



ROZPRAWA DOKTORSKA

Natalia Lisiak

***Badanie mechanizmu działania pochodnych kwasu oleanolowego
w komórkach raka piersi***

Activity of oleanolic acid derivatives in breast cancer cells

Poznań, 2013

Słowa kluczowe: triterpeny, apoptoza, autofagia, migracja, rak piersi

***Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu***

Promotor: Prof. dr hab. Maria Rybczyńska

*Praca naukowa finansowana ze środków na badania własne w latach 2010-2011,
jako projekt badawczy nr 501-02-03318432-02496-50556*

*oraz z funduszy przyznanych na realizację projektu badawczego przez Narodowe
Centrum Nauki; numer umowy: 2011/01/N/NZ4/03433.*

*Pani prof. dr hab. Marii Rybczyńskiej za
cenne wskazówki podczas pisania
niniejszej rozprawy, poświęcony czas,
przyjazną atmosferę i życzliwą pomoc*

*Panu dr Mariuszowi Kaczmarkowi za
pomoc w wykonaniu oznaczeń
cytofluorometrycznych*

*Wszystkim moim wspaniałym Koleżankom
i Koledze z Katedry Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Molekularnej za życzliwą
pomoc oraz nieocenione wsparcie*

SERDECZNIE DZIĘKUJĘ

***Pracę dedykuję
mojej kochanej Rodzinie***

Spis treści

Spis treści	7
1. WSTĘP	13
1.1. Aktywność biologiczna kwasu oleanolowego i jego pochodnych.....	13
1.2. Kluczowe białka zaangażowane w proces apoptozy.....	16
1.3. Mechanizm i regulacja autofagii	18
1.4. Rola apoptozy i autofagii w procesie nowotworzenia	26
1.5. Apoptoza i autofagia - wzajemne relacje między ścieżkami śmierci komórki	30
1.6. Charakterystyka wybranych białek związanych z migracją komórek nowotworowych	33
1.6.1. Kinaza ognisk adhezji – FAK	34
1.6.2. Rodzina integryn i podjednostka $\beta 1$	36
1.6.3. Paksylina.....	37
2. CEL PRACY	39
3. MATERIAŁY I METODY.....	40
3.1. Podłoża, bufony, odczynniki, przeciwciała	40
3.2. Badane związki	44
3.3. Linie komórkowe.....	46
3.4. Przeżywalności komórek nowotworowych.....	47
3.5. Cykl komórkowy	47
3.6. Uzyskiwanie lizatów komórkowych	48
3.7. Liza z frakcjonowaniem elementów subkomórkowych	48
3.8. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford.....	48
3.9. Elektroforeza, Western blot, immunoidentyfikacja	49
3.10. Immunofluorescencja	49
3.11. Inwazyjność komórek nowotworowych (BD BioCoat Tumor Invasion System)	50
3.12. Migracja komórek z wykorzystaniem scratch test	50
3.13. Analiza statystyczna	50

4. WYNIKI	51
4.1. Wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na przeżywalność komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego	51
4.2. Wpływ OA, Br-HIMOLID i HIMOXOL na cykl komórkowy komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego	55
4.3. Wpływ HIMOXOL na poziom białek związanych z procesem apoptozy w komórkach MDA-MB-231	57
4.4. Wpływ OA, Br-HIMOLID i HIMOXOL na indukcję autofagii w komórkach prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego	59
4.4.1. Ocena obecności i lokalizacji autofagosomów - mikroskopia konfokalna	59
4.4.2. Analiza poziomu białek zaangażowanych w mechanizm autofagii w komórkach raka piersi	63
4.5. Wpływ Br-HIMOLID i HIMOXOL na migrację komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego	65
4.5.1. Ocena migracji komórek MCF-12A, MCF7 i MDA-MB-231.....	65
4.5.2. Wpływ na inwazję komórek raka piersi.....	68
4.5.3. Wpływ na poziom białek zaangażowanych w proces migracji komórek nowotworowych.....	69
4.6. Wpływ Br-HIMOLID i HIMOXOL na poziom MAP kinaz w komórkach raka piersi	71
4.7. Wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na poziom czynników transkrypcyjnych.....	72
5. Dyskusja	75
6. Wnioski.....	85
7. Piśmiennictwo.....	86
8. Streszczenie	99
9. Abstract.....	101

WYKAZ SKRÓTÓW

AIF – czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)

ATG - geny związane z autofagią (ang. *autophagy related genes*)

AMPK - kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)

Apaf-1 – czynnik 1 aktywujący apoptotyczną proteazę (ang. *apoptotic protease activating factor 1*)

BECN1 – beklina 1

BH – domena homologiczna do Bcl-2 (ang. *Bcl-2 homology*)

Bif-1 - czynnik oddziałujący z Bax (Bif-1) (ang. *Bax-interacting factor 1*)

Br-HIMOLID - 28→13 lakton kwasu 12 α -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego, pochodna laktonowa kwasu oleanolowego

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumine*)

CAM - komórkowe cząsteczki adhezyjne (ang. *cellular adhesion molecule*)

CCD – domena centralna superhelisa (ang. *coiled coil domain*)

CDDO - kwas 2-cjano-3,12-diooksoolean-1,9-dien-28-owy

c-FLIP – komórkowe FLICE-podobne białko hamujące (ang. *Cellular FLICE-like inhibitory protein*)

COX-2 – cyklooksigenaza 2

DAPK-1- kinaza białkowa związana ze śmiercią (ang. *death-associated protein kinase*)

DD – domena śmierci (ang. *death domain*)

DED – efektorowa domena śmierci (ang. *death effector domain*)

DIOXOL - ester metylowy kwasu 3,11-diooksoolean-12-en-28-owego, pochodna diketonow kwasu oleanolowego

DISC – kompleks sygnałowy indukujący śmierć (ang. *death-inducing signaling complex*)

DMSO - dimetylosulfotlenek

DRAM - regulowany zniszczeniem modulator autofagii (ang. *damage-regulated autophagy modulator*)

ECD – ewolucyjnie zachowana domena (ang. *evolutionary conserved domain*)

ECL – wzmacniona chemiluminescencja (ang. *Enhanced chemiluminescence*)

ECM – matriks zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)

EGFR – receptor epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

ER – receptor estrogenowy (ang. *estrogen receptor*)

ER – retikulum endoplazmatyczne

FADD – domena śmierci sprzężona z Fas (ang. *Fas-Associated protein with Death Domain*)

FAK – kinaza ognisk adhezji (ang. *focal adhesion kinase*)

FAT - region uczestniczący w ogniskowym przyleganiu

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

FERM - region aminowy kinazy ognisk adhezji

FITC – izotiocyanian fluoresceiny

FLICE – kaspaza-8 (ang. *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme*)

FLIP – białko hamujące FLICE (ang. *FLICE-inhibitory protein*)

FRNK – nie kinazowy fragment FAK (ang. *FAK related non-kinase*)

GABARAP - białko towarzyszące receptorowi kwasu γ -aminomasłowego typu A (ang. *Gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein*)

GAPDH - dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GATE-16 - białko uczestniczące w transporcie białek wewnątrz aparatu Golgiego (ang. *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*)

GRB2 – białko adaptorowe (ang. *Growth Factor Receptor-Bound 2*)

hEGF – ludzki epidermalny czynnik wzrostu (ang. *human epidermal growth factor*)

HIF-1 α – czynnik indukujący hipoksję 1 alfa (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*)

HIMOXOL - ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-11-oksoolean-12-en-28-owego, pochodna oksymowa kwasu oleanolowego

HIMOXAZOL - ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-12-okso-12a-aza-C-homoolean-28-owego, pochodna laktamowa kwasu oleanolowego

IAP - inhibitor białek apoptozy (ang. *inhibitory apoptosis protein*)

IKK - kinaza I κ B (ang. *I κ B kinase*)

I κ B – inhibitor NF κ B (ang. *Inhibitor NF κ B*)

ILK – kinaza związana z integryną (ang. *integrin-linked kinase*)

INF- α – interferon α

iNOS – indukowana syntaza tlenku azotu (ang. *Inducible nitric oxide synthase*)

JNK – kinaza C-Jun N-końcowa (ang. *c-Jun N-terminal kinase*)

LAMP-2a – białko związane z błoną lizosomu (ang. *lysosomal-associated membrane protein - 2a*)

LD – domeny bogate w leucynę

LD9-4 - 3β-O-succinyl-lupeol

LIM - fragment C-końcowy paksyliny, który zawiera cztery domeny Lin-11, Isl-1, Mec-3

LIR – region oddziałujący z LC3 (ang. *LC3-interacting region*)

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. *mitogen activated protein kinase*)

MAP LC3 – łańcuch lekki 3 białka związanego z mikrotubulami (ang. *microtubule associated protein light chain 3*)

MLC – kinaza lekkiego łańcucha miozyny (ang. *myosin light chain*)

MMP – metaloproteinazy matriks (ang. *matrix metalloproteinase*)

mTOR – ssące białko docelowe dla rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycine*)

mTORC1 – kompleks mTOR, zbudowany z mTOR oraz białek Raptor i mLST8/GbL

mTORC2 – kompleks mTOR zbudowany z mTOR oraz białek Rictor i mLST8/GbL

MTT - bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowy

NG - (O(2)-(2,4-dinitro-5-{{2-(12-en-28-β-D-galactopyranosyl-oleanolate-3-yl)-oxy-2 oxoethyl} amino} phenyl)1-(N-hydroxyethylmethylamino) diazen-1-ium-1,2-diolate)

NES - sygnał eksportu jądrowego (ang. *nuclear export signal*)

NFκB – czynnik jądrowy kappa B (ang. *nuclear factor kappa B*)

NO – tlenek azotu

NSF – białko fuzyjne wrażliwe na N-metylomaleimid (ang. *N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion*)

OA - kwas oleanolowy (ang. *oleanolic acid*)

P – fosforylacja

p19 ARF – białko regulujące p53

PARP - polimeraza poli(ADP-rybozy) (ang. *poli(ADP-ribose) polymerase*)

c-PARP – przecięty PARP (ang. *cleaved PARP*)

PAS – struktura preautofagosomalna (ang. *preautophagosomal structure*)

PDCD4 – białko programowanej śmierci komórki 4 (ang. *programmed cell death protein 4*)

PDGF- płytkowopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)

PDK - kinaza białkowa zależna od fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide-dependent kinase*)

PE - fosfatydyloetanoloamina (ang. *phosphatidylethanolamine*)

PI3K - kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)

PIP3 – fosfatydyloinozytolotrifosforan (ang. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

PLC γ – fosfolipaza C gamma (ang. *phospholipase-C- γ*)

PTEN - homologi fosfatazy i tensyny (ang. *phosphatase and tensin homolog*)

PTF- α – plejotropowy czynnik alfa (ang. *pleiothropic factor α*)

RhoGEF - strukturalna domena czynników wymiany nukleotydu guaniny dla GTP-azo podobnych Rho/Rac/Cdc42

SNARE – białko transbłonowe (ang. *soluble NSF-attachment protein receptor*)

Src – białkowa kinaza tyrozynowa

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*)

TLR – receptor Toll podobny (ang. *Toll like receptor*)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α*)

TNFR – receptor czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor receptor*)

TPA - tkankowy antygen polipeptydowy (ang. *tissue polipeptide antigen*)

TPM1 - tropomiozyna 1 (ang. *tropomyosine 1*)

TRADD – białko wzmacniające z powinowactwem do domeny śmierci receptora TNF- α (ang. *tumor necrosis factor (TNF)-receptor 1-associated death domain protein*)

TRAIL - ligand czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

UVRAG – produkt genu związanego z opornością na promieniowanie ultrafioletowe (ang. *UV radiation resistance-associated gene protein*)

VLA – bardzo późne antygeny (ang. *very late antigen*)

Vps15 – kinaza serynowa p150

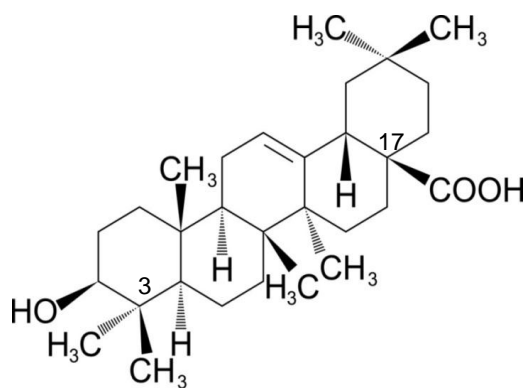
Vps34 – kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K)

1. WSTĘP

O wielkiej mocy leczniczej związków naturalnego pochodzenia donoszą najstarsze teksty medyczne. "Niech pożywienie będzie twoim lekarstwem, a lekarstwo pożywieniem", głosił Hipokrates (460-370 p.n.e.). Ogromna chemiczna różnorodność występujących w przyrodzie związków, w połączeniu z długoletnią biologiczną selekcją, przyniosła ogrom niezbadanych, unikalnych struktur chemicznych cechujących się aktywnością biologiczną. Prawie połowa stosowanych obecnie w terapii przeciwnowotworowej leków jest pochodzenia naturalnego, bądź są to pochodne tychże substancji (Lucas D.M., i wsp. 2010). Do grupy takich związków należą triterpeny, produkty cyklizacji skwalenu składającego się z sześciu pięciowęglowych jednostek izoprenowych (Yadaw V.R. i wsp., 2010). Ze względu na różnicę w położeniu grupy metylowej, wyróżniamy wiele typów triterpenów, z których trzy najczęściej występujące to oleananu, ursanu i lupanu. Związki należące do tej grupy są wszechobecne w królestwie roślin. Ostatnie doniesienia potwierdzają korzystne działanie naturalnie występujących triterpenów względem wielu typów ludzkich chorób, w tym nowotworów. Potencjał przeciwnowotworowy oraz ich aktywność przeciwzapalna, antyproliferacyjna i proapoptotyczna została dowiedziona zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Badania wskazują na różne mechanizmy działania triterpenów, m.in. poprzez regulację czynników transkrypcyjnych i czynników wzrostu, cytokiny prozapalne, wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału zaangażowane w proliferację, apoptozę i angiogenezę komórek nowotworowych (Patlolla J.M. i Rao C.V., 2012).

1.1. Aktywność biologiczna kwasu oleanolowego i jego pochodnych

Wśród triterpenów, ze względu na wysoką aktywność farmakologiczną, ważne miejsce zajmuje kwas oleanolowy (OA). Ten naturalny triterpen, występując w postaci wolnej, w swojej strukturze posiada ugrupowanie $-OH$ w pozycji C3 oraz $-COOH$ w pozycji C17. Znacznie częściej występuje jednak w postaci glikozydów, wówczas cząsteczka cukru lub łańcuch cukrowy jest dołączony do grupy hydroksylowej oraz w postaci glikozydoestrów, gdy cukier lub łańcuch cukrowy jest dołączony do grupy karboksylowej. Część cukrowa może tworzyć monodesmoyd bądź bisdesmoyd (Chołuj A. i Janiszowska W., 2005; Sun H.X. i wsp., 2006). Strukturę chemiczną kwasu oleanolowego przedstawia rycina. 1.



Rycina 1. Wzór strukturalny kwasu oleanolowego.

Badania nad aktywnością biologiczną kwasu oleanolowego wskazują na jego szeroki zakres działania, m.in. przeciwzapalne, cytotoksyczne, antymutagenne, hepatoprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, hemolityczne, antywirusowe, antibakteryjne oraz pierwotniakobójcze (Sultana N. i Ata A., 2008; Patlolla J.M. i Rao C.V., 2012). Doniesienia kilku ostatnich lat wskazują, że kwas oleanolowy oraz jego niektóre pochodne, poprzez hamowanie promocji i różnicowania komórek nowotworowych oraz inhibicję procesu angiogenezy, wykazują aktywność przeciwnowotworową (Resende F.A. i wsp., 2006). Właściwości te polegają na indukowaniu sekrecji tlenku azotu i czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) przez makrofagi oraz są spowodowane aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF κ B (Chojnicka I. i Janiszowska W., 2007). Aktywność przeciwnowotworowa OA jest związana także z działaniem proapoptotycznym, poprzez wzrost aktywności kaspazy-3 i kaspazy-8 w komórkach. Ponadto wykazano, że związek ten hamuje adhezję komórek i obniża poziom ICAM-1 (Yan S.L. i wsp., 2009).

