo s LA-12 naznačily tendence k fázové separaci (*změny nebo objevení se druhého píku*), kdy se tyto píky liší po kombinaci AA s cis-DDP od kombinace AA s LA-12.

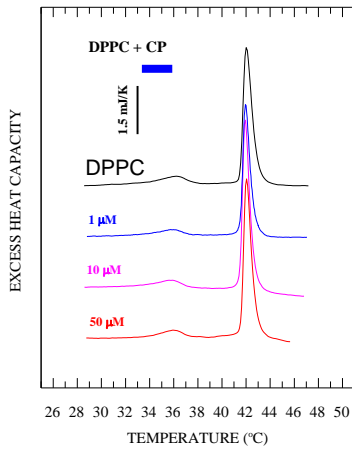


Vznik  
suspenze vhodných polárních lipidů (např. lecithin) + působením ultrazvuku

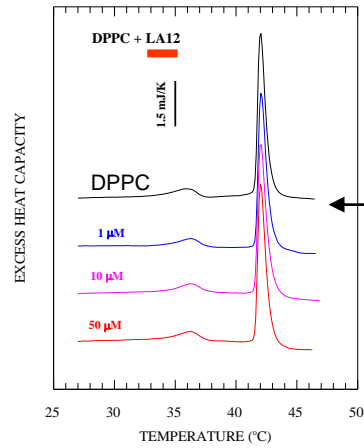


# Dynamický charakter biologických membrán (model)

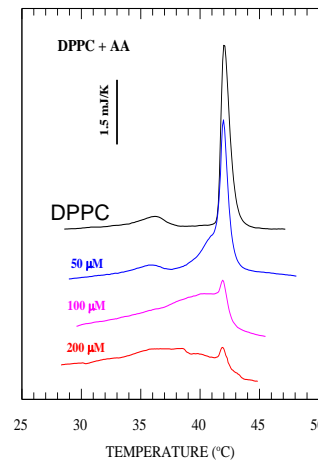




Vliv CP na DPPC multilamelární lipozómy

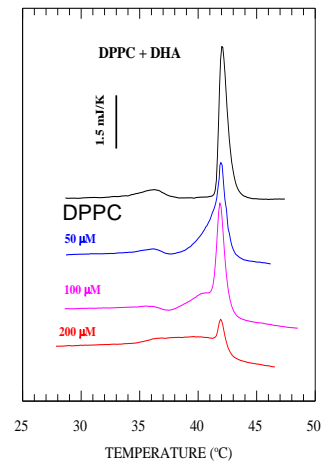


Vliv LA 12 na DPPC



Vliv AA

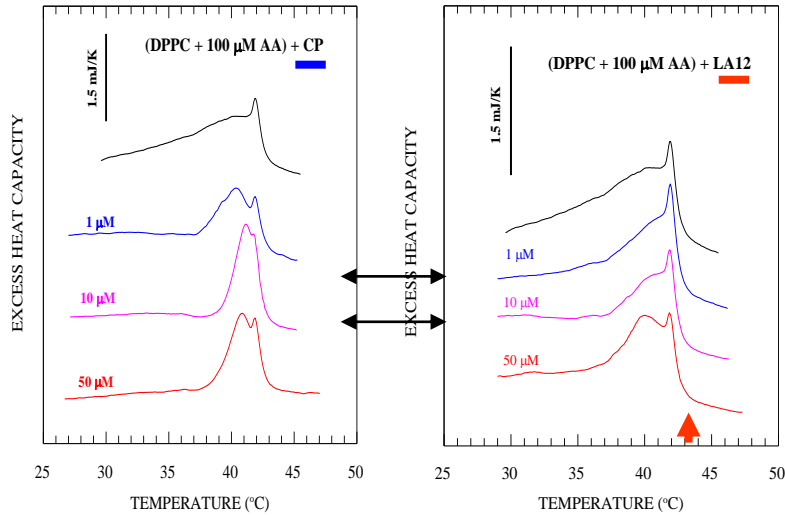
Po 50 $\mu$ M AA pozorujeme snížení píku odpovídajícího předpřechodu a zároveň rozšiřování hlavního fázového přechodu - zvýšení fluidity??? přičemž se entalpie přechodu nemění.



