

237 Indukce buněčné smrti a změn adhezivních vlastností u neadherentně kultivovaných epiteliálních buněčných linií.

Kočí L.^{1,2}, Hýžďalová M.¹, Hofmanová J.¹, Kozubík A.¹

1) Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav Akademie věd ČR, Brno

2) Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno

Zachování rovnováhy mezi procesy proliferace, diferenciace a apoptózy buněk je typické pro zdravé epiteliální buňky tlustého střeva, tato rovnováha může být narušena během karcinogeneze. Epiteliální buňky tlustého střeva jsou uvolňovány do lumen na vrcholu krypty a umírají „detachment-induces apoptosis“ (anoikis). Cytokinetické i adhezivní vlastnosti buněk tlustého střeva mohou být ovlivněny složkami potravy (např. mastné kyseliny) nebo běžně přítomnými endogenními regulátory (např. cytokiny TNF rodiny). Tyto látky mohou na jedné straně přispívat ke vzniku infekčních, zánětlivých nebo nádorových onemocnění střeva, na straně druhé mohou napomáhat při regeneraci postižené tkáně a při léčbě zmíněných chorob.

V rámci prezentovaných výsledků jsme studovali účinky butyrátu (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, která vzniká v tlustém střevě bakteriální fermentací nestravitelné vlákniny; NaBt) a apoptotických induktorů z rodiny TNF (TNF- α , Fas ligand a TRAIL) na cytokinetické parametry a adhezivní vlastnosti normálních (lidské fetální kolonové buněčné linie – FHC) a nádorových (lidská buněčná linie odvozená z adenokarcinomu tlustého střeva – HT-29) buněk v souvislosti s navozením anoikis.

Pro navození podmínek vedoucích k indukci anoikis, jsme zavedli experimentální model neadherentní kultivace buněk. Výsledky cytokinetických experimentů ukazují větší citlivost k podmínkám neadherentní kultivace u normálních buněk FHC ve srovnání s nádorovými buňkami HT-29. Dále jsme pomocí western blotové analýzy porovnávali exprese adhezivních molekul během adherentní a neadherentní kultivace buněk. Zjistili jsme, že změny v expresi těchto molekul, které ztráta kontaktu s povrchem způsobuje, jsou u normálních FHC i nádorových HT-29 buněk podobné. Během neadherentní kultivace došlo k nárůstu exprese obou studovaných integrinů $\alpha 1$ a $\alpha 2$, které jsou ve střevním epitelu nejvíce zastoupeny. Toto zvýšení exprese receptorů zprostředkujících kontakt buňky s ECM může být dáno snahou buněk zvýšit schopnost vytvoření adherentních spojů a následné adheze. Při tom celková exprese kinázy FAK, která se účastní vytvoření adherentních spojů a která je při tom aktivována, se neměnila, a exprese fosforylované formy FAK byla zvýšena pouze u adherentně kultivovaných buněk. Na druhou stranu exprese další kinázy, která se účastní adheze buněk, ILK kinázy, se během neadherentního typu kultivace mírně zvyšovala, ale pouze u HT-29 buněk. Pokud jde o expresi molekul účastnících se vazby mezi buňkami, byla při neadherentní kultivaci zvýšena exprese E-kadherinu. Zároveň byla zvýšena exprese i fosforylace (aktivace) α -catenin. Toto navýšení pravděpodobně souvisí s tendencí buněk vytvářet mezibuněčné kontakty při shlukování (tvorba tzv. sféroidů) během neadherentní kultivace.

V dalších experimentech jsme se zaměřili na sledování účinků členů rodiny TNF a NaBt na cytokinetické parametry a expresi adhezivních molekul během adherentní a neadherentní kultivace buněk FHC a HT-29. Pokud jsme neadherentně rostoucí buňky ovlivnili cytokiny z rodiny TNF nedošlo ke změně jejich počtu, ale k mírnému zvýšení procenta buněk v S-fázi buněčného cyklu. Významné bylo zvýšení počtu buněk v subG0 populaci a množství apoptotických buněk, a to zejména po působení anti-Fas. Citlivější byly k těmto změnám nádorové (HT-29) než nenádorové (FHC) buňky. Byly detekovány také rozdíly v účincích členů rodiny TNF na expresi adhezivních molekul u adherentně a neadherentně kultivovaných buněk. Za nejvýznamnější považujeme změny v expresi integrinů. V buňkách HT-29 byla exprese integrinu $\alpha 2$ během adherentní kultivace zvyšována TNF- α , anti-Fas i TRAIL, zatímco během neadherentní kultivace došlo naopak ke snížení exprese po působení anti-Fas a TRAIL. Na druhé straně u FHC buněk byla exprese integrinu $\alpha 2$ zvýšena pouze po účinku TNF- α a to u obou typů kultivací. Expresse integrinu 1 se během neadherentní kultivace po působení členů rodiny TNF spíše snižovala. Avšak u neadherentně kultivovaných buněk byla exprese tohoto integrinu zvýšena u linie HT-29 i FHC vlivem TNF- α . Expresse E-kadherinu a kinázy FAK nebyla působením TNF rodiny ovlivněna.

NaBt způsoboval u standardně kultivovaných buněk HT-29 i FHC zastavení růstu a blok v G0/G1-fázi buněčného cyklu. U neadherentní kultivace byla zpomalena proliferace pouze u nenádorových buněk FHC, zatímco zvýšení počtu buněk v G0/G1-fázi buněčného cyklu jsme pozorovali u obou použitých linií (u FHC buněk byl tento blok větší). Také snížení viability a indukce buněčné smrti NaBt byla podobná v obou typech kultivačních podmínek. Neadherující buňky však podléhaly apoptóze již po kratší době působení NaBt (24 hod). Citlivější byly k navození buněčné smrti v obou případech nádorové buňky HT-29. S využitím stejného experimentálního uspořádání byl sledován i účinek NaBt na expresi a aktivaci molekul účastnících se mezibuněčné interakce a interakce buňka-ECM. NaBt patří mezi významné induktory diferenciace epiteliálních buněk tlustého střeva. Sledovali jsme proto, jak ztráta kontaktu s povrchem během neadherentního typu kultivace ovlivňuje u buněk HT-29 a FHC schopnost diferenciace. Z výsledků měření vnitrobuněčné aktivity alkalické fosfatázy (jako ukazatele diferenciace) vyplývá, že zatímco u nádorových buněk není tato schopnost ovlivněna, u normálních buněk je během neadherentní kultivace významně snížena diferenciace navozená NaBt.

Cílem naší práce bylo ustanovit *in vitro* experimentální model neadherentní kultivace buněk u vybraných nádorových i nenádorových buněčných linií tlustého střeva. Dále analyzovat efekty působení vybraných cytokinů TNF rodiny a butyrátu sodného na expresi adhezivních proteinů a na cytokinetiku normálních i nádorových střevních epiteliálních buněk při srovnání adherentního a neadherentního typu kultivace. Výsledky potvrzují hypotézu, že endogenní regulátory jako je TNF rodina, a stejně tak slož-

XXXI. BRNĚNSKÉ ONKOLOGICKÉ DNY • XXI. KONFERENCE PRO SESTRY A LABORANTY

SIGNÁLNÍ MECHANISMY V PATOFYZIOLOGII NÁDORŮ

ky obsažené v potravě jako je NaBt, mohou modulovat signální transdukci spojenou s buněčnou adhezí a anoikis ve střevních epitheliálních buňkách.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA AV ČR KJB500040508 a GAČR 524/07/1178.