Dzięki swojemu rozpowszechnieniu w świecie roślin kwas oleanolowy jest tanim i łatwo dostępnym związkiem. Natomiast obecność grupy karboksylowej, hydroksylowej oraz podwójnego wiązania stwarza wiele możliwości modyfikacji jego struktury podstawowej (Sporn M.B. i wsp., 2011). W piśmiennictwie światowym w latach 1998-2012 ukazały się prace opisujące modyfikacje struktury OA, zwiększające jego aktywność przeciwnowotworową. W 1998 r. Honda i współpracownicy przeprowadzili badania nad aktywnością ok. 60 zmodyfikowanych pochodnych kwasu oleanolowego i ursolowego, różniących się między sobą obecnością jednej lub dwóch grup ketonowych, wolną bądź zablokowaną grupą COOH oraz liczbą i miejscem występowania wiązań podwójnych w pierścieniach. Zbadano korelację pomiędzy strukturą zsyntetyzowanych triterpenoidów a ich wpływem na produkcję NO indukowaną interferonem α (INF- α) w makrofagach myszy. 9 spośród 60 związków wykazało

aktywność hamującą proliferację, przy równocześnie niskiej toksyczności (Honda T. i wsp., 1998). Badania pokazały również, że spośród pochodnych OA, zmodyfikowanych w pozycji C2, najwyższą aktywnością charakteryzował się kwas 2-cjano-3,12-diooksoolean-1,9-dien-28-owy (CDDO). Udowodniono, że pochodna cjanowa OA hamuje syntezę indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz cyklooksigenazy 2 (COX-2) w makrofagach myszy, a także proliferację wielu ludzkich linii nowotworowych (Honda T. i wsp., 1999). Ponadto wprowadzenie grupy cjanowej indukuje apoptozę względem komórek ostrej białaczki mieloidalnej, raka piersi oraz raka płuc (Ahmad R. i wsp., 2008; Liby K. i wsp., 2008) oraz aktywuje autofagię w komórkach białaczkowych KBM5 (Samudio I. i wsp., 2008). Indukcję autofagii z udziałem Bekliny 1 zaobserwowano w potraktowanych 3 β -O-succinyl-lupeol-em (LD9-4) komórkach raka płuc, A549 (Hao J. et al., 2011). Działanie cytotoksyczne *in vitro* wykazały pochodne OA: metyloglukuronozyd oraz kwas 3 β - [(α -L-arabinopiranozylo)-oksy]-23-hydroksyolean-12-en-28-owy. Ponadto dowiedziono, że kwas mazlinowy, czy jego prekursor, β -amyryna, zatrzymują proliferację ssaczych komórek poprzez inhibicję aktywności polimerazy DNA α i β oraz topoizomerazy II (Mizushina Y. i wsp., 2003). Jedną z ostatnich publikacji przedstawia nową pochodną kwasu oleanolowego, DIOXOL (ester metylowy kwasu 3,11-diooksoolean-12-en-28-owego). Aktywność tego związku zbadano w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej CCRF oraz w komórkach CCRF VCR1000 i CCRF ADR5000, z indukcją nadekspresji genu oporności wielolekowej ABCB1. Badania te, przeprowadzone w Katedrze chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, wykazały zdolność nowej pochodnej OA do obniżania przeżywalności komórek, obniżania ekspresji genu ABCB1 oraz zdolność hamowania funkcji transportowej produktu tego genu. Udowodniono, że DIOXOL może pełnić funkcję chemouwrażliwacza, zdolnego odwrócić zjawisko oporności wielolekowej (Paszel A. i wsp., 2011).

Przykładem aktywności biologicznej prezentowanej przez inną modyfikację struktury OA są badania przeprowadzone w 2011 roku przez Hua Y. i współpracowników, którzy oceniali wpływ dekstrozowej pochodnej kwasu oleanolowego – Dex-OA na komórki kostniako-mięsaka myszy. Okazało się, że pochodna ta hamuje proliferację komórek poprzez indukcję apoptozy. Wykazano również, że może hamować rozrost komórek nowotworowych oraz zmniejszyć przerzuty do płuca *in vivo* (Hua Y. i wsp., 2011).

Jednym z ostatnich odkryć jest pochodna OA, związek o nazwie NG (O(2)-(2,4-dinitro-5-[[2-(12-en-28- β -D-galactopyranosyl-oleanolate-3-yl)-oxy-2-oxoethyl]amino]phenyl)-1-(N-hydroxyethylmethyl-amino)diazen-1-ium-1,2-diolate), wykazujący aktywność przeciwnowotworową w komórkach raka wątroby zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Mechanizm tego działania

polega na aktywacji ścieżki mitochondrialnej apoptozy, z regulacją przez reaktywne formy tlenu oraz kinazy MAP (JNK i p38) (Liu L. i wsp., 2012).

1.2. Kluczowe białka zaangażowane w proces apoptozy

Apoptoza pełni kluczową rolę w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych. Umożliwia precyzyjną kontrolę liczby i rodzaju komórek w czasie ontogenezy i organogenezy. Dzięki niej możliwa jest eliminacja wytworzonych w nadmiarze komórek embrionalnych oraz usunięcie komórek uszkodzonych w takim stopniu, że ich przeżycie byłoby niekorzystne dla organizmu. Apoptoza odgrywa także ważną rolę w przebiegu wielu chorób. Zaburzenia procesu programowanej śmierci komórek typu I towarzyszą chorobom nowotworowym, degeneracyjnym, alergiom oraz przewlekłym stanom zapalnym (Ham T.J. i wsp., 2010; Gogvadze V., 2011).

Proces apoptozy może zostać zainicjowany w dwojaki sposób: poprzez ligację receptorów śmierci w błonie plazmatycznej (ścieżka receptorowa, zewnętrzna), bądź uwolnienie czynników apoptogennych z mitochondrium (ścieżka wewnętrzna, mitochondrialna) (Thorburn A., 2008).

W drodze zewnątrzpochodnej, stymulacja receptorów rodziny czynnika martwicy nowotworu, TNFR (FAS/CD95, TNFR1, DR3 i receptory TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): DR4, DR5) w wyniku powiązania z odpowiednimi ligandami, prowadzi do połączenia wewnątrz błonowej części receptora poprzez domeny śmierci DD (death domain) z białkami adapterowymi TRADD i FADD. Poprzez efektorowe domeny śmierci DED (death effector domain) białka adaptorowe łączą prokaspazy 8 i 10, których aktywacja prowadzi do inicjacji apoptozy w wyniku bezpośredniej proteolizy prokaspaz efektorowych (3, 6 lub 7) (rycina 2) (Favaloro B. i wsp., 2012).

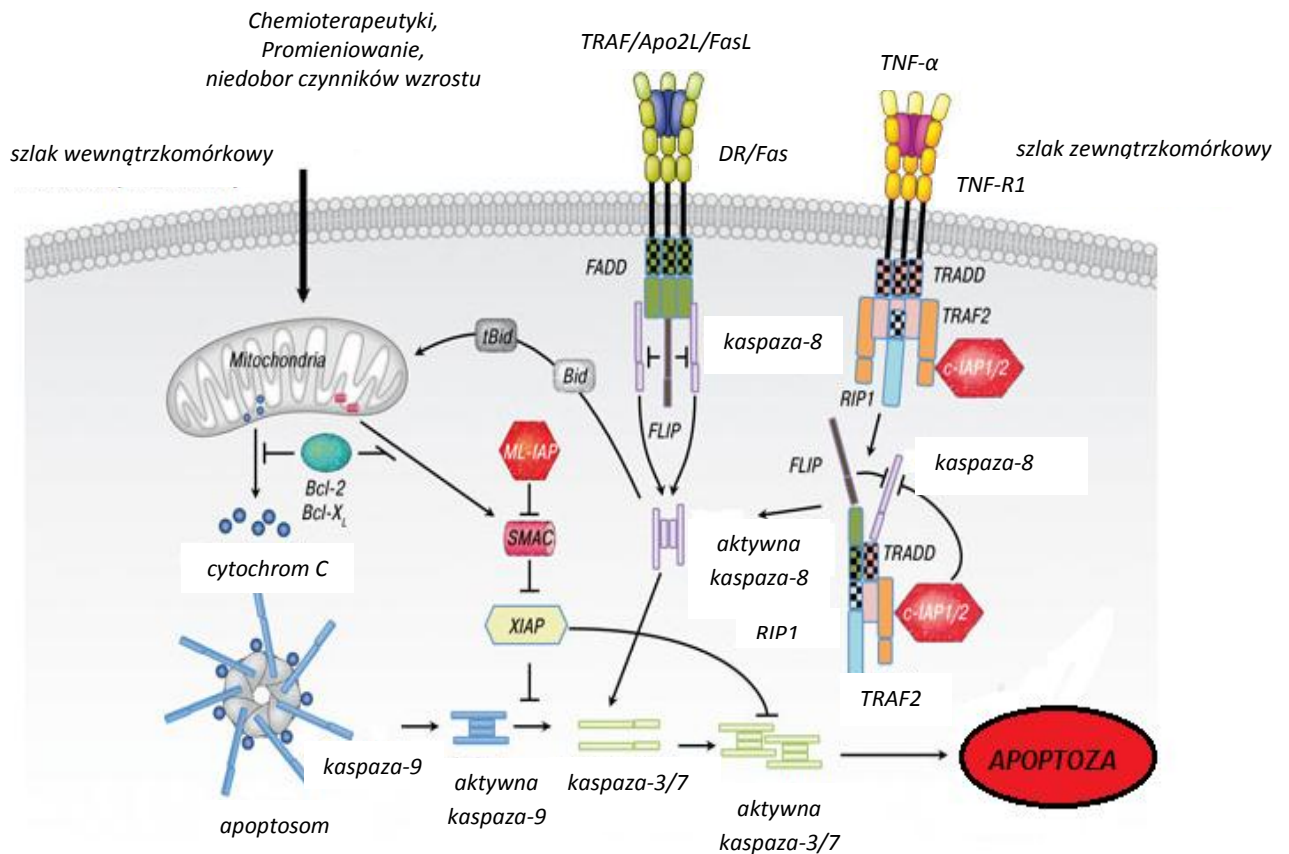
Ścieżka mitochondrialna ulega inicjacji poprzez sygnały stresu w wyniku uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium czynników apoptogennych (cytochrom c, Smac/DIABLO, AIF). Bodźce indukujące wewnątrzpochodny szlak apoptozy powodują zaburzenia potencjału błonowego oraz zwiększają przepuszczalność błony mitochondrium. W następstwie tych przemian powstaje obrzęk i dochodzi do pęknięcia błony mitochondrialnej oraz uwolnienia poprzez kanały utworzone z udziałem białek z rodziny Bcl-2, cytochromu c do cytozolu. Powoduje to formację kompleksu zawierającego apoptosom, w skład którego wchodzi cytochrom c, ATP oraz cytozolowe białko Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Utworzenie tego kompleksu jest niezbędne do autoproteolizy prokaspazy-9, bezpośredniego

aktywatora kaspazy 3. Smac/DIABLO poprzez neutralizację hamującego efektu inhibitora białek apoptozy (IAP) promuje aktywację kaspaz, podczas gdy nadekspresja czynnika indukującego apoptozę (AIF) sprzyja procesom kondensacji chromatyny obwodowej w jądrze, fragmentacji DNA na odcinki długości 50 kb, translokacji fosfatydyloseryny w błonie komórkowej, jak również spadkowi potencjału błonowego mitochondrium (rycina 2) (Dlamini Z. i wsp., 2004; Monian P. i Jiang X., 2012; Reubold T.F. i Eschenburg S., 2012).

Kluczowymi białkami zaangażowanymi w proces apoptozy są białka rodziny Bcl-2 wykazujące wysoką homologię w tzw. regionach BH (Bcl-2 homology). Białka te podzielono na trzy podrodziny. Do grupy pierwszej należą białka Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, A1, BHRF, działające jako represory śmierci (jest to podrodzina białek anty-apoptotycznych) i posiadające cztery domeny BH (BH₁₋₄). Przedstawiciel tej grupy białek, Bcl-2, hamuje uwolnienie cytochromu c i apoptogennych proteaz z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy (Kelly P.N., Strasser A., 2011).

Kolejne dwie grupy należą do białek proapoptotycznych:

- podrodzina białek Bax: Bax, Bak, Bok, posiadających trzy domeny BH (BH₁₋₃).



Rycina 2. Ścieżka receptorowa i mitochondrialna procesu apoptozy (wg. de Almagro M.C., Vucic D., 2012).

Uwolnienie tych białek z kompleksów z białkami podrodziny Bcl-2 indukuje zmiany w błonie mitochondrialnej, prowadzące do uwolnienia białek proapoptotycznych (cytochrom c, Smac/Diablo), co z kolei powoduje proteolityczną aktywację kaspaz i prowadzi do śmierci komórki;

- podrodzina białek wykazujących homologię tylko w obrębie domeny BH₃, tzw. BH3-only: Bad, Bim, Bik, Bmf, Bnip3, Bnip3L, Hrk, Noxa, Puma, Beklina 1, Spike. Białka te mogą bezpośrednio aktywować białka typu Bax lub neutralizować antyapoptotyczne białka podrodziny Bcl-2 (Chonghaile T.N. i Letai A., 2008; Gavathiosis E. i wsp., 2008).

Do kolejnej grupy białek, odgrywających istotną rolę w apoptozie, należą kaspazy, proteazy cysteinowe, które występują w komórkach jako nieaktywne prekursorzy enzymów, czyli zymogeny. Po odebraniu sygnału apoptotycznego, proenzymy ulegają proteolizie, w wyniku czego powstaje aktywny enzym. W oparciu o budowę, długość prodomen białka, kaspazy można podzielić na 3 grupy- kaspazy z prodomena długą, która zawiera tzw. domenę śmierci, określane jako kaspazy prozapalne (kaspaza-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) oraz kaspazy inicjatorowe apoptozy (kaspaza-2, -8, -9, 10). Trzecią grupę stanowią kaspazy z krótką prodomeną, nazywane efektorowymi bądź egzekutorowymi (-3, -6, -7) (Ollson M., Zhivotovsky B., 2011). Innym równie ważnym białkiem, regulującym śmierć apoptotyczną komórki, jest PARP, czyli polimeraza poli(ADP-rybozy). Jest to białko o masie 113 kDa, pełniące funkcję enzymu naprawczego DNA, uruchamianego w wyniku pęknięć podwójnej nici. Proteolityczne cięcie PARP przez kaspazę-3 bądź 7 prowadzi do inaktywacji PARP oraz hamuje jego zdolności naprawcze DNA, co indukuje śmierć komórki. W związku z tym przecięty PARP (cPARP) jest uważany za marker apoptozy (Agarwal A. i wsp., 2009).

1.3. Mechanizm i regulacja autofagii

Termin autofagia pochodzi z języka greckiego, w którym oznacza: „*auto*” (samo), „*phagy*” (zjadanie). Odnosi się do wysoce konserwatywnego, starego filogenetycznie procesu, służącego degradacji uszkodzonych organelli, elementów cytoplazmy oraz białek o długim okresie półtrwania. Proces ten zachodzi z udziałem lizosomów, a jego występowanie zaobserwowano w komórkach drożdży, roślin i ssaków (Liu B. i wsp., 2010; Levine B. i wsp., 2011; Wang Ch. i wsp., 2011).

Celem autofagii jest utrzymywanie homeostazy w komórce, zapewniając równowagę pomiędzy produkcją a degradacją elementów komórkowych. Jednakże proces ten może również doprowadzać do całkowitej destrukcji komórki. W związku z tym autofagia określana jest mianem programowanej śmierci komórki typu II (Qu X. i wsp., 2007). Ten typ śmierci komórki charakteryzuje się brakiem fragmentacji jądra, częściową kondensacją chromatyny, degradacją elementów subkomórkowych: polirybosomów, retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Jest to proces niezależny od kaspaz, przebiegający z podwyższoną aktywnością enzymów lizosomanych. Za regulację autofagii odpowiedzialne są geny *atg* (*ang. autophagy-related genes*), których produktami są białka Atg, zaangażowane w poszczególne etapy autofagii. Do tej pory w komórkach drożdży zidentyfikowano 34 różne białka należące do tej grupy (Atg1-Atg34), a w komórkach ssaków odpowiadające im 34 ortologi (Martyniszyn L. i wsp., 2008; Weidberg H. i wsp., 2011).

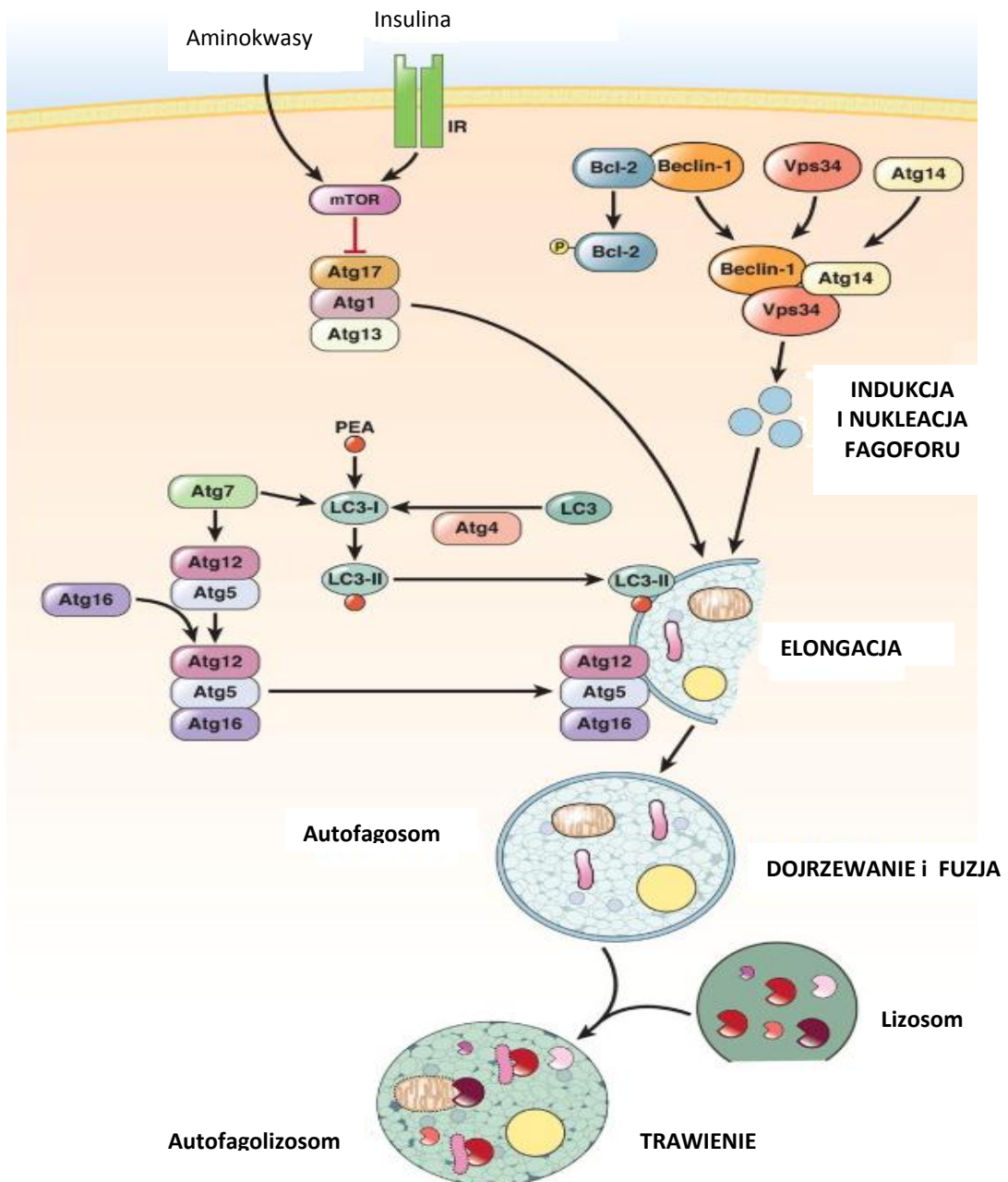
Dowiedziano, że autofagia bierze udział w procesach fizjologicznych, takich jak: biosynteza neuromelaniny, dojrzewanie erytrocytów, a także wewnątrzkomórkowa biogeneza surfaktantu na powierzchni pneumocytów. Wykazano również udział autofagii w regulacji długości życia organizmów. Mianowicie, przy występowaniu mutacji w genie *Atg5*, który jest odpowiedzialny za uruchomienie autofagii, dochodzi do śmierci mysich noworodków zaraz po ich urodzeniu (Lockshin R. i Zakeri Z., 2004). Rola autofagii w procesach fizjologicznych to jednak przede wszystkim utrzymanie homeostazy wewnątrz organizmu (Jia W. i wsp., 2011).

