

Efekt brassinosteroidů na buněčné linie odvozené od karcinomu mléčné žlázy a prostaty.

Malíková J.¹, Swaczynová J.², Kolář Z.¹, Strnad M.²

1) Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

2) Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

a Ústav experimentální botaniky AVČR, Olomouc

Úvod

Brassinosteroidy (BRs) představují skupinu polyhydroxylových steroidních látek s povahou rostlinných hormonů, fytohormonů, které mohou nést vlastnosti regulátorů růstu a vývoje se stimulačními nebo inhibičními účinky (1). BRs byly zjištěny ve všech druzích rostlin (jednoděložných i dvouděložných), u kterých byl proveden podrobnější výzkum. Jsou hojně zastoupeny ve všech rostlinných orgánech včetně rostoucích vegetativních orgánů, ale také v pylu (2). V rostlinách jsou přítomny v extrémně nízkých koncentracích. Vnitrobuněčný obsah brassinosteroidů kolísá v závislosti na typu orgánu, stáří tkáně a druhu rostliny. BRs představují nové typy rostlinných regulátorů vyskytující se v přírodě se sedmičlenným laktonovým B kruhem. Základní strukturou jsou BRs podobné živočišným hormonům odvozených od cholesterolu (jako jsou androgeny, estrogeny a kortikoidy u obratlovců, ekdyson u hmyzu a korýšů). Současný výzkum BRs je zaměřen zejména na studium vzájemného vztahu mezi strukturou a aktivitou BRs, dále je studován vztah mezi BRs a dalšími rostlinnými hormony (3, 4, 5). O mechanismu brassinosteroidů je známo jen velmi málo, některé deriváty byly testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích a u některých se podařilo prokázat velmi výraznou cytotoxickou aktivitu.

Cíl práce

Cílem této studie bylo zjistit vliv přírodních brassinosteroidů na buněčný růst, indukci apoptózy a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony u buněčných linií odvozených od karcinomu mléčné žlázy a prostaty a zjistit případné rozdíly mezi expresí klíčových proteinů u hormonálně citlivých a hormonálně necitlivých buněk, které by napomohly lépe pochopit mechanismy nádorové progresu a perspektivně vést k vývoji účinnější terapie.

Materiál a metody

Na základě MTT-testu byl u mamárních (MCF-7 a MDA-MB-468) a prostatických (LNCaP a DU-145) nádorových buněčných linií sledován účinek 28-homocastasteronu a 24-epibrassinolidu na buněčnou viabilitu a proliferaci po dobu 6, 12 a 24 h a byla určena koncentrace IC_{50} . Pomocí průtokové cytometrie byl pozorován vliv studovaných látek na buněčný cyklus a na základě Western blot analýzy byla sledována genová exprese proteinů uplatňujících se v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Výsledky byly dále doplněny detekcí bromodeoxyuridinu inkorporovaného do DNA buněk a detekcí apoptotických buněk pomocí metody TUNEL. Lokalizace receptorů pro steroidní hormony (ER, AR, PR) byla sledována pomocí imunofluorescenční detekce.

Výsledky

Zjistili jsme, že oba typy BRs inhibují buněčnou viabilitu vybraných buněčných linií. Na základě analýzy pomocí průtokové cytometrie byla zjištěna blokáda buněk v G1 fázi buněčného cyklu u buněk MCF-7, MDA-MB-468 a LNCaP. Tyto změny v distri-

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOTERAPIE

buci buněčného cyklu byly prováděny poklesem BrdU pozitivních buněk, poklesem exprese cyklinu D₁, sníženou fosforylací pRb a zvýšenou expresí p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1}.

Oba typy brassinosteroidů podporují apoptózu u buněčné linie LNCaP, u které byly apoptotické změny doprovázené poklesem exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2, zvýšením exprese pro-apoptického proteinu Bax, poklesem exprese celkového Bid nasvědčující jeho štěpení a zvýšeným počtem TUNEL pozitivních buněk. Dále byly detekovány aktivní fragmenty caspázy-3 po ovlivnění buněk LNCaP testovanými látkami, které vznikly štěpením neaktivní formy pro-caspázy-3. U ostatních buněčných linií nebyly zaznamenány signifikantní změny nasvědčující indukci apoptózy.

U buněčné linie MCF-7 citlivé na estrogény byly pomocí imunofluorescenční detekce a Western blot analýzy zjištěny změny lokalizace androgenového receptoru (AR) a estrogenového receptoru (ER- α , - β) doprovázené poklesem exprese proteinu ER- α po 12 a 24 h působení testovaných látek. U buněčné linie LNCaP citlivé na androgeny byla prokázána snížená exprese AR v jádrech buněk ovlivněných brassinosteroidy a zároveň byl zaznamenán pokles hladiny AR po 12 h působení látek. Při sledování exprese ER- α a - β u buněk LNCaP byla zjištěna u kontrolních buněk cytoplazmatická exprese. Po ovlivnění buněk brassinosteroidy nebyla zjištěna žádná změna exprese ani jednoho typu estrogenových receptorů vzhledem ke kontrolním buňkám.

Závěr

Na základě této práce jsme charakterizovali účinek brassinosteroidů na buněčné linie odvozené od karcinomu mléčné žlázy a prostaty. Zjistili jsme, že tyto látky mají schopnost u všech linií inhibovat buněčnou proliferaci a vyvolat změny buněčného cyklu a hladin některých proteinů regulujících buněčný cyklus. U buněčné linie závislé na androgenech tyto látky indukovaly apoptózu pravděpodobně prostřednictvím mitochondriální cesty aktivace. U hormonálně závislých linií způsobovaly změny v lokalizaci a expresi některých jaderných receptorů pro steroidní hormony. Na základě našich výsledků lze efekt testovaných brassinosteroidů přirovnat k antagonistům receptorů pro steroidní hormony. Výsledky by mohly přispět k potenciálnímu terapeutickému užití studovaných látek.

Literatura

1. Szekeres M, Nemeth K, Koncz Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J and Koncz C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis, Cell 1996;85:171-82.
2. Kim SK, Chang SC, Lee EJ, Chung WS, Kim YS, Hwang S, Lee JS. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. Plant Physiol 2000;123:997-1004.
3. Brosa C, Zamora I, Terricabras E, Soca L, Peracaula R, Rodriguez-Santamarta C. Synthesis and molecular modeling: related approaches to progress in brassinosteroid research. Lipids 1997;32:1341-7.
4. Back TG, Baron DL, Luo W, Nakajima SK. A concise, improved procedure for the synthesis of brassinolide and some novel side chain analogues. J Org Chem 1997;62:1179-82.
5. Back TG, Janzen L, Nakajima SK, Pharis RP. Effect of chain length and ring size of alkyl and cycloalkyl side-chain substituents upon the biological activity of brassinosteroids. Preparation of novel analogues with activity exceeding that of brassinolide. J Org Chem 2000;65:3047-52.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem MSM 6198959216.