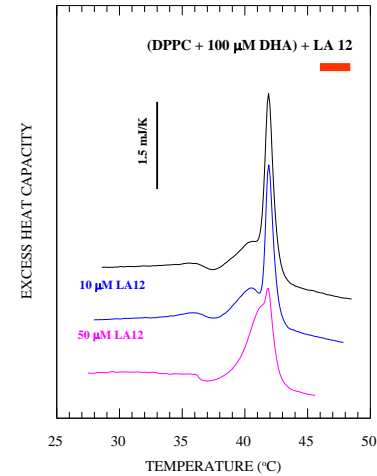
Vliv DHA

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

## Rozdíly AA + cisplatina (CP) vs LA-12



## DHA



# Výsledky - souhrn

(provedené na umělých lipozomálních strukturách využitím kalorimetrie)

**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 dále 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).



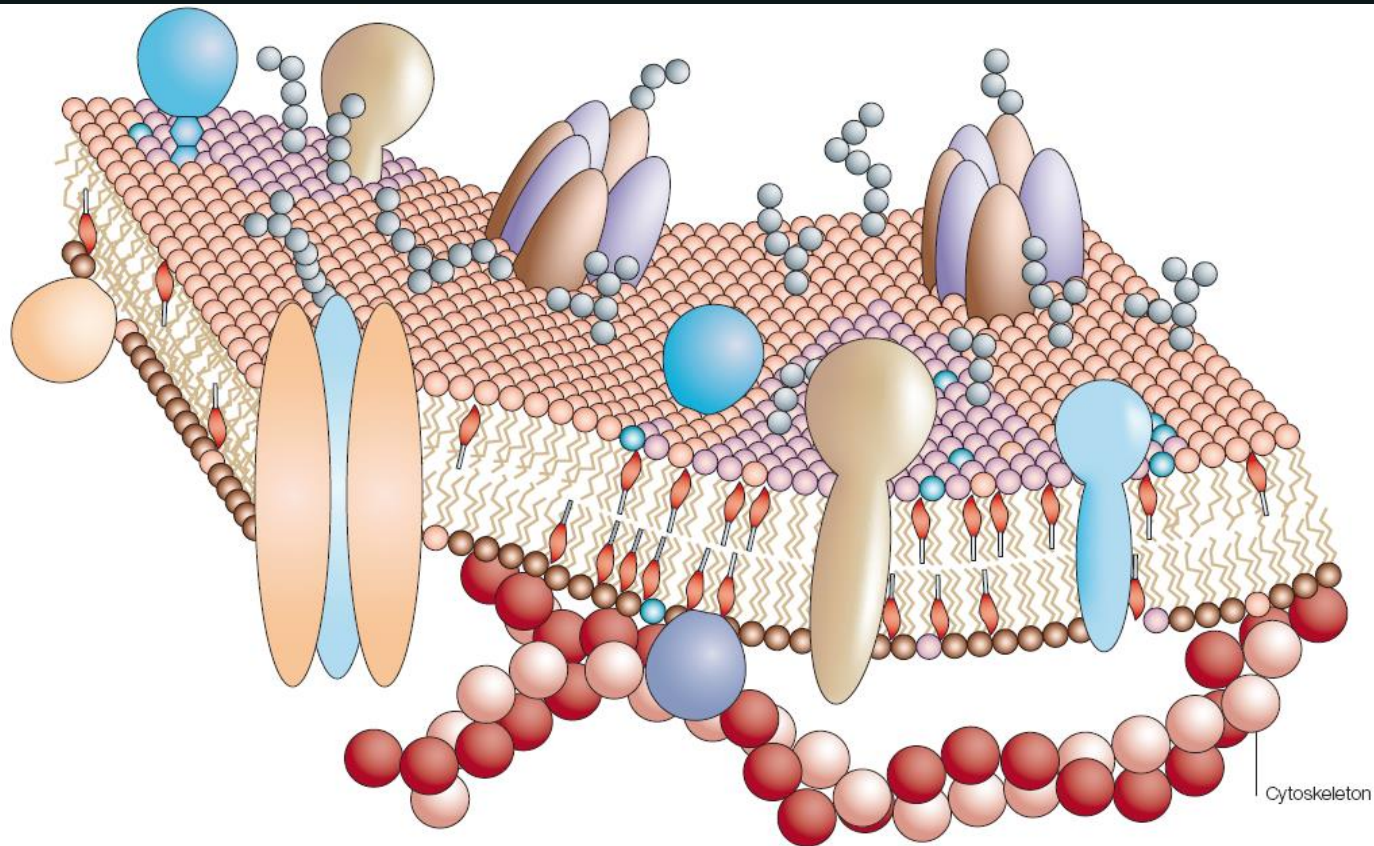


Figure 2 | **The Fluid-Mosaic-Model of the cell membrane.** Like a mosaic, the cell membrane is a complex structure made up of many different parts, such as proteins, phospholipids and cholesterol. The relative amounts of these components vary from membrane to membrane, and the types of lipids in membranes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

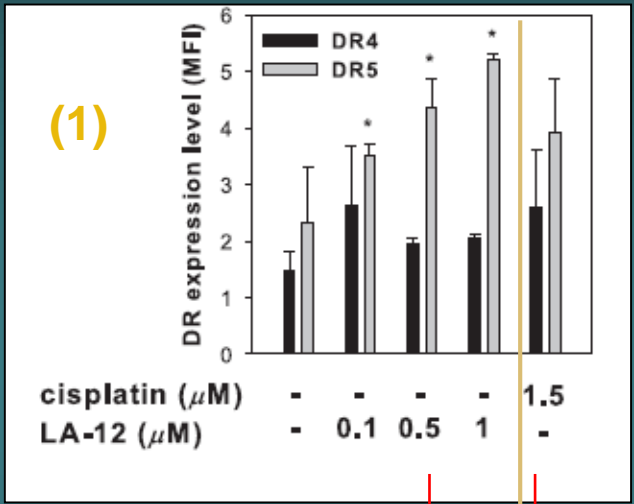
Pietzsch J et al.,  
Nature Reviews,  
October 2004

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

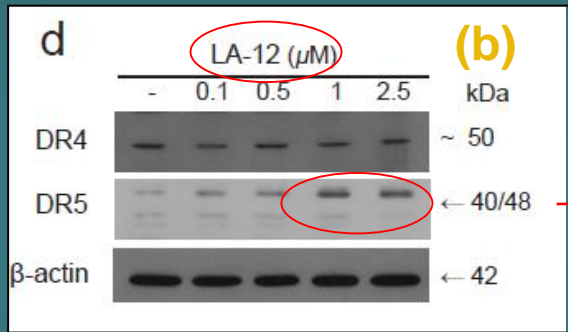
1) např. tzv. lipidových raftů – membránových lipidových mikrodomén obohacených o glykosfingolipidy a cholesterol

# LA-12 indukuje „upregulaci“ DR5, nikoli DR4 (1) na úrovni mRNA (a), i celkových povrchových proteinů (b), a zvyšuje zastoupení DR5 v lipidových raftech (2a,b)

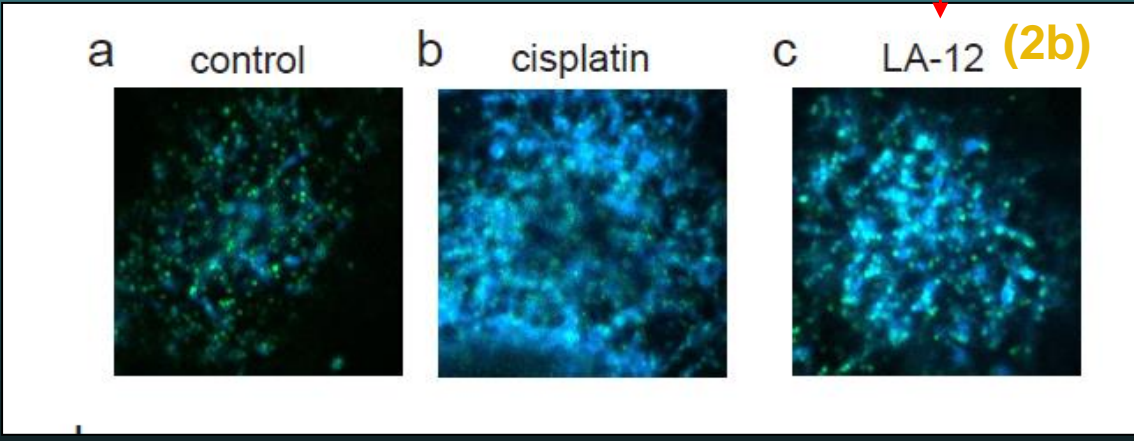
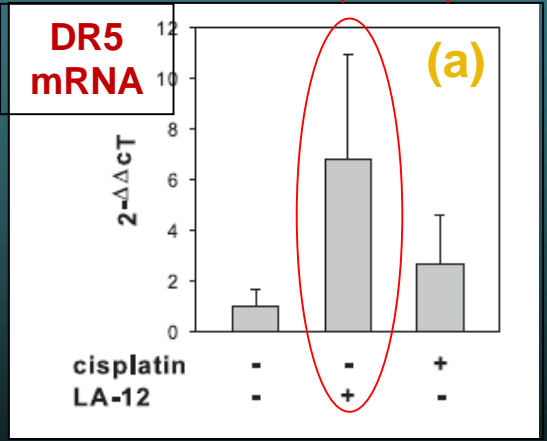
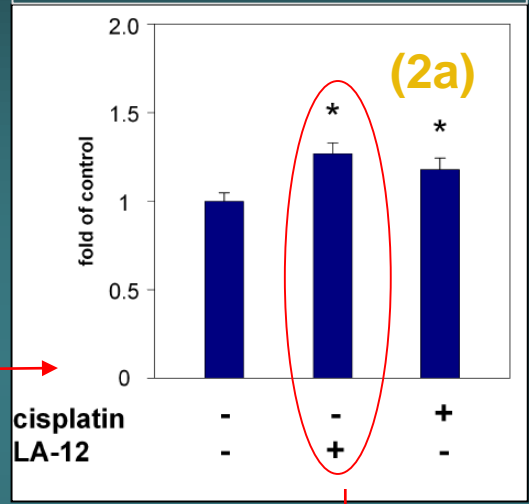
Zastoupení DR5 a DR4 v membránách — HCT 116 —



Celkové hladiny DR5




Celkové hladiny DR5 (lipidové rafty)

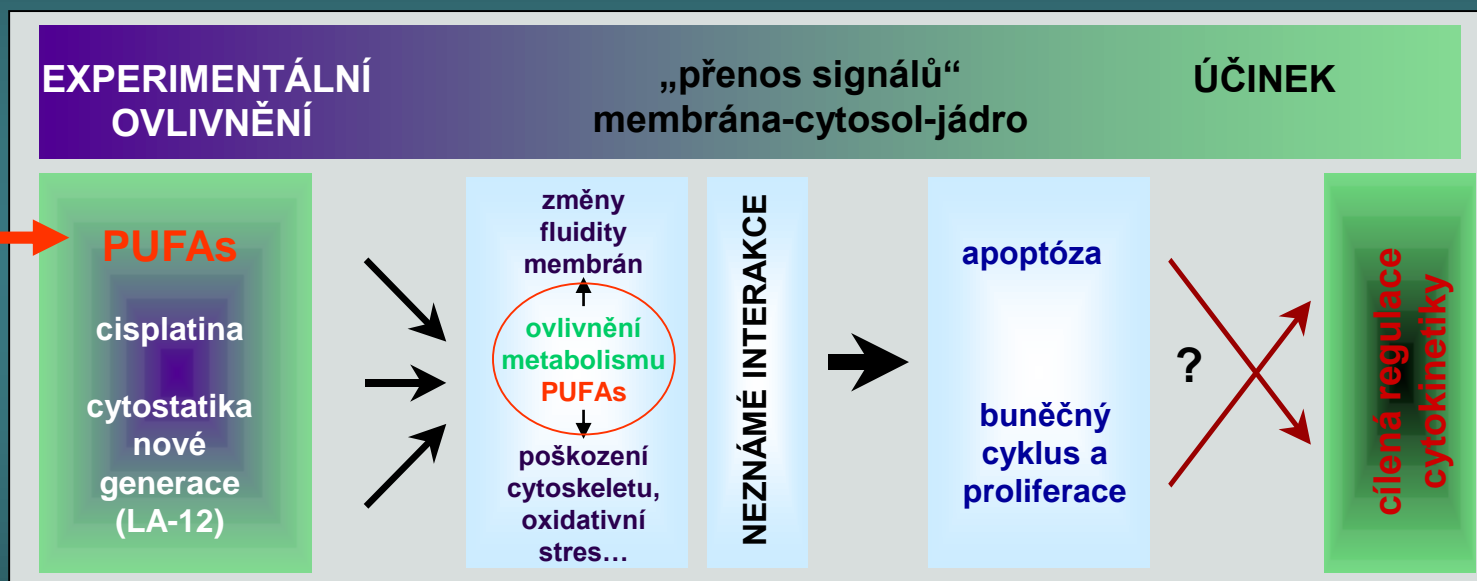


Lokalizace DR5 v lipidových raftech

# 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