Za indukcję autofagii mogą być odpowiedzialne różne czynniki m.in.: brak pożywienia, niedotlenienie, cytokiny, hormony, uszkodzenie struktury DNA (Liu B. i wsp., 2010). Przewlekłe zahamowanie autofagii doprowadza do promowania nowotworzenia, wskutek niestabilności genomu, wadliwego wzrostu komórek, również w wyniku stresu komórkowego. Jednakże zwiększona indukcja autofagii może stanowić mechanizm pozwalający na przetrwanie komórek guza w stanie niedotlenienia, kwasicy, jak również pod wpływem chemioterapii. Dlatego też w kontekście rozwoju nowotworu, proces autofagii należy rozpatrywać dwukierunkowo (Levine B. i Kroemer G., 2009).

1.3.1. Mechanizm autofagii

Na przestrzeni lat, wraz z rozwojem technik biologii molekularnej, doszło do lepszego zrozumienia tak skomplikowanego procesu, jakim jest autofagia. Jako model badawczy dla zbadania mechanizmu autofagii wykorzystano komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Proces ten możemy podzielić na cztery etapy, w których istotną funkcję pełnią białka Atg (Morselli E. i wsp., 2009; Weidberg H. i wsp., 2011) (rycina 3).



Rycina 3. Schemat przebiegu procesu autofagii (wg. Czaja J.M., 2011).

Aktywacja procesu autofagii rozpoczyna się od formowania błony izolacyjnej (fagoforu) oraz jej stopniowego rozszerzania, w celu utworzenia autofagosomu. Za inicjację tego etapu odpowiedzialny jest kompleks, w skład którego wchodzi: kinaza 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K-III), Beklina 1 oraz kinaza serynowa p150. W ten etap autofagii zaangażowane jest także

białko błonowe Atg9, znajdujące się w strukturze preautofagosomalnej (PAS), oraz Atg2, z którym oddziałuje i dzięki temu może formować błonę izolacyjną (Yang Y. i wsp., 2005; Weidberg H. i wsp., 2011).

Powstawanie autofagosomu jest zależne od dwóch ubikwityno-podobnych kompleksów białek: Atg12-Atg5 oraz LC3-II-fosfatydyloetanolamina (LC3-II-PE). Kompleksy te są sprzężone ze sobą i powstanie struktury autofagosomu wymaga prawidłowego działania obu (Yang Y. i wsp., 2005).

Pierwszy z kompleksów wymaga obecności czterech białek: Atg5, 7, 10, 12. Atg12 jest białkiem zbudowanym z 186 aminokwasów, w którym glicyna na C-końcu zostaje aktywowana przez Atg7. Białko to pełni rolę podobną do enzymu E1, zaangażowanego w ubikwitynację. Białka Atg12 i Atg7 zostają połączone ze sobą nietrwale i następnie Atg12 przenoszone zostaje na Atg10, będące odpowiednikiem enzymu ubikwitynującego E2, i sprzężone z Atg5. Rezultatem tego sprzężenia jest powstanie kompleksu Atg12-Atg5, w którym białka są połączone za pomocą wiązania izopeptydowego. Wiązanie to powstaje poprzez połączenie glicyny w C-końcowym odcinku Atg12 z lizyną 149 w Atg5 (Fujita N. i wsp., 2008; Weidberg H. i wsp., 2011). W kolejnym etapie kompleks Atg12-Atg5 zostaje związany z białkiem Atg16, następnie dochodzi do multimeryzacji i powstania tetrameru, który jest niezbędny do rozpoczęcia formowania autofagosomu poprzez wydłużenie błony izolacyjnej. Zarówno w komórkach ssaków, jak i drożdży, powstanie kompleksu zachodzi w ten sam sposób, jednakże w pierwszym przypadku jego masa wynosi 350 kDa, natomiast w komórkach ssaków kompleks ten jest nazywany Atg16L, a jego masa wynosi 800 kDa (Mizushima N. i wsp., 2002; Rosenfeldt T. i Ryan K., 2011). Tylko niewielka część kompleksu związana jest z błoną, natomiast w większości zlokalizowany jest on w cytoplazmie. Gdy dochodzi do utworzenia dojrzałego autofagosomu, następuje dysocjacja kompleksu Atg16L, co sprawia, że nie może on stanowić markera procesu autofagii (Fujita N. i wsp., 2008).

Drugim ubikwityno-podobnym kompleksem, niezbędnym do powstania autofagosomu jest LC3-II-PE. LC3, łańcuch lekki białka związanego z mikrotubulami, jest ssaczym ortologiem drożdżowego białka Atg8. Białko LC3, znajdujące się w cytozolu, jest syntetyzowane jako prekursor proLC3, który w wyniku cięcia proteolitycznego przez Atg4 ulega przemianie do formy LC3-I. W następstwie działania Atg7 i Atg3, pełniących funkcję enzymów ubikwitynopodobnych (odpowiednio E1 i E2) oraz odwracalnego połączenia LC3-I z grupą aminową fosfatydyloetanolaminy (PE), powstaje dojrzała forma LC3-II wbudowywana do błony izolacyjnej autofagosomu. Obecność LC3-II-PE po obu stronach błony autofagosomu jest niezbędna dla postępu procesu autofagii (Fujita N. i wsp., 2008; Morselli E. i wsp., 2009; Rosenfeldt M.T. i Ryan K.M., 2009). Poziom LC3-II, który koreluje z ilością powstających

autofagosomów, jest wiarygodnym markerem procesu autofagii i można go zmierzyć za pomocą techniki immunoblotingu (Tanida I., 2008).

Do tej pory odkryto jeszcze dwa ssacze ortologi drożdżowego białka Atg8, zaangażowane w proces rozwoju autofagosomów. Są to: białko typu A związane z receptorem kwasu gamma-amino masłowego (GABARAP) oraz białko uczestniczące w transporcie białek wewnątrz aparatu Golgiego (GATE-16) (Weidberg H. i wsp., 2010).

Podczas dojrzewania dochodzi do fuzji autofagosomu z lizosomem, w rezultacie czego powstaje autofagolizosom. Do prawidłowego przebiegu tego etapu autofagii niezbędna jest obecność białek: związanych z błoną lizosomu (LAMP-2a), monomerycznych GTPaz (Rab22 i Rab24), białek SNARE (soluble NSF-attachment protein receptor) oraz NSF (N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion). W tym etapie ważną rolę odgrywają także białka cytoszkieletu (Yang Y.P. i wsp., 2005; Yang Z. i Kilonsky D., 2010).

Ostatnim etapem autofagii jest degradacja elementów cytoplazmy oraz organelli komórkowych. W etapie tym zawartość autofagolizosomu ulega trawieniu przez lizosomalne hydrolazy. Za lizę ciał autofagosomalnych w tym etapie są odpowiedzialne białka Atg15 i Atg22 (Mizushima N., 2007).

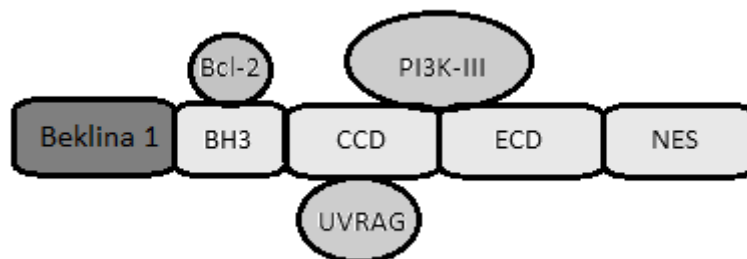
1.3.2. Regulacja procesu autofagii

Regulatorem autofagii jest kompleks białek beklina 1/PI3K-III. Kompleks ten jest zaangażowany w formowanie autofagosomów, inicjację procesu autofagii. Kompleks beklina 1/PI3K-III zlokalizowany jest w przestrzeni trans aparatu Golgiego i dostarcza trifosforanu fosfatydyloinozytolu z aparatu do błon izolujących (Yang Y. i wsp., 2005; Roy S. i Debnath J., 2010; Chen N. i Debnath J., 2010).

Powstawanie autofagosomu odbywa się za pośrednictwem aktywacji kinazy 3-fosfatydyloinozytolu. U ssaków odkryte zostały trzy kompleksy, w skład których wchodzi PI3K, mianowicie: klasa I, II i III. W procesie autofagii biorą udział kompleksy klasy I i III. Pierwszy z nich jest składnikiem błony komórkowej i zaangażowany jest w szlak transdukcji sygnału, prowadzący do aktywacji kinazy TOR. Pełni on rolę inhibitora autofagii. Natomiast kompleks PI3K klasy III jest aktywatorem tego procesu, bierze udział w proliferacji komórek oraz przemieszczaniu wewnątrzkomórkowych elementów cytoszkieletu (Martyniszyn L. i wsp., 2008; Mehrpour M. i wsp., 2010; Kang R. i wsp., 2011). W komórkach drożdży odpowiednikiem PI3K jest Vps34. Białko to tworzy dwa kompleksy: kompleks I składający się z: Vps34, Vps15, Atg6/Vps30, Atg14 oraz kompleks II zawierający: Vps34, Vps15, Atg6/Vps30 i Vps38. Pierwszy z nich jest odpowiednikiem ssaczego kompleksu klasy III (Mehrpour M. i wsp., 2010). Aktywacja

PI3K-I zwiększa wytwarzanie fosfatydyloinozitolotrifosforanu (PIP3), co doprowadza do przemieszczania się kinaz białkowych zależnych od fosfatydyloinozytolu (PDK) oraz kinazy Akt do błony komórkowej. Poprzez PDK 1 i 2 aktywowana zostaje kinaza Akt, odpowiedzialna za fosforylację kompleksu białek zaangażowanych w regulację podziałów komórkowych, hamartyny i tuberyny. Hamuje w ten sposób aktywność tychże kompleksów, w związku z czym jest głównym inhibitorem szlaku sygnałowego mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) (Perycz M. i wsp., 2007; Kost A. i wsp., 2011). Zaobserwowano, że ciągła aktywacja PI3K odpowiedzialna jest za zwiększoną produkcję białek, proliferację komórek nowotworowych, jak również hamowanie autofagii przez mTOR (Chen N. i Debnath J., 2010).

Drugim elementem wchodzącym w skład kompleksu aktywującego proces autofagii jest beklina 1. Jest to białko o masie cząsteczkowej 60 kDa, składające się z ok. 450 aminokwasów. Zidentyfikowano do tej pory trzy domeny tego białka: na N-końcu - domena BH-3-only domain (114-123 aminokwasy), centralna super-helisa (CCD, aminokwasy 144-269) oraz na C-końcu - ewolucyjnie zachowana domena (ECD, aminokwasy 244-337). Elementem struktury jest także krótka sekwencja aminokwasów bogata w leucynę, tzw. sygnał eksportu jądrowego (ang. nuclear export signal, NES), odpowiedzialna za indukcję autofagii w cytozolu. ECD jest niezbędna w pośredniczeniu bekliny 1 w programowanej śmierci komórki typu II oraz w zahamowaniu nowotworzenia przez to białko. Natomiast mutacje we fragmencie NES mogą powodować zaburzenia indukcji autofagii wywoływanej przez niedobór składników odżywczych (Boya P. i Kroemer G., 2009; Li Z. i wsp., 2010; Kang R. i wsp., 2011) (rycina 4).



Rycina 4. Struktura bekliny 1 oraz białka tworzące kompleksy z jego domenami (wg Cao Y. i Kilonsky D., 2007 oraz Pattingre S. i wsp., 2008).

Beklina 1 za pośrednictwem domeny BH-3 oddziałuje z białkiem anti-apoptocycznym Bcl-2. Z domeną CCD wiążą się produkty genu związanego z opornością na promieniowanie ultrafioletowe (UVRAG), będące promotorem mechanizmu autofagii. Z kolei PI3K-III oddziałuje z dwiema domenami: CCD i ECD (Cao Y. i Kilonsky D., 2007; Boya P. i Kroemer G., 2009).

Beklina 1 bierze udział w rozwoju zarodka, reguluje długość życia komórki oraz decyduje o jej śmiertelności. Odnotowano jej udział w zapobieganiu chorobom neurodegeneracyjnym: chorobie Alzheimerera, Huntingtona i Parkinsona. Zaobserwowano obniżony poziom bekliny 1 u tych pacjentów, który związany był z nadmiernym odkładaniem patologicznych białek (amyloidu β , huntingtyny i białka tau) w neuronach oraz ich niewystarczającą eliminacją. Beklina 1 wykazuje również działanie kardioprotekcyjne, indukując autofagię podczas reperfuzji. Podczas niedokrwienia mięśnia sercowego autofagia odgrywa rolę ochronną, ale uwodniono, że w przypadku mutacji w genie beklina 1 dochodzi do osłabienia reperfuzji. Ponadto, Beklina 1 uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej, w przypadku zakażeń wirusowych (kolokalizacja w jądrowych centrach replikacyjnych wirusa) i bakteryjnych (stymulacja TLR) (Martyniszyn L. i wsp., 2011; Subauste C.S., 2009). Odgrywa znaczącą rolę w supresji nowotworów, indukując proces autofagii oraz zapobiegając proliferacji komórek nowotworowych (Cao Y. i Kilonsky D., 2007; Levine B. i wsp., 2008; Sun Q. i wsp., 2009; Jaeger P. i Wyss-Coray T., 2010). Beklina oddziałuje z PI3K-III oraz p150. Białko to może oddziaływać także z Ambra1 (ang. activating molecule in beclin 1 regulated autophagy) oraz z czynnikiem oddziaływującym z Bax (Bif-1) (ang. Bax-interacting factor 1) (Decuypere J.P. i wsp., 2012).

W regulację autofagii zaangażowane jest także ssacze białko docelowe dla rapamycyny, mTOR. Jest to kinaza serynowo-treoninowa, tworząca w komórkach ssaków dwa kompleksy białkowe odpowiedzialne za regulację procesów komórkowych. Pierwszy z nich mTORC1, składa się z kinazy mTOR oraz białek Raptor i mLST8/GbL. Kompleks ten zaangażowany jest w kontrolę transkrypcji, translacji, jak również autofagii, będąc jej negatywnym regulatorem. mTORC2 składa się z kinazy mTOR oraz białek Rictor, mLST8/GbL i jest odpowiedzialny za regulację cytoszkieletu aktynowego. mTORC1 charakteryzuje się wysoką wrażliwością na rapamycynę, będącą swoistym inhibitorem mTOR, natomiast drugi z kompleksów mTORC2 jest mniej wrażliwy na rapamycynę (Perycz M. i wsp., 2007; Kost A. i wsp., 2011). Działanie rapamycyny polega na defosforylacji Atg1 (ULK1), wskutek czego następuje zahamowanie aktywności mTOR oraz inaktywacja autofagii (Sridharan S. i wsp., 2011). Aktywność mTORC1 zależy od dostępności substancji odżywczych.

Ważnym regulatorem autofagii jest białko p53, czynnik transkrypcyjny pełniący funkcję supresora transformacji nowotworowej. W przypadku, gdy dochodzi do mutacji genu TP53 częściej obserwuje się występowanie nowotworów (Wang Ch. i wsp., 2011). p53 wiążąc się do swoistych sekwencji DNA, reguluje ekspresję genów białek zaangażowanych w regulację przebiegu cyklu komórkowego, metabolizm oraz indukcję apoptozy. W ponad połowie przypadków ludzkich nowotworów obserwuje się inaktywację białka p53 w wyniku nadmiernej degradacji proteosomalnej, mutacji genu lub wzmożonego wytwarzania jego inhibitorów.

Białko p53 bierze również udział w regulacji autofagii, a jego rola w tym procesie zależy od lokalizacji białka w komórce. W indukcji autofagii jest zaangażowana frakcja jądrowa p53, co wiąże się z jego funkcją regulatorową transkrypcji genów kodujących białka AMPK, DAPK-1, DRAM, białka proapoptotyczne z rodziny Bcl2 (Bad, Bax, BNIP3, PUMA) oraz sestryny (Morselli E. i wsp., 2009). DRAM w odpowiedzi na działanie czynników uszkodzających DNA, bierze bezpośredni udział w indukcji autofagii niezależnej od kompleksu mTOR. Z kolei sestryna 1 i 2, indukowana w wyniku uszkodzeń DNA bądź stresu oksydacyjnego, bierze udział w autofagii poprzez białka AMPK (Hay N. i Sonenberg N., 2004). Frakcja cytoplazmatyczna p53 poprzez aktywację mTORC1, niezależnie od roli tego białka jako czynnika transkrypcyjnego, powoduje zahamowanie autofagii. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Tasdemir i współpracowników na komórkach raka jelita grubego pozbawionego p53 (HCT116-/-), charakteryzujących się podwyższonym podstawowym poziomem autofagii. W wyniku wprowadzenia genu typu dzikiego białka p53 i przywrócenia syntezy p53, poziom autofagii obniżył się. Regulacja autofagii przy udziale białka p53 może zatem zachodzić dwukierunkowo. W warunkach fizjologicznych białko to jest negatywnym regulatorem tego procesu. Natomiast, pod wpływem działania czynników onkogennych, dochodzi do aktywacji autofagii (Tasdemir E. i wsp., 2008; Kost A. i wsp., 2011; Wang Ch. i wsp., 2011).

W regulację autofagii zaangażowany jest także czynnik transkrypcyjny NFκB. Białko to jest zbudowane z kilku podjednostek należących do rodziny Rel, takich jak p65 (Rel A), p50, p52, c-Rel i RelB (Gloire G. i Piette J., 2009). Czynnikiem ten odgrywa szeroką rolę w przeżyciu komórki, poprzez aktywację białek antyapoptotycznych, jak i bierze udział w regulacji różnicowania i proliferacji. Za aktywację NFκB są odpowiedzialne stres genotoksyczny oraz patogeny. Fosforylacja oraz proteosomalna degradacja inhibitora NFκB, IκB, powoduje translokację z cytoplazmy do jądra i następnie transkrypcję jego genów docelowych. IKK, kinaza IκB, jest regulatorem NFκB, kinazą białkową odpowiedzialną za fosforylację IκB oraz aktywację NFκB (Criollo A. i wsp., 2012; Ouyang L. i wsp., 2012). Związek pomiędzy czynnikiem jądrowym kappa B (NFκB) a regulacją procesu autofagii, wciąż nie został do końca wyjaśniony. NFκB zaliczany jest do negatywnych, jak również pozytywnych regulatorów autofagii. Udowodniono, że jądrowa lokalizacja tego białka jest odpowiedzialna za przeżycie, podczas gdy jego obecność w cytozolu indukuje programowaną śmierć komórki (Zhang Y. B i wsp., 2009). Aktywacja IKK następuje w wyniku głodzenia, zahamowania mTOR przez rapamycynę oraz degradację p53 przez PTF-α, czyli czynników indukujących autofagię. Konsekwencją tej aktywacji jest wspomniana translokacja do jądra. Ostatnie badania zidentyfikowały *beklinę 1* jako gen docelowy dla NFκB, sugerując udział NFκB w indukcji procesu autofagii (Kang R. i wsp., 2011; Criollo A. i wsp., 2012).

1.4. Rola apoptozy i autofagii w procesie nowotworzenia

Apoptoza jest odpowiedzialna za eliminację komórek ulegających transformacji nowotworowej. Natomiast redukcja tego procesu odgrywa kluczową rolę w kancerogenezie. Istnieją trzy główne mechanizmy, w wyniku uruchomienia których, dochodzi do indukcji oporności na apoptozę, bądź obniżenia tego procesu. Pierwszy z nich obejmuje zaburzenia równowagi białek pro- i antyapoptotycznych. Wiele badań wykazało, że dysregulacja Bcl-2 oraz innych białek antyapoptotycznych stanowi jeden z kluczowych elementów determinujących właściwości komórek nowotworowych. Zaobserwowano rozwój spontanicznych nowotworów u myszy BCL-2 transgenicznych, a amplifikację genu BCL-2 wykazano w przewlekłej białaczce limfocytarnej, drobnokomórkowym raku płuc, raku piersi, chłoniaku nie-Hodgkina i glejakach. Nadekspresja innego białka należącego do tej rodziny, Mcl-1, predysponuje myszy do rozwoju chłoniaków z komórek B. Z kolei u człowieka, wysoką ekspresją Mcl-1 zanotowano w wielu przypadkach ostrej białaczki mieloidalnej i szpiczaku mnogim. Ponadto wykazano, że nadekspresja białek z rodziny Bcl-2 nie tylko odgrywa rolę w rozwoju nowotworu, ale również jest skorelowana z opornością na chemioterapeutyki i radioterapię (Weyhenmeyer B. i wsp., 2012). Drugim mechanizmem modulującym indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych jest znacząca utrata bądź inaktywacja kaspaz, powodując zaburzenia prawidłowego przebiegu ścieżki apoptozy, czego skutkiem jest nadmierna proliferacja komórek. Trzeci mechanizm polega na nieprawidłowym przekazywaniu sygnałów przez receptory śmierci nowotworowych (Fiandalo M.V. i Kyprianou N., 2012).

Modulacja ścieżki apoptozy może zachodzić z udziałem supresorów nowotworzenia, mikroRNA, czyli jednoniciowych cząsteczek RNA, biorących udział w postanskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Do takich modulatorów należą m.in.: miR-15a, miR-16-1, miR-29 i let-7. Odkryto, że miR15a oraz miR-16-1 oddziałują z Bcl-2 i indukują apoptozę. Z kolei inne miRNA: miRNA-21, miRNA-17-92, miRNA-221,-222 i miRNA-272,-273, negatywnie regulują aktywność apoptotyczną, zwiększając proliferację komórek nowotworowych. Jednym z miRNA, najczęściej ulegających regulacji w wielu typach złośliwych nowotworów, jest miRNA-21. Sugeruje się, że reguluje apoptozę poprzez oddziaływanie z genem PCD 4 (PDCD4), homologiem fosfatazy i tensyny (PTEN) oraz tropomiozyną 1 (TPM1). Z kolei let-7 prawdopodobnie bierze udział w progresji nowotworu poprzez oddziaływanie z miRNA-21. Grupa miR-17-92 jest ściśle związana z genem c-Myc, promującym proliferację komórek, hamującym apoptozę, indukującym angiogenezę i współdziałającym z MYC, przyspieszając rozwój chłoniaków (Ougang L. i wsp., 2012).

Markerami apoptozy najczęściej obserwowanymi u pacjentów z nowotworami złośliwymi są: rozpuszczalna forma receptora, sFas oraz jego ligand FasL, cytokeratyny oraz krążące fragmenty DNA. Badania wykazały, że poziomy antyapoptotycznego sFas oraz proapoptotycznego FasL ulegają podwyższeniu u pacjentów z nowotworami złośliwymi i, w niektórych przypadkach, są skorelowane ze stopniem zaawansowania nowotworu. Inne markery obejmują fragmenty cytokeratyny-19 (CYFRA21-1), tkankowy antygen polipeptydowy (TPA, fragmenty cytokeratyny 8-, 18-, 19-). Ulegają one podwyższeniu zarówno w nowotworach łagodnych, jak i złośliwych. CYFRA21-1 jest bardzo użytecznym markerem w monitorowaniu raka płuc, szyjki macicy, głowy i szyi, podczas gdy TPA jest pomocne w raku piersi, jajnika i okrężnicy. Z kolei krążące fragmenty DNA są wykorzystywane w monitorowaniu terapii guzów litych (Sankari S. i wsp., 2012).

Informacje zawarte w obecnym piśmiennictwie nie określają jednoznacznie roli autofagii w nowotworzeniu. Jednakże duża część badań przedstawia ten proces jako mechanizm zapobiegający rozwojowi nowotworu. Wiele genów związanych z procesem autofagii jest zlokalizowanych w regionach chromosomów, często ulegających delecjom (LeFranc F. i wsp., 2007). Pierwsze połączenie pomiędzy nowotworzeniem i autofagią stanowi gen Beklina 1 (*BECN 1*). Badania molekularne prowadzone nad tym genem, pozwoliły zaobserwować, że jego ekspresja zmniejsza zarówno proliferację komórek nowotworowych, jak i potencjał nowotworzenia *in vivo*. Zaobserwowano zmniejszoną ekspresję bekliny 1 w komórkach raka piersi MCF7 w porównaniu z prawidłowymi komórkami gruczołu piersiowego (Koukourakis M. i wsp., 2010). W modelu badawczym myszy mutacja z monoalleliczną delecją *BECN1* zwiększyła częstość spontanicznych nowotworów złośliwych (białaczki, chłoniaki, nowotwory wątroby i płuc) w porównaniu z ich typami dzikimi. Ponadto zaobserwowano, że delecja alleli *bekliny 1* indukuje letalność embrionów. Wykazano, że obniżenie ekspresji tego genu jest powiązane z gorszą prognozą u pacjentów z nowotworami złośliwymi, a także ze skróceniem czasu całkowitego przeżycia u pacjentów z rakiem jelita grubego i rakiem przełyku. Natomiast nadekspresja *bekliny 1*, sprzyja lepszemu rokowaniu u pacjentów z glejakami o wysokim stopniu złośliwości oraz u pacjentów z nowotworami wątroby (Mizushima N., 2007; Rubinsztein D.C. i wsp., 2007; Lee S. i wsp., 2011; Carew J.S. i wsp., 2012). Z badań tych wynika, że utrata genu *BECN1* promuje proces nowotworzenia, natomiast jego nadekspresja hamuje ten proces.

W komórkach nowotworowych znaleziono również mutacje w innych genach zaangażowanych w proces autofagii. Mutacje w genie UVRAG, kodującym białko oddziałujące z bekliną 1, występowały w komórkach nowotworów jelita grubego i żołądka (Liang C. i wsp., 2006). Obserwowano również częste delecje genu *MAP1-LC3* w przypadku raka piersi, jajników,

prostaty i wątroby (Jin S., 2006). Wykazano, że inaktywacja Atg4 zwiększa podatność u myszy na rozwój fibrosarkomy (Chen N. i Debnath J., 2010). Za rolę przeciwnowotworową autofagii przemawia również fakt, że jest ona regulowana negatywnie przez szlak PI3K-Akt-mTOR, a wzrost jego aktywności jest częstym wynikiem mutacji obserwowanych w komórkach nowotworowych. Ponadto dowiedziono, że zahamowanie autofagii może doprowadzić do zwiększonego nowotworzenia, poprzez nadmierną kumulację reaktywnych form tlenu (Kimmelman A.C., 2011).

Należy zwrócić uwagę, że autofagia może być również odpowiedzialna za promocję nowotworzenia. Kluczową rolę odgrywa wówczas brak składników odżywczych oraz hipoksja. Czynnikiem indukującym autofagię w warunkach hipoksji, HIF-1 α , jest odpowiedzialny za indukcję transkrypcji genu białka BNIP3. Białko to wiąże się z białkami antyapoptocycznymi Bcl-2, Bcl-X_L, które oddziałują z Bekliną 1, regulując autofagię. W wyniku konkurencji BNIP3 o wiązanie z Bcl-2 i Bcl-XL, dochodzi do osłabienia ich interakcji, a odłączona Beklina 1 indukuje autofagię (Bellot G. i wsp., 2009). W przypadku terapii przeciwnowotworowej autofagia może stymulować wzrost komórek nowotworowych oraz ich przeżycie w wyniku działania chemioterapeutyków, oraz terapii radiacyjnej (Wu W.K.K. i wsp., 2012). Ponadto autofagia może promować nowotworzenie poprzez modulację metastazy komórek nowotworowych (Maycotte P., Thorburn A., 2011). Udział autofagii w promowaniu bądź inhibicji procesu nowotworzenia ze wskazaniem typu nowotworu i stosowanego leczenia, podsumowuje tabela 1.

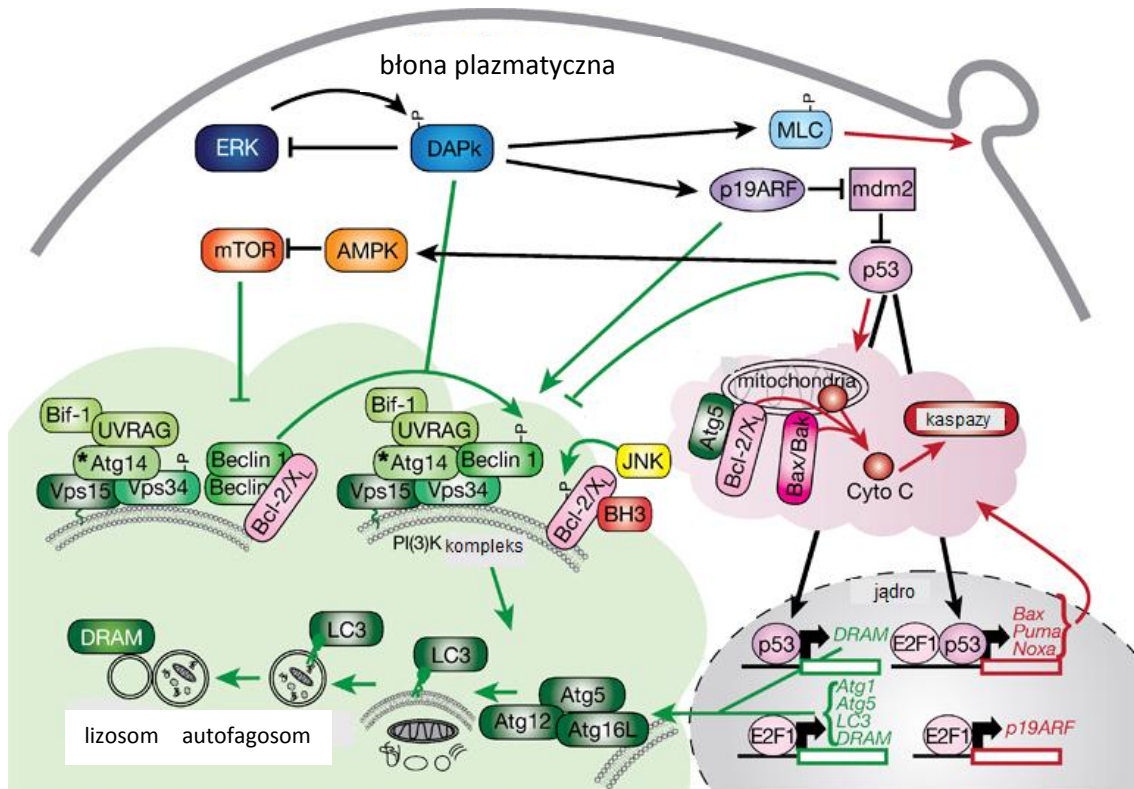
Efekt autofagii na śmierć komórki	Typ nowotworu	Leczenie
Autofagiczna śmierć komórki	transformowane SV40 Bax/Bak ^{-/-} MEF lub MEF wykazujące nadekspresję Bcl-X _L /Bcl-2	Etopozyd, staurosporyna
	Komórki raka prostaty PC3 PTEN ^{-/-} i DU145 PTEN ^{+/+}	promieniowanie ^{+/-} inhibitory kaspaz oraz zahamowanie mTOR
	Bax/Bak ^{-/-} MEFs	promieniowanie
	Komórki raka płuc H460	Promieniowanie ^{+/-} inhibitory kaspaz oraz zahamowanie mTOR.
	Komórki raka piersi MCF-7	Bcl-2 knockdown
Autofagia promuje apoptozę	komórki raka prostaty androgenowo-niezależne z wysokimi poziomami Bcl-2/BclX _L (PC-3, CL-1)	(-)-gossypol, a BH3-mimetyki
	(MEFs i CCD-18Co nie transformowane komórki raka okrężnicy)	Induktory stresu ER (A23186, tunicamycin, thapsigargin)
Autofagia chroni przed apoptozą	Komórki indukowane p53 lub komórki raka okrężnicy RKO	Indukcja p53/Aktynomycyna D
	glejak ludzki U251, glejak szczyrczy C6 mysie komórki fibrosarkomy L929	Cisplatyna
	Komórki raka piersi MCF-7	kamptotecyna
	Komórki raka okrężnicy (HCT116, DLD-1, DLD-1/5-FU odporne)	5-fluorouracyl
	model chłoniaka Myc/p53 knock-in	MNNG, cyklofosamid
	Komórki raka prostaty (LNCaP, PC3)	2-deoksyglukoza
	melanoma (MDA-MB-435) i rak piersi (SKBR3)	2-deoksyglukoza
	Komórki białaczki K562 lub pierwotna CML	Imatinib
	Komórki raka podścieliskowego przewodu pokarmowego	Imatinib
	Rak prostaty (DU145), rak okrężnicy (HCT116)	Induktory stresu ER (A23186, tunicamycin, thapsigargin)
	Wt MEFs	Induktory stresu ER (thapsigargin, tunicamycin, brefeldin A)
Autofagia chroni przed śmiercią komórki	Skrawki glejaka oraz komórki macierzyste z nich izolowane	promieniowanie
	Komórki glejaka U251	Temozolomid/etopozyd
Zahamowanie autofagii chroni przed śmiercią we wczesnych fazach a indukuje śmierć komórki na etapie lizosomalnym	U373-MG	Temozolomid
	Komórki glejaka (U87-MG, U373-MG, LN2308, LN229)	Imatinib
Autofagia promuje przeżycie lub śmierć w zależności od rodzaju wyłączanego genu związanego z autofagią	Komórki raka piersi MDA-MB-231, HTB43 gardła, A549 płuc, HTB35 macicy	promieniowanie
	Komórki raka prostaty Panc02	Paklitaxel/ melfalan

Tabela 1. Rola autofagii w procesie nowotworzenia i terapii (wg. Maycotte P. i Thorburn A., 2011).

1.5. Apoptoza i autofagia - wzajemne relacje między ścieżkami śmierci komórki

Apoptoza i autofagia to dwa odmienne procesy mogące występować jednocześnie lub w różnych przedziałach czasowych, w obrębie tej samej komórki. O tym, który z procesów zostanie uruchomiony, decyduje szereg czynników zewnętrznych, jak i mechanizmy regulujące komórkowe procesy życiowe. Istnieje jednak kilka elementów łączących te dwa typy śmierci (Giansanti V., i wsp., 2011) (rycina 5). Jednym z nich jest białko p53, znany induktor apoptozy, który może również regulować autofagię poprzez nadekspresję genu DRAM. Podobnie aktywacja ścieżki kinaz PI3K/Akt, hamującej apoptozę, może także doprowadzić do inhibicji autofagii. A zatem, odgrywające kluczową rolę ścieżki sygnałowe, mogą równocześnie indukować lub hamować apoptozę i autofagię. Ponadto białka będące elementami mechanizmu obu procesów (białka z rodziny Bcl-2, FADD, Atg) bezpośrednio je regulują.

Beklina 1, będąc częścią kompleksu z kinazą PI3K-III, niezbędna do formowania autofagosomu, w wyniku interferencji z określonymi białkami, może hamować indukcję autofagii. Beklina 1 oddziałuje z białkiem Bcl-2, a więc kluczowy regulator apoptozy oddziałuje z kluczowym regulatorem autofagii. Badania strukturalne i biochemiczne wykazały, że interakcje te zachodzą poprzez domenę BH3. Rozerwanie wiązania pomiędzy Bekliną 1 a Bcl-2 poprzez tą domenę, prowadzi do nasilenia autofagii. Beklina 1 oddziałuje również z innym ważnym białkiem antyapoptotycznym, Bcl-2 XL, a interakcja ta reguluje autofagię. Pokazuje to, że nie tylko Bcl-2/Bcl-XL hamuje apoptozę poprzez związanie i oddziaływanie z białkami proapoptotycznymi Bax i Bak, ale również hamuje autofagię poprzez wiązanie z Bekliną 1. Interakcja ta jest istotna w regulacji autofagii indukowanej głodem. W zależności od lokalizacji białka Bcl-2 w komórce, mogą istnieć różnice w regulacji tej ścieżki. Bcl-2 występuje w mitochondrium i ER, jednakże zahamowanie funkcji Bcl-2 w autofagii zachodzi tylko w ER, a Bcl-2 mitochondrialny będący inhibitorem bodźców apoptotycznych, nie może zahamować autofagii. Bcl-2 może również hamować autofagię poprzez blokowanie uwalniania Ca^{2+} z ER. Rola wapnia polega na aktywacji kinazy zależnej od Ca^{2+} , kalmoduliny oraz kinazy AMP, prowadząc do zahamowania mTOR, co z kolei aktywuje autofagię (Levine B. i Kroemer G., 2009).



Rycina 5. Powiązanie programowanych ścieżek śmierci komórki (wg. Eisenberg-Lerner A. i wsp., 2009). Zielone strzałki wskazują proces autofagii, natomiast czerwone, proces apoptozy. Czarnymi strzałkami zaznaczono mechanizmy regulujące oba procesy. MLC – kinaza lekkiego łańcucha miozyny; P- fosforylacja, p19 ARF – białko regulujące p53, Vps15 – kinaza serynowa p150, Vps34 - kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K).

Elementy ścieżki receptorowej apoptozy także mogą kontrolować autofagię. Wiązanie się białka adaptorowego FADD do liganda związanego z receptorem śmierci, jest niezbędnym etapem dla powstania DISC. FADD składa się z domen DD i DED. W prawidłowych komórkach epitelialnych, domena DD białka FADD może indukować nowy mechanizm śmierci komórki obejmujący wysoki poziom autofagii. Kiedy receptory DD białka FADD nie posiadają aktywności katalitycznej, wówczas indukują autofagię poprzez oddziaływanie z innymi białkami, tj. Atg5. Ten mechanizm autofagii regulowany przez FADD zachodzi także, gdy przekazanie sygnału zależne od FADD, jest indukowane przez ligand TRAIL aktywujący receptory śmierci DR4 i DR5. Dowiedziono udział białka szlaku zewnątrzkomórkowego apoptozy, białka hamującego FLICE - FLIP, w regulacji apoptozy i autofagii. Dwie efektorowe domeny śmierci (DED1), wchodzące w skład c-FLIP, mogą zapobiegać wiązaniu Atg3 do LC3 i tym samym hamować jego przemianę podczas autofagii. W konsekwencji ekspresja FLIP efektywnie hamuje śmierć komórki na drodze autofagii, podczas aktywacji tego procesu znanym induktorem, rapamycyną (Lee J.S. i wsp., 2009).

Kaspaza-3, jako łącznik obydwu procesów w procesie proteolizy inaktywuje Beklinę 1, hamując przy tym autofagię i zwiększając tym samym apoptozę poprzez uwolnienie z mitochondrium czynników apoptogennych (Wirawan E. i wsp., 2010). Z kolei najnowsze badania wskazują nową rolę kaspazy-3, która w przypadku autofagii zaindukowanej głodzeniem, powoduje uwolnienie nowo utworzonych wakuoli autofagicznych (Nemchenko A., 2012).

Badania pokazują, że regulatory autofagii mogą kontrolować apoptozę. Z badań wynika, że Atg5 może regulować elementy zewnątrzkomórkowej ścieżki apoptotycznej. Mianowicie, w eksperymentach badających interferon oraz autofagiczną śmierć komórki indukowaną Atg5, wykazano, że białko to oddziałuje z FADD. Co jest interesujące, to fakt, że analizowana interakcja spowodowała śmierć komórki wymagającą obecności FADD oraz angażującą kaspazy, ale bez tworzenia autofagosomów. Udział Atg5 w regulacji apoptozy zachodzi także poprzez kalpainy, tworząc białko ulegające translokacji do mitochondrium i powodujące uwolnienie cytochromu c oraz aktywację ścieżki wewnętrznej apoptozy, która może być zablokowana przez Bcl-2. Badania wykazały, że wyłączenie *Atg5* chroni komórki nowotworowe przed bodźcami apoptotycznymi, podczas gdy ekspresja *Atg5* uwalnia na te bodźce. Inne badania dowiodły, że aktywacja kalpain jest wymagana do indukcji autofagii przez rapamycynę oraz głodzenie (Thorburn A., 2008; Turcotte S. i Giaccia A.J., 2009; Gump J.M. i Thorburn A., 2011). Wykazano również udział innych białek z rodziny Atg w regulacji obu procesów. Atg3, pełniące funkcję enzymu E2-podobnego i odgrywające rolę w lipidacji Atg8/LC3 podczas autofagii, stanowi substrat dla Atg12. Formowanie kompleksu Atg12-Atg3 wymaga obecności Atg7 (E1) oraz autokatalitycznej aktywności Atg3, jako E2, i w konsekwencji prowadzi do powstania wiązania kowalencyjnego pomiędzy Atg12 i Atg3. Rozerwanie tego połączenia nie wpływa na autofagię indukowaną głodzeniem, natomiast brak formowania tego kompleksu powoduje zahamowanie śmierci komórki z udziałem ścieżki mitochondrialnej (Radoshevich L. i wsp., 2010).

Białkiem łączącym proces autofagii oraz apoptozy jest p62. Białko to ma znaczenie w progresji procesu autofagii oraz indukcji apoptozy. p62 jest wskazywane w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB, a ostatnie badania łączy aktywność p62 z szlakiem zewnątrzkomórkowym apoptozy (kaspaza-8, TRAF6). Związek p62 z procesem autofagii opiera się o wiązanie z regulatorem autofagii Atg8/LC3 poprzez regionoddziałujący z LC3, nazywany LIR (LC3-interacting region) (Moscat J. i Diaz-Meco M.T., 2009).

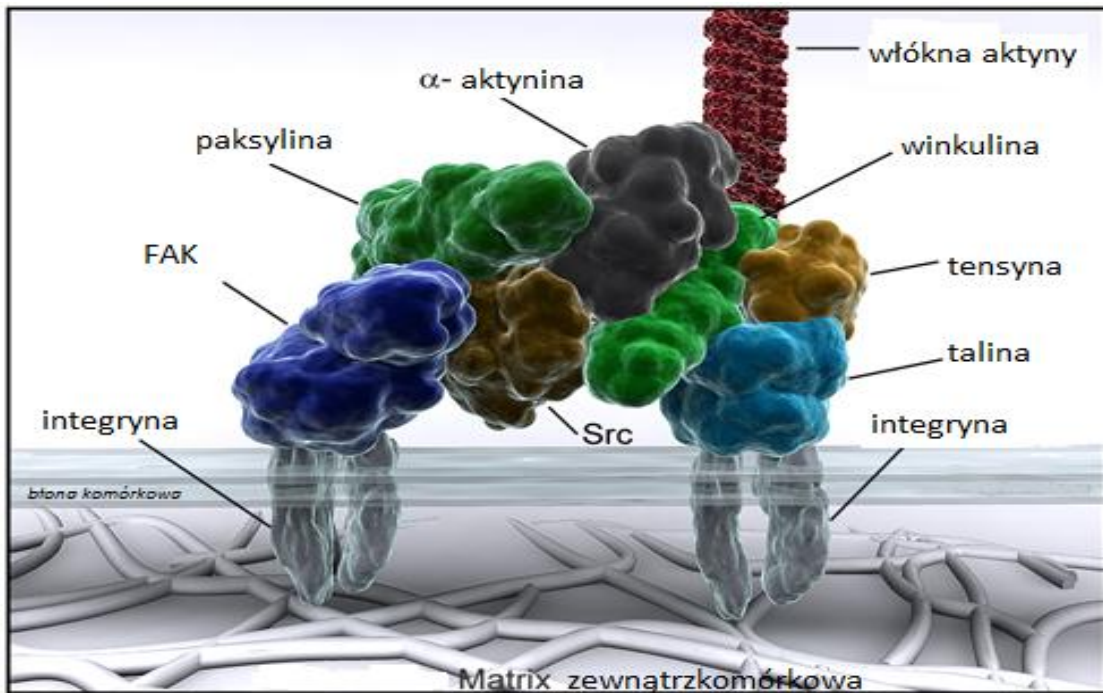
1.6. Charakterystyka wybranych białek związanych z migracją komórek nowotworowych

Migracja komórek jest złożonym, dynamicznym procesem, obejmującym przynajmniej trzy niezależne, skoordynowane biologiczne procesy. Pierwszym z nich jest adhezja komórki do składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), z modyfikacją struktury molekularnej ECM w przypadku komórek ulegających transformacji nowotworowej. Proces ten opiera się z jednej strony o adhezyjne właściwości komórek z odpowiednimi elementami ECM, a z drugiej strony o połączenia w układzie komórka-komórka z udziałem molekuł adhezyjnych. Kolejnym, niemniej ważnym procesem obejmującym migrację komórek, jest ich ruchliwość, polegająca na reorganizacji cytoszkieletu aktyny, głównie poprzez modyfikacje w obrębie połączeń integryna-ECM. Trzecim procesem związanym z migracją jest inwazja, polegająca na degradacji białek macierzy z udziałem enzymów proteolitycznych wydzielanych przez komórki nowotworowe (katepsyny, metaloproteinazy (MMP)) (Lefranc F. i wsp., 2005).

W procesie nowotworowym obserwuje się zaburzenia adhezji, proliferacji, jak również zmniejszoną integralność między komórkami i macierzą komórkową (Jinka R. i wsp., 2011). Komórki nowotworowe pierwotnie pojawiają się w obrębie tkanki macierzystej. Początkowo, przez różnie długi okres, komórki te nie są zdolne przekroczyć najbliższych warstw tkanki, z której się wywodzą. Jest to tak zwany rak miejscowy, inaczej zwany nieinwazyjnym. Dopiero w późniejszym etapie nowotwór może przekroczyć barierę sąsiadującej tkanki, wykazując zdolność do naciekania. Początkowo proces ten dotyczy sąsiadujących komórek macierzy, później jednak nabiera zdolności do naciekania bardziej odległych tkanek narządu. Cechy te charakteryzują postęp procesu nowotworzenia. Dzięki proteazom oraz innym różnym czynnikom wzrostowym komórki nowotworowe są zdolne do narządowej oraz pozanarządowej penetracji, doprowadzając do powstania przerzutów (Mason S.D. i Joyce J.A., 2011; Watanabe H. i wsp., 2010).

Inwazja komórek nowotworowych przez bariery tkankowe wymaga degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również dynamicznych interakcji pomiędzy macierzą zewnątrzkomórkową a wewnątrzkomórkowym cytoszkieletem aktyny. Procesy te zachodzą poprzez organizację struktur przylegania, z których najlepiej scharakteryzowanymi są ogniska adhezji, będące głównym układem regulującym migrację komórek (Goetz J.G., 2009). Modyfikacja tych ognisk poprzez aktywację integryn i białka kinazy ognisk adhezji (FAK), jest niezbędna do inicjacji motoryki komórek (Virtanen S.S., i wsp., 2010). Ogniska adhezji zawierają zgrupowania transbłonowych receptorów integrynowych, wiązanych jednym końcem do macierzy zewnątrzkomórkowej, a drugim do włókien stresowych aktyny. Włókna te

odpowiedzialne są za przyczepność komórek oraz reorganizację macierzy zewnątrzkomórkowej (rycina 6) (Albiges-Rizo C. i wsp., 2009).



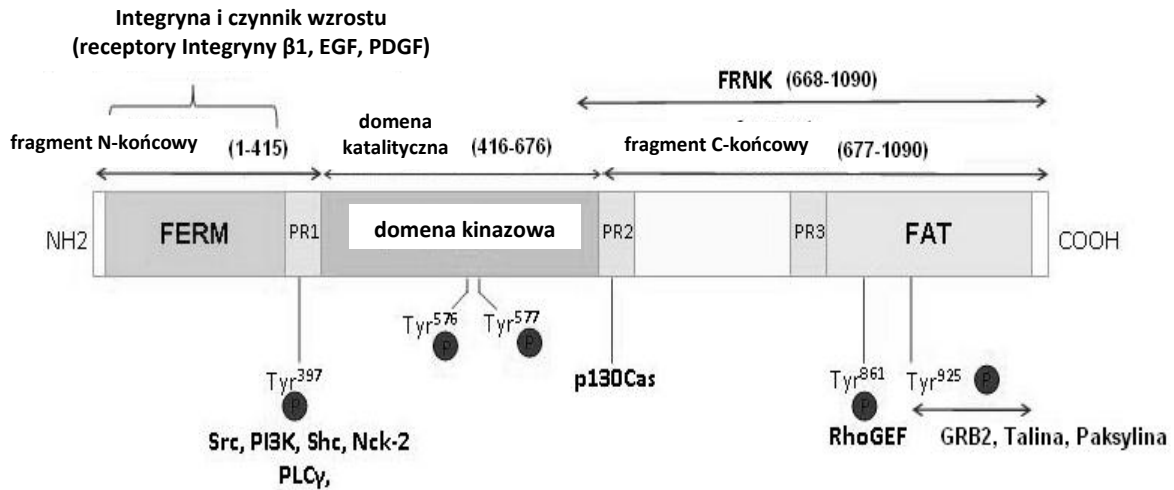
Rycina 6. Organizacja ognisk adhezji (wg. www.reading.ac.uk).

1.6.1. Kinaza ognisk adhezji – FAK

Kinaza ognisk adhezji, FAK, jest to białko sygnalizacyjne, które odgrywa istotną rolę w przekazywaniu informacji między komórkami na drodze zależnej od adhezji (Zhao X. i Guan J.L., 2011). Jego obecność wykazano m.in. w komórkach mezenchymalnych, neuronach, płytkach, monocytach, limfocytach, fibroblastach oraz w komórkach naczyń żylnych (Relou I.A., i wsp. 2003). FAK, ze względu na swoją funkcję, występuje głównie w miejscach przyczepu komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, czyli w miejscach adhezji (Serrels A. i wsp., 2011).

Białko FAK składa się z ok. 1050 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 125 kDa. Kinaza ta zbudowana jest z dwóch domen niekatalitycznych, które są fragmentem N- i C-końcowym oraz z domeny katalitycznej, która umieszczona jest pomiędzy nimi. W skład N-końcowej domeny niekatalitycznej wchodzi fragment FERM, którego funkcją *in vitro* jest wiązanie z podjednostkami β -integryny. W C-końcowej domenie niekatalitycznej znajduje się region zwany FAT, zbudowany ze 150 aminokwasów. Pośredniczy on w przyleganiu ogniskowym oraz posiada miejsce wiązania dwóch białek: paksyliny i taliny. Dwie sekwencje domeny C-

końcowej łączą się z paksyliną oraz jedna łączy się z taliną. Białko FAK zawiera również trzy sekwencje bogate w prolinę: PR-1, PR-2 i PR-3 (rycina 7) (Totoń E. i Rybczyńska M., 2007; Arold S.T., 2011).

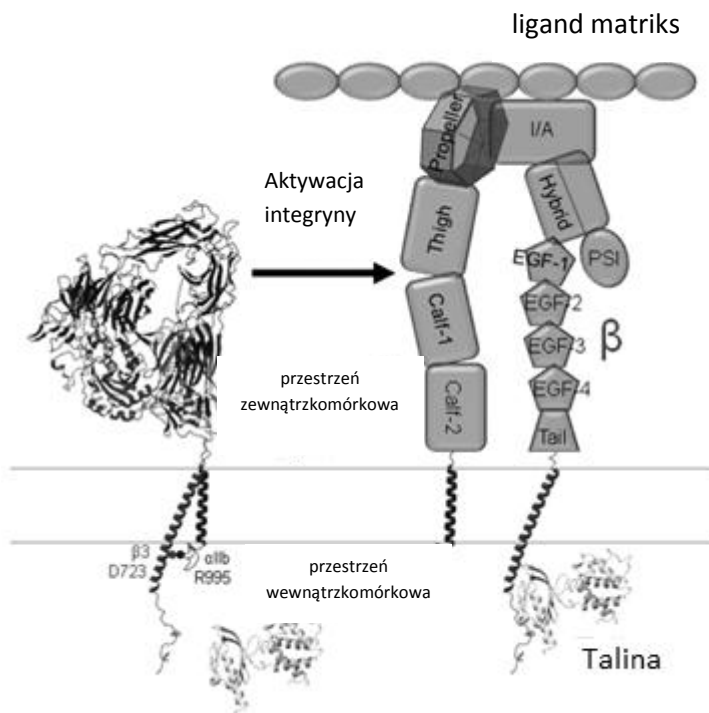


Rycina 7. Struktura FAK wg. Hind L. i wsp., 2009. FERM – region aminowy kinazy ognisk adhezji, PR-1,-2,-3 – sekwencje bogate w prolinę, P – reszta fosforanowa, FAT – region uczestniczący w ogniskowym przyleganiu, PLC γ – fosfolipaza γ , p130^{Cas} – substrat dla Src, PI3K- kinaza fosfotydylo-3-inozytoli, RhoGEF- strukturalna domena czynników wymiany nukleotydu guaniny dla GTP-azo podobnych Rho/Rac/Cdc42, FRNK- FAK related non-kinase, PDGF- płytkowy czynnik wzrostu, GRB2- białko adaptorowe.

W odpowiedzi na adhezję komórki białko FAK ulega aktywacji, a następnie autofosforylacji miejsc zawierających tyrozinę, co prowadzi do jego przyłączenia do sygnałowych molekuł, Src, PI3K, PLC γ , GRB, powodując przekazanie sygnału (Scheswol D.M. i wsp., 2008; Stamatios E.T. i wsp., 2009). Kinaza FAK zaangażowana jest w ruchliwość komórek i ochronę ich przed apoptozą. Odgrywa szczególną rolę w wielu szlakach transdukcji sygnału. Białko to jest kluczowym regulatorem przeżycia, proliferacji, migracji oraz inwazji (Tureckova J. i wsp., 2009). Główną jego funkcją jest przekazywanie sygnału pochodzącego z receptorów integrynowych, biorących udział w adhezji, do wewnątrzkomórkowej kaskady białek (Zhao X. i Guan J.L., 2011). Związanie integryn z białkiem FAK prowadzi do jego fosforylacji, co umożliwia kontakt białka FAK z rodziną białek Src, Grb2 i PI3-K oraz ułatwia fosforylację białek Cas i paksyliny (Basuroy S. i wsp., 2010). Zwiększona przez kinazę ognisk adhezji motoryka komórek stanowi fundamentalną komponentę inwazji komórek nowotworowych. Zmiany w ekspresji białka FAK i fosforylacji jego tyrozyny związane są ze wzrostem przerzutowania nowotworu (Fan D.M. i Shi H.R., 2011).

1.6.2. Rodzina integryn i podjednostka $\beta 1$

Integryny należą do cząsteczek adhezyjnych CAM (ang. *Cell Adhesion Molecules*), odpowiedzialnych za zjawisko interakcji międzykomórkowej. Są to białka związane z błoną komórkową i pełnią rolę w adhezji, rozpoznawaniu i komunikowaniu na drodze komórka–komórka oraz komórka–składowe macierzy międzykomórkowej (Nagano M. i wsp., 2010). Integryny odgrywają istotną funkcję nie tylko w procesach fizjologicznych, takich jak ruchliwość komórki, proliferacja, różnicowanie, ale również w procesach patologicznych, biorąc udział w procesie nowotworzenia, poprzez metastazę komórek nowotworowych w wyniku zwiększenia proliferacji komórek nowotworowych, ich migracji i inwazji oraz angiogenezy (Desgrosellier J.S. i Cheresch D.A., 2010). Pod względem budowy, integryny stanowią heterodimery zbudowane z połączonych niekowalencyjnym wiązaniem łańcuchów α (o masie 130-210 kDa) oraz β (o masie 90-130 kDa). Podjednostka α odpowiedzialna jest za swoiste wiązanie z ligandem (Piwko-Czuchra A. i wsp., 2009), natomiast podjednostka β determinuje funkcje receptora integrynowego. Wyodrębniono 18 podjednostek α i 8 podjednostek β , które formują co najmniej 25 odmiennych par, tworząc integryny ze specyficznymi dla siebie ligandami (Sun W. i wsp., 2009) (rycina 8).



Rycina 8. Struktura integryny (wg. Anthis N. i wsp., 2009).

W adhezji komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej pośredniczą głównie integryny podrodziny $\beta 1$ i $\beta 3$. Najbardziej unikalną i fizjologicznie istotną rolą $\beta 1$ -integryn jest zdolność do zmiany ich właściwości wiązania z ligandem i właściwości sygnałowych. Integryny te mogą zmieniać swoje zdolności adhezji z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na jej stymulację, są zatem zdolne do zmiany transdukcji sygnału w celu regulacji podstawowych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, migracja, różnicowanie oraz ekspresja genów (Saito Y. i wsp., 2008). Integryny $\beta 1$ noszą nazwę bardzo późnych antygenów, VLA (very late antigen) lub CD 29. Zawierają wspólny łańcuch $\beta 1$, który może tworzyć heterodimery z dowolnymi, 12 podjednostkami α (Lahlou H. i Muller W.J., 2011). Integryny te biorą udział w wiązaniu komórek z macierzą pozakomórkową. Regulacja dojrzewania $\beta 1$ -integryny kontroluje zarówno adhezję ECM – komórka, adhezję komórka – komórka, jak i inne procesy komórkowe. Udowodniono, że m.in. transformujący czynnik wzrostu beta, TGF β , powoduje przyspieszenie dojrzewania $\beta 1$ -integryny, a tym samym zwiększenie jej poziomu na powierzchni komórki, co w konsekwencji ułatwia adhezję (Sun W. i wsp., 2009).

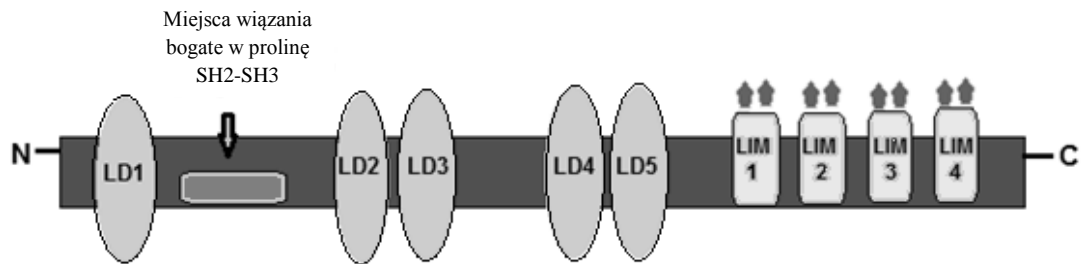
Niektóre heterodimeryczne integryny ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) są związane z zahamowaniem proliferacji komórek raka piersi, natomiast inne heterodimery z progresją nowotworową ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$) (Shin S. i wsp., 2012). W komórkach metastatycznych ekspresji ulegają głównie podjednostki $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha \nu$, $\beta 1$ i $\beta 3$, dlatego uważa się, że mogą stanowić indykatory przerzutowania (Rathinam R. i wsp., 2010).

1.6.3. Paksylina

Paksylina jest białkiem wiążącym FAK i kinazę związaną z integryną, ILK (*ang. integrin-linked kinase*). Białko to wiąże się bezpośrednio do cytoplazmatycznego ogona podjednostki $\alpha 4$ integryny, co umożliwia migrację komórek (Harburger D.S., Calderwood D.A., 2009).

Paksylina to adaptorowa cząsteczka sygnałowa, której masa cząsteczkowa wynosi 68 kDa (Cai X., i wsp., 2006). Białko to jest zbudowane z fragmentu C-końcowego, który zawiera cztery domeny : *Lin-11*, *Isl-1*, *Mec-3*, inaczej zwane LIM, odpowiedzialne za interakcje białko–białko (rycina 9). Domeny LIM2 i LIM3 biorą udział w dopasowywaniu białek do ognisk adhezji, a fosforylacja tych domen pomaga regulować tą funkcję. Domeny LIM służą również jako miejsca wiązania kilku strukturalnych i regulatorowych białek, m.in. tubuliny. Interakcje te pełnią istotną rolę w kontrolowaniu dynamiki ognisk adhezji (Deakin N.O., Turner C.E., 2008). Fragment N-końcowy paksyliny posiada pięć domen bogatych w leucynę (LD) oraz miejsce wiązania bogate w prolinę, zdolne do oddziaływań z domenami Src (Robertson L.K.

i Ostergaard H.L., 2011).



Rycina 9. Struktura paksyliny (wg. Jagadeeswaran R. i wsp., 2008). LD - domeny bogate w leucynę, LIM - domeny składające się z Lin-11, Isl-1, Mec-3.

Paksyлина jest jedną z kluczowych komponent w obrębie ognisk przylegania. Bierze udział w formowaniu strukturalnego wiązania między macierzą zewnątrzkomórkową a cytoszkieletem aktynowym. Udowodniono, że paksyлина wchodzi w interakcję z niektórymi onkoproteinami, takimi jak v-Src lub bcr-abl (Turner C.E., 2000). Jako białko centralne w obrębie ogniska przylegania, paksyлина zachowuje się jak białko podporowe, które podczas ekspozycji na sygnały zapewnia liczne miejsca przyczepu do błony plazmatycznej. Ponadto, stanowi platformę dla białkowych kinaz tyrozynowych, m.in. FAK i Src, które są aktywowane w wyniku stymulacji adhezji bądź czynnika wzrostu. Udowodniono, że komórki nie zawierające paksyliny, tworzą nieprawidłowe ogniska adhezji. Powoduje to obniżenie: fosforylacji tyrozyn białka FAK i p130Cas, aktywacji mitogennych kinaz białkowych, stopnia rozprzestrzeniania oraz migracji komórek (Jagadeeswaran R. i wsp., 2008).

2. CEL PRACY

Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów wśród kobiet w Polsce i na świecie. Stanowi także pierwszą onkologiczną przyczynę śmierci wśród pacjentek. Jednym z najpoważniejszych problemów w walce z nowotworem są zaburzenia migracji i związana z tym procesem inwazja komórek nowotworowych przez bariery tkankowe. Za eliminację komórek ulegających transformacji nowotworowej jest odpowiedzialna apoptoza, której dysregulacja odgrywa kluczową rolę w kancerogenezie. Z kolei inny typ śmierci komórki, autofagia jest związana z zarówno z promocją jak i zahamowaniem nowotworzenia. Pomiędzy tymi ścieżkami istnieje korelacja, a zrozumienie szczegółów molekularnych mechanizmów leżących u podstaw relacji pomiędzy apoptozą i autofagią w komórkach nowotworowych, mogłoby wpłynąć na udoskonalanie dostępnych metod leczenia tej choroby.

Przedmiotem badań w niniejszej pracy jest mechanizm działania czterech syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi MCF7 oraz MDA-MB-231, różniących się odpowiednio obecnością specyficznych receptorów oraz stopniem inwazyjności. Pożądanym efektem terapii przeciwnowotworowej jest unicestwienie komórek zmienionych nowotworowo, bez ingerencji w procesy biochemiczne zachodzące w komórkach prawidłowych, w związku z tym aktywność biologiczną wybranych pochodnych zbadano także względem komórek prawidłowych gruczołu piersiowego, MCF-12A.

Mechanizm działania syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (OA) postanowiono zbadać poprzez:

- ocenę aktywności cytotoksycznej względem badanych komórek ;
- ocenę udziału określonych białek w indukcji śmierci komórki na drodze apoptozy;
- analizę poziomów markera oraz regulatora procesu autofagii;
- analizę wpływu na modulację procesu migracji i inwazji komórek nowotworowych;
- ocenę możliwości oddziaływania na poziomie kinaz aktywowanych mioginem (MAPK) oraz czynników transkrypcyjnych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Podłoża, bufory, odczynniki, przeciwciała

- **Podłoża wzrostowe**

A. RPMI 1640 (PAA),

10% FBS (PAA),

0,1 µg/ml gentamycyna (Polfa Tarchomin);

B. Ham's F-12 / DMEM (PAA)

10 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich),

500 ng/ml hydrokortyzon (Sigma-Aldrich),

20 ng/ml hEGF (Sigma-Aldrich)

- **Podłoże do mrożenia**

70% FBS (PAA)

25% RPMI 1640 (PAA)

5% DMSO (Sigma-Aldrich)

- **Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS) pH 7,4 :**

140 mM NaCl (POCH)

2,7 mM KCl (POCH)

4,6 mM Na₂HPO₄ (POCH)

1,7 mM NaH₂PO₄ (POCH)

BUFORY

RODZAJ BUFORU pH	DO PRÓBY 6,8	DO ELEKTROFOREZY 8,3	DO TRANSFERU 8,1	TBS 8,0	TBST 7,5	DO STRIPINGU 6,8
TRIS (mM)	500	25	25	100	500	10
SDS (%)	20	0,1	0,1	-	-	0,1
NaCl (M)	-	-	-	1,5	1,5	-
Glicyna (mM)	-	192	192	-	-	-
Glicerol (%)	80	-	-	-	-	-
β-merkaptoetanol (%)	2	-	-	-	-	0,7
Błękit bromofenolowy (%)	20	-	-	-	-	-
Tween 20 (%)	-	-	-	-	1	-

BUFORY DO LIZY

OZNACZANE BIAŁKO pH	LC3 8,0	BEKLINA 1	NFκB (p65), p53 FRAKCJA CYTOZOLOWA 7,4	NFκB (p65), p53 FRAKCJA JĄDROWA 7,4	POZOSTAŁE BIAŁKA 8,0
KCl (mM)	-	-	10	-	-
NaCl (mM)	150	140	-	420	150
TRIS (mM)	50	10	-	-	50
SDS (%)	0,1	0,1	-	-	0,1
NP40 (%)	1	-	-	-	1
Triton X-100 (%)	-	1	-	-	-
EDTA (mM)	1	1	-	0,2	-
Deoksycholan sodu (%)	0,5	0,1	-	-	-
HEPES (mM)	-	-	10	20	-
MgCl ₂ (mM)	-	-	1,5	1,5	-
Aprotynina (mg/ml)	4	4	5	5	4
Leupeptyna (mg/ml)	4	4	5	5	4
NaF (mM)	1	1	-	-	1
PMSF (mM)	100	100	100	100	100
Na ₃ VO ₄ (mM)	1	1	-	-	1

ODCZYNNIKI

- 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol zasadowy (TRIZMATM-base; Tris), Albumina surowicy wołowej (BSA), Aprotynina, Dimetylosulfotlenek (DMSO), kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), Trypsyna-EDTA, Leupeptyna, Na₃VO₄, Nonidet P-40 (NP-40), Siarczan dodecyłu (SDS), Triton X-100, odczynnik Bradford, beta-merkaptotoetanol, Tween-20, bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowy (MTT), Tetrametyletylendiamina (TEMED), jodek propidyny, RNaza, Mowiol 4-88; kamptotecyna– Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA;
- Odtłuszczone mleko w proszku – SM Mlekovita, Wysokie Mazowieckie, PL;
- Wzorzec masy białek TriChromRangerTMPrestained Protein Mix, filtr PVDF, odczynnik SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat oraz film CL-X PosureTM – Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA;
- aceton, błękit bromofenolowy, cytrynian sodu, NaCl, KCl, Na₂CO₃, NaF, Na₂HPO₄ x 12 H₂O, NaH₂PO₄ x H₂O, NaOH, metanol, HCl, glicyna, glicerol, formalina – Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, PL;
- spirytus skażony hibitanem – Cefarm, Poznań, PL ;
- BD BioCoat Tumor Invasion System, kalceina - Becton Dickinson, NJ, USA;

PRZECIWCIAŁA

	NAZWA PRZECIWCIAŁA	RODZAJ PRZECIWCIAŁA	MASA CZĄSTECZKOWA [kDa]	PRODUCENT	
PRZECIWCIAŁA I-RZĘDOWE	Anty-bax	królicze	26	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-bcl-2	królicze	24	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-beklina 1	królicze	60	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-FAK	królicze	120	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-GAPDH	królicze	37	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty- Integryna β 1	królicze	113	Abcam	
	Anty-JNK1/2	królicze	46/54	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-MAP LC3	królicze	16	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-NF κ B (p65)	królicze	65	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-paksylina	mysie	68	BD Biosciences	
	Anty- PARP1/2	królicze	116	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-PCNA	królicze	36	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-p38	królicze	38	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-p53	królicze	53	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-prokaspaza-3	królicze	32	Santa Cruz Biotechnology	
	Anty-prokaspaza-8	mysie	57	Cell Signaling Technology	
	Anty-prokaspaza-9	królicze	47	Cell Signaling Technology	
	PRZECIWCIAŁA II-RZĘDOWE	kozy anty-królicze	Znakowane HRP		Santa Cruz Biotechnology
		Królicze anty-mysie	Znakowane HRP		Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor 488 kozie anty-królicze		Znakowane FITC		Molecular Probe	

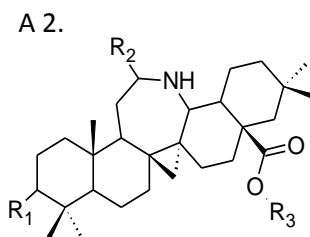
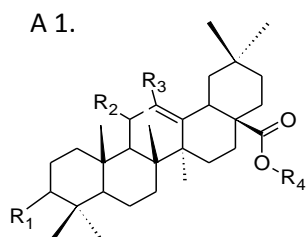
3.2. Badane związki

W badaniach wykorzystano cztery syntetyczne pochodne kwasu oleanolowego:

- 28→13 lakton kwasu 12 α -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego – Br-HIMOLID
- ester metylowy kwasu 3,11-dioksioolean-12-en-28-owego – DIOXOL
- ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-11-oksoolean-12-en-28-owego – HIMOXOL
- ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-12-okso-12a-aza-C-homoolean-28-owego - HIMOXAZOL.

Pochodne kwasu oleanolowego zsyntetyzowano w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (dr Barbara Bednarczyk-Cwynar, pod kierunkiem prof. dr hab. Lucjusza Zaprutko). Czystość związków sprawdzono metodami chromatograficznymi (chromatografia cienkowarstwowa (TLC) i kolumnowa; dla każdego związku otrzymano widma: IR, MS, ¹H NMR, ¹³C NMR). Kwas oleanolowy zastosowany w badaniach jako związek wzorcowy, izolowany z ziela jemioły, otrzymano z Zakładów Zielarskich „Kłęka” w Nowym Mieście nad Wartą. Czystość chemiczną tego związku sprawdzono na podstawie przemian temperatury topnienia oraz techniką TLC.

Modyfikacje kwasu oleanolowego polegały na wprowadzeniu dodatkowych grup funkcyjnych w strukturę związku macierzystego, w pozycji C3, C11 (ugrupowania ketonowego i hydroksyiminowego) oraz wprowadzeniu ugrupowania laktonowego, atomu bromu w pozycji C12, pierścienia siedmioczłonowego, i estryfikacji grupy karboksylowej w pozycji C28 struktury OA. Związki do badań rozpuszczono w DMSO, otrzymując jednorodne roztwory o stężeniu wyjściowym 20 mM (DIOXOL i Br-HIMOLID) oraz 40 mM (OA, HIMOXOL, HIMOXAZOL). Podczas eksperymentów do hodowli komórek dodawano zawsze taką samą objętość związku rozpuszczonego w DMSO, którego stężenie końcowe nie przekraczało 0,25 %. Strukturę związków przedstawiono w tabeli 2.



Związek	Wzór sumaryczny	Podstawniki	Masa cząsteczkowa
A1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	R ₁ → OH	456,711 g
OA		R ₂ → H	
		R ₃ → H	
		R ₄ → H	
DIOXOL	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	R ₁ → =O R ₂ → =O R ₃ → H R ₄ → CH ₃	482,70 g
HIMOXOL	C ₃₁ H ₄₇ NO ₄	R ₁ → =N-OH R ₂ → =O R ₃ → H R ₄ → CH ₃	497,72 g
Br-HIMOLID	C ₃₀ H ₄₆ BrNO ₃	R ₁ → =N-OH R ₂ → H R ₃ → Br C28 → C13: ugr. laktonowe	548,17 g
A2	C ₃₁ H ₅₀ N ₂ O ₄	R ₁ → =O	514,75 g
HIMOXAZOL		R ₂ → =O R ₃ → CH ₃	

Tabela 2. Schemat struktury pochodnych kwasu oleanolowego (A1) i HIMOXAZOL (A2).

3.3. Linie komórkowe

Badania przeprowadzono na dwóch liniach komórek raka piersi, MCF7 i MDA-MB-231, zakupionych z kolekcji ATCC. Charakterystykę badanych komórek przedstawiono poniżej.

MCF7 - komórki nabłonkowe ludzkiego raka piersi, adherentne, posiadające receptory estrogenowe, progesteronowe oraz charakteryzujące się obecnością mutacji w genie kodującym białko egzekutorowe procesu apoptozy - kaspazę-3; w komórkach MCF7 występuje ekspresja onkogenu WNT7B; wzrost komórek jest hamowany przez TNF α . Czas podwojenia wynosi 29 godzin.

MDA-MB-231 - komórki nabłonkowe ludzkiego raka piersi, adherentne, estrogenowo- i progesteronowo- niezależne, charakteryzujące się wysoką inwazyjnością, związaną z obecnością receptorów nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) i Toll-podobnego receptora 2 (TLR-2). Czas podwojenia wynosi 36 godzin.

Celem oceny działania związków na komórkę prawidłową gruczołu piersiowego w badaniach wykorzystano komórki **MCF-12A**. Są to komórki nabłonkowe, wyizolowane od 60-letniej pacjentki rasy kaukaskiej, rosną adherentnie. Wykazują morfologię typową dla nabłonka luminalnego oraz charakteryzują się obecnością cytokeratyn 8, 14 i 18. Czas podwojenia wynosi 26 godzin.

3.3.1. Hodowle komórkowe

Warunki hodowli komórek

Wszystkie zabiegi na komórkach wykonywano w warunkach sterylnych pod komorą z laminarnym nawiewem, z użyciem sterylnego jednorazowego sprzętu. Komórki MCF7 i MDA-MB-231 hodowano zgodnie ze standardową procedurą w medium wzrostowym RPMI 1640, wzbogaconym w 10 % surowicę FBS. Komórki MCF-12A hodowano w medium wzrostowym Ham's F-12 / DMEM przygotowanym w proporcjach 1:1, zawierającym 5 % surowicę końską oraz insulinę (10 μ g/ml), hydrokortyzon (500 ng/ml) i hEGF (20 ng/ml). Po osiągnięciu monowarstwy komórki pasażowano.

Pasażowanie komórek

Po zapełnieniu przez komórki 80 % powierzchni płytki, przeprowadzano pasaż. Po usunięciu medium, komórki przemywano buforem PBS. W celu odtrawienia komórek od powierzchni hodowlanej, komórki traktowano trypsyną-EDTA i inkubowano w 37°C, 5 % CO₂, 5 minut. Po upływie tego czasu dodano świeże, ogrzane do 37°C podłoże wzrostowe i dokładnie mieszano. Liczbę komórek w zawiesinie liczono w kamerze Fuchsa-Rosenthala. Na nową płytkę

Petriego przenoszono odpowiednią objętość zawiesiny komórek i uzupełniano świeżym medium wzrostowym.

3.4. Przeżywalności komórek nowotworowych

Przeżywalność komórek zbadano wykorzystując test MTT. Jest to metoda skringowa, wykorzystywana do oceny aktywacji, proliferacji lub cytotoksyczności substancji chemicznej względem komórek. Test ten pozwala na wyznaczenie wartości IC_{50} , czyli takiego stężenia związku, które powoduje śmierć 50% komórek w danej populacji. Zasada tego testu opiera się na redukcji żółtej soli tetrazoliowej - bromku -[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazoliowego, MTT, do niebieskich kryształków formazanu, powstających wewnątrz komórki. Reakcja ta zachodzi dzięki obecności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej. Zastosowanie detergentu pozwala na solubilizację komórek, uwolnienie i rozpuszczenie zawartych w komórce kryształków. Powstałe zabarwienie mierzone spektrofotometrycznie jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek i odwrotnie proporcjonalne do siły działania badanego związku.

Badanie przeprowadzono na płytkach titracyjnych 96-studzienkowych. Do szeregu studzienek mikropłytki wprowadzono 200 μ l zawiesiny komórek ($2,5 \times 10^4$ /ml) i inkubowano 3 godziny (37°C , 5 % CO_2). Po upływie tego czasu do poszczególnych studzienek dodano związki w odpowiednich stężeniach (0,5-50 μM), przygotowanych w szeregu rozcieńczeń. Komórki inkubowano ze związkami 24 i 72 godziny. Po określonym czasie inkubacji dodano 20 μ l roztworu MTT, inkubowano kolejne 4 godziny, po czym dodano 100 μ l roztworu solubilizującego o temperaturze pokojowej. Po całonocnej inkubacji dokonano odczytu absorbancji na aparacie Labsystems Multiscan RC przy dwóch długościach fali: 570 i 690 nm. Przeżywalność komórek wyrażono w stosunku do komórek nie poddanych działaniu badanych związków. Eksperyment wykonano trzykrotnie w podwójnych powtórzeniach. Wartości IC_{50} zostały wyznaczone przy pomocy programu CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK).

3.5. Cykl komórkowy

Komórki w liczbie $2,5 \times 10^5$ / ml, po 16 godzinach, w fazie wzrostu traktowano badanymi związkami przez okres 24 godzin. Po inkubacji ze związkami, zdjęto medium i przepłukano PBS zawieszono w nim komórki (1000 obr/min, 5 min). Komórki przyłączone do podłoża przepłukano PBS, strypsynizowano i połączone z komórkami zebranymi z medium. Całość przepłukano dwukrotnie PBS, a następnie inkubowano przez godzinę z roztworem PBS, RNA-zy (10 mg/ml) i jodku propidyny (50 μg /ml). Analizę cytometryczną rozkładu komórek w populacji

przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego FACScan (Beckton Dickinson) w pracowni Zakładu Immunologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.6. Uzyskiwanie lizatów komórkowych

Hodowlę komórek przemyto dwukrotnie PBS (4°C), następnie potraktowano buforem lizującym. Lizę prowadzono na lodzie przez 30 minut, a następnie wirowano (10600 rpm, 30 min., 4°C). W otrzymanych ekstraktach oznaczono stężenie białka (mg/ml) za pomocą metody Bradford, następnie dodano bufor do próby (0,5 M TRIS, 80 % glicerol, b-merkaptioetanol, 20 % SDS), gotowano 5 minut w temp. 100°C i zamrożono.

3.7. Liza z frakcjonowaniem elementów subkomórkowych

W celu uzyskania frakcji cytozolowej, komórki poddano lizie zimnym buforem lizującym (10 mM Hepes (pH 7,4), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl i 5 mg/ml aprotyniny i 5 mg/ml leupeptyny) przez 5 min. Ekstrakt wirowano (2400 rpm, 15 minut, 4°C), zdjęto nadsącz zawierający białka cytozolowe i inkubowano na lodzie do momentu zakończenia lizy frakcji jądrowej. Otrzymany osad inkubowano 45 minut w buforze do lizy frakcji jądrowej (20 mM Hepes (pH 7,4) 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA oraz 5 mg/ml aprotyniny i 5 mg/ml leupeptyny), wirowano wraz z nadsączem uzyskanym po wirowaniu z buforem lizującym do uzyskania frakcji cytozolowej (14000 rpm, 45 minut, 4°C). W otrzymanych ekstraktach oznaczono stężenie białka (mg/ml) za pomocą metody Bradford, następnie dodano bufor do próby, gotowano 5 minut w temp. 100°C i zamrożono.

3.8. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford

Zasada tej metody polega na tworzeniu barwnego kompleksu pomiędzy barwnikiem zawartym w odczynniku Bradford, błękitem brylantowym Coomassie G-250 i białkiem. Powstający kompleks powoduje przesunięcie maksimum widma absorpcji z charakterystycznego dla barwnika 465 nm w stronę fal dłuższych i występuje przy długości fali 595 nm. Oznaczany spektrofotometrycznie poziom absorpcji jest wprost proporcjonalny do stężenia białka w badanej próbce (Bradford M.M., 1976).

W uzyskanych ekstraktach oznaczono stężenie białka stosując jako wzorzec albuminę wołową w stężeniu 1mg/ml. Pomiar stężeń wykonano przy długości fali $\lambda=595$ nm, przy użyciu spektrofotometru UV-VIS (Zeiss, Niemcy).

3.9. Elektroforeza, Western blot, immunoidentyfikacja

Uzyskane ekstrakty białek poddano pre-elektroforezie (80 V/ 10 minut) i elektroforezie (200 V, 37 minut) w 7,5-12 % żelu poliakrylamidowym z SDS. Następnie przeprowadzono transfer białek z żelu na membranę PVDF za pomocą techniki Western blot (150 mA, 90 minut). Membrany płukano kolejno buforami TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0) przez 5 minut oraz dwukrotnie TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) przez 10 minut. W celu uniknięcia nieswoistego wiązania przeciwciał do powierzchni membran, w kolejnym etapie membranę blokowano w buforze blokującym (5 % roztwór mleka w TBST) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membranę inkubowano przez noc w 4°C z I-rzędowym przeciwciałem, skierowanym przeciw badanemu białku. Po odpłukaniu niezwiązanego przeciwciała, membranę inkubowano z II-rzędowym przeciwciałem, znakowanym peroksydazą chrzanową, przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu drugorzędowych przeciwciał (5 x TBST i 1 x TBS) przeprowadzono wizualizację badanych białek z zastosowaniem zestawu ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). Wielkość ekspresji genu na poziomie białka odczytano w programie LabWorks wersja 4.6, przy użyciu systemu do obrazowania żeli i archiwizacji danych BioImaging Systems EpiChem3 Darkroom firmy UVP (UVP, Inc., Upland, CA, USA).

3.10. Immunofluorescencja

Zawiesinę komórek (2×10^4 /ml) nałożono na płytki 6-o studzienkowe zawierające szkiełka nakrywkowe i umieszczono w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Komórki potraktowano związkami przez okres 24 godzin, a następnie po upływie tego czasu przemyto dwukrotnie jałowym PBS i utrwalono przy użyciu 4 % p-formaldehydu. W celu permabilizacji błony, komórki poddano działaniu 0,1 % Tritonu X-100 w PBS, a następnie przepłukano trzykrotnie PBS. Po blokowaniu roztworem blokującym (BSA w PBS) zastosowano pierwszorzędowe przeciwciało skierowane przeciwko białku LC3 w rozcieńczeniu 1:200. Nadmiar przeciwciał odpłukano trzykrotnie PBS. Komórki inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem kozim anty-króliczym znakowanym izotiocyaninem fluoresceiny (FITC) w rozcieńczeniu 1:500. Szkiełka nakrywkowe przeniesiono na mikroskopowe szkiełka podstawowe. Wyznakowane komórki wizualizowano w programie LSM Image Browser przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego (Axiovert 200 M, firmy Carl Zeiss). Badania wykonano osobiście w pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.11. Inwazyjność komórek nowotworowych (BD BioCoat Tumor Invasion System)

Komórki w liczbie 1×10^5 / ml zawieszono w medium wzrostowym DMEM pozbawionym surowicy. Do górnej komory systemu nałożono 500 μ l zawiesiny komórek w ilości 5×10^4 , z kolei do komory dolnej dodano 750 μ l chemoatraktantu (surowicy FBS). Do zawiesiny komórek dodano związki w odpowiednich stężeniach. Kontrolę stanowiły komórki nie traktowane związkami. Komórki inkubowano w systemie 24 godziny (37°C , 5 % CO_2), a następnie po upływie tego czasu, ostrożnie usunięto medium z górnej komory i dodano kalceinę AM (4 $\mu\text{g/ml}$). Komórki inkubowano z fluorochromem przez 1 godzinę (37°C i 5 % CO_2). Pomiar fluorescencji wykonano przy długościach fal 494/517 (Ex/ Em), z użyciem czytnika fluorescencji Synergy 2 (Biokom). Zahamowanie inwazji komórek obu linii raka piersi (kontrola) i komórek traktowanych związkami wyrażono jako średnią wartość względnych jednostek fluorescencji (RFU) komórek, które przekroczyły membranę pokrytą Matrigel w kierunku chemoatraktantu, pomnożoną przez 100.

3.12. Migracja komórek z wykorzystaniem scratch test

Zawiesinę komórek (5×10^5 / ml) nałożono na 20 mm płytki hodowlane i umieszczano w inkubatorze (37°C , 5 % CO_2). Po 16 godzinnym wzroście przy użyciu jałowej końcówki wykonano kreskę, usuwając część komórek, uzyskując powierzchnię wolną od komórek. W celu usunięcia zeszkrobanych komórek, hodowlę przepłukano dwukrotnie jałowym PBS, a następnie dodano podłoże wzrostowe. Bezpośrednio po dodaniu podłoża komórki potraktowano związkami w odpowiednich stężeniach i dokonano obserwacji mikroskopowych (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Komórki nie traktowane związkami stanowiły próbę kontrolną. Po 24 godzinach (37°C , 5 % CO_2) komórki poddano kolejnej obserwacji mikroskopowej.

3.13. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Graph Pad Prism 5 (San Diego, CA), przyjmując $p < 0,05$. Wszystkie wyniki otrzymane metodą Western blot zostały znormalizowane względem produktu genu referencyjnego, GAPDH.

4. WYNIKI

4.1. Wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na przeżywalność komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego

Do oceny wpływu pochodnych kwasu oleanolowego: Br-HIMOLID, DIOXOL, HIMOXOL i HIMOXAZOL na przeżywalność komórek prawidłowych gruczołu piersiowego MCF-12A oraz komórek nowotworowych MCF7 i MDA-MB-231 zastosowano test MTT. Wyniki przedstawiono na rycinie 10. Wartości IC_{50} , odpowiadające stężeniu związku powodującemu śmierć 50 % komórek i będące miarą skuteczności działania substancji chemicznej dla wszystkich badanych związków przedstawia tabela 3.

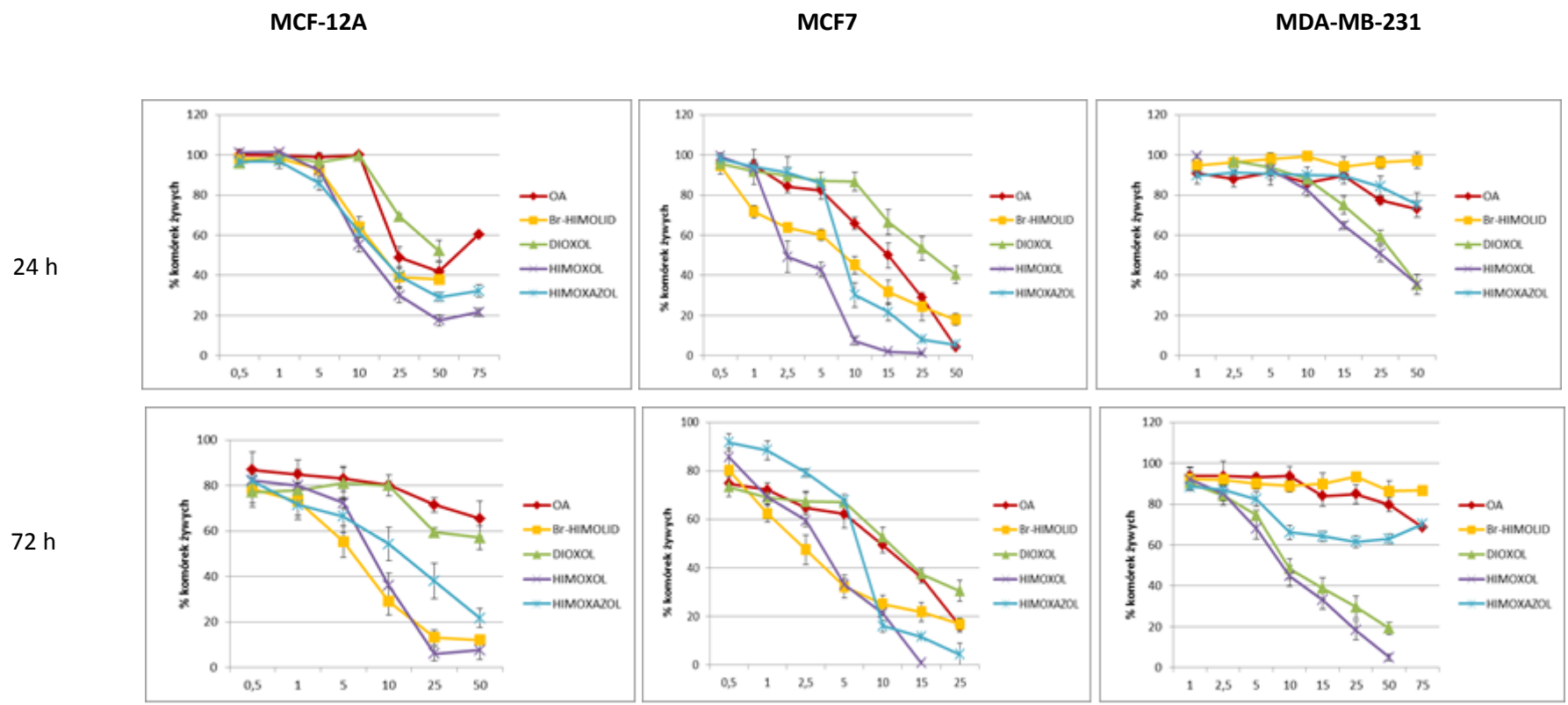
Komórki prawidłowe gruczołu piersiowego MCF-12A były niewrażliwe na działanie OA oraz DIOXOL. Natomiast, zaobserwowano spadek ich przeżywalności po potraktowaniu pozostałymi pochodnymi OA.

W wyniku 24-godzinnego traktowania komórek prawidłowych gruczołu piersiowego i nowotworowych (MCF7) zaobserwowano wyższą efektywność działania Br-HIMOLID, HIMOXOL i HIMOXAZOL względem komórek nowotworowych. Wartości te dla komórek MCF7 były odpowiednio 3-, 8, 3- razy niższe w porównaniu do wartości IC_{50} otrzymanych dla komórek prawidłowych. Podobną tendencję zaobserwowano w wyniku traktowania tych komórek związkami w czasie 72 godzin (wartości IC_{50} dla Br-HIMOLID, HIMOXOL, i HIMOXAZOL odpowiednio 2, 3, 2-krotnie niższe dla komórek MCF7, w porównaniu do komórek MCF-12A).

Kwas oleanolowy oraz Br-HIMOLID i HIMOXAZOL nie wpływały na przeżywalność komórek MDA-MB-231. Wartość IC_{50} otrzymana po 24-godzinnym traktowaniu komórek HIMOXOL była niższa od wartości IC_{50} uzyskanej dla komórek prawidłowych (odpowiednio 21,08 μ M i 25,7 μ M; różnica znamionna statystycznie; $p < 0,05$), co wskazuje na większą efektywność działania związku na komórki nowotworowe estrogenowo-niezależne. Ponadto wartość IC_{50} dla tego związku była 7-krotnie wyższa w komórkach MDA-MB-231 w porównaniu z komórkami MCF7, charakteryzującymi się obecnością receptora estrogenowego (3,22 μ M).

Uzyskane wartości IC_{50} stanowiły podstawę zakwalifikowania do dalszych badań oksymu - HIMOXOL, który spośród badanych pochodnych OA w czasie 24 godzin działania wykazał najwyższą efektywność względem badanych komórek nowotworowych obu linii. Drugim z wybranych związków charakteryzującym się porównywalnym IC_{50} do HIMOXOL dla komórek MCF7 jest lakton - Br-HIMOLID, wykazujący brak oddziaływania w zakresie stężeń do 50 μ M na wysoko inwazyjne, nie wykazujące ekspresji receptora estrogenowego komórki MDA-MB-231.

We wszystkich badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy na komórkach MDA-MB-231, zastosowano stężenia OA i Br-HIMOLID niższe i równe 50 μ M.



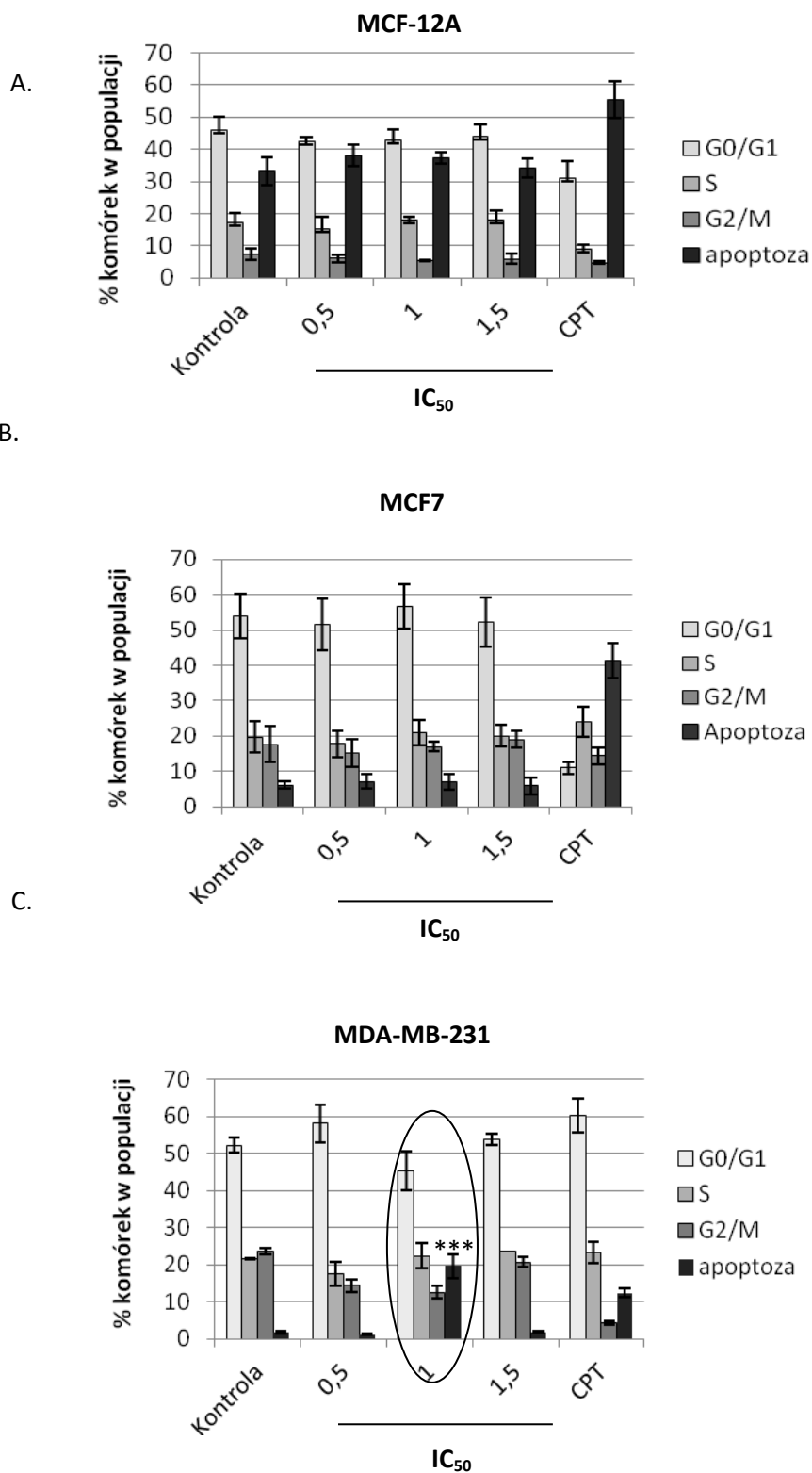
Rycina 10. Przeżywalność komórek MCF-12A, MCF7 i MDA-MB-231 potraktowanych kwasem oleanolowym oraz jego pochodnymi w czasie 24 i 72 godzin. Eksperyment wykonano trzykrotnie w dwóch powtórzeniach +/- S.D. ; $p < 0,05$.

Linia komórkowa \ Związek	czas [h]	IC ₅₀ +/- s.d. [μM]				
		OA	Br-HIMOLID	DIOXOL	HIMOXOL	HIMOXAZOL
MCF-12A	24	>50	20,4+/-0,57	>50	25,7+/-0,98	21,31+/-1,79
	72	>50	3,46+/-0,09	>50	4,29+/-0,51	7,49+/-0,69
MCF7	24	12,7+/-0,45	6,58+/-0,74	30,45+/-2,32	3,22+/-0,42	7,18+/-0,39
	72	5,13+/- 0,51	1,78+/-0,22	5,85+/-0,50	1,48+/-0,31	3,85+/-0,47
MDA-MB-231	24	>50	>50	33,18+/-1,15	21,08+/-0,24	>50
	72	>50	>50	13,44+/-1,19	7,33+/-0,79	>50

Tabela 3. Wartości IC₅₀ dla komórek MCF-12A, MCF7 i MDA-MB-231 potraktowanych kwasem oleanolowym oraz jego pochodnymi w czasie 24 i 72 godzin. Przedstawione wyniki są wartościami średnimi z trzech niezależnych eksperymentów, wykonanych w dwóch powtórzeniach +/- SD; p<0,05.

4.2. Wpływ OA, Br-HIMOLID i HIMOXOL na cykl komórkowy komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego

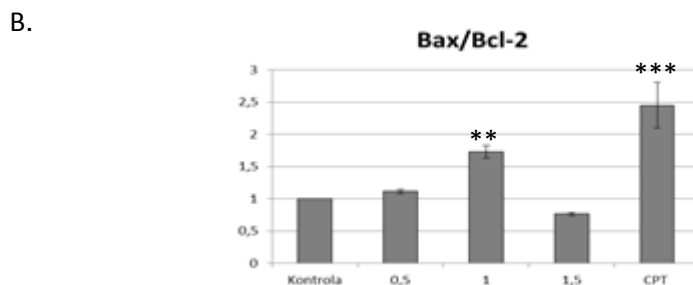
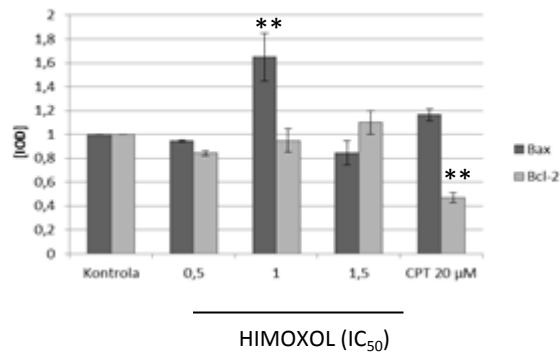
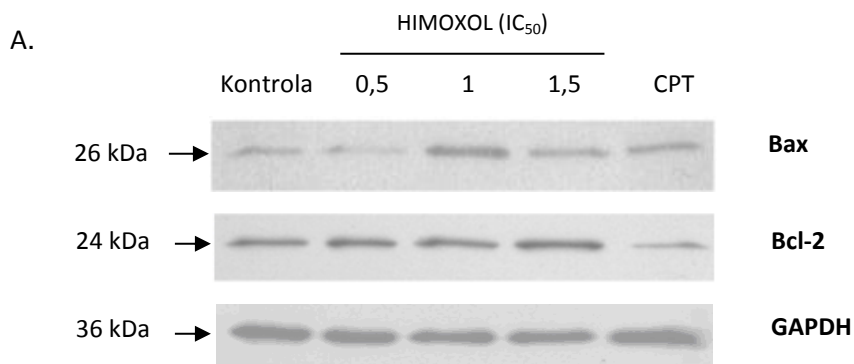
Celem uzyskania informacji, jaki jest rozkład komórek w populacji pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu oraz czy wybrane pochodne kwasu oleanolowego indukują proces apoptozy, w kolejnym etapie badań przeprowadzono w komórkach prawidłowych gruczołu piersiowego oraz komórkach raka piersi ocenę cyklu komórkowego i obecności apoptozy techniką cytometrii przepływową z zastosowaniem jodku propidyny. Jako kontrolę indukcji apoptozy wykorzystano kamptotecynę. Analiza cyklu komórkowego komórek MCF-12A oraz MCF7 nie wykazała istotnego wpływu OA i jego pochodnych na liczbę komórek w poszczególnych fazach oraz obecności komórek apoptotycznych w porównaniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (wyników nie przedstawiono w formie wykresów). Natomiast w badaniach przeprowadzonych na komórkach MDA-MB-231 wykazano indukcję apoptozy (~ 20%) wywołaną przez HIMOXOL tylko w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} ($p < 0,05$) (rycina 11).



Rycina 11. Analiza cytometryczna faz cyklu oraz obecności komórek apoptotycznych. Komórki MCF-12A (A), MCF7 (B) oraz MDA-MB-231 (C) potraktowane HIMOXOL w czasie 24 godzin. $n=3$; $\bar{x} \pm SD$; $p<0,05$ w stosunku do kontroli.

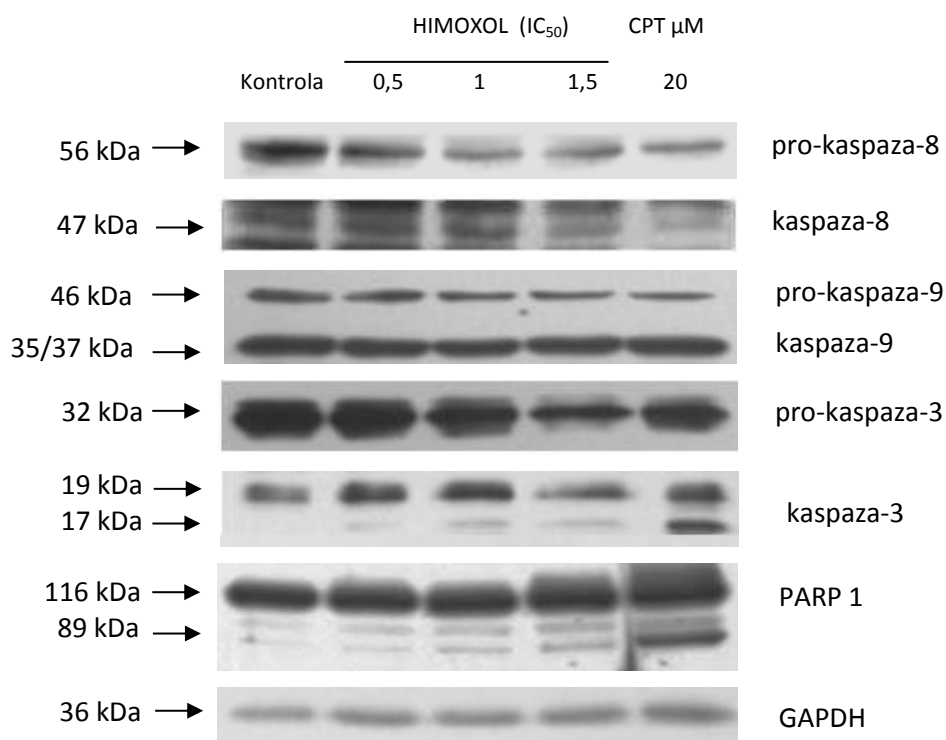
4.3. Wpływ HIMOXOL na poziom białek związanych z procesem apoptozy w komórkach MDA-MB-231

Aby wyjaśnić wykazaną aktywność proapoptotyczną HIMOXOL względem komórek MDA-MB-231, ocenie poddano poziom białek Bax i Bcl-2 oraz przedstawiono ich wzajemny stosunek decydujący o aktywności pro- bądź antyapoptotycznej (rycina 12). W komórkach potraktowanych badaną pochodną wykazano w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} wzrost poziomu białka proapoptotycznego Bax (~ 60 %; $p < 0,05$).



Rycina 12. Analiza WB wpływu HIMOXOL na poziom Bax i Bcl-2 w komórkach MDA-MB-231 w czasie 24 godzin. B. Stosunek białek Bax do Bcl-2 w komórkach potraktowanych HIMOXOL. $n=3$; $\bar{x} \pm SD$; $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Celem zbadania, którą ścieżką sygnałową komórki MDA-MB-231 są kierowane do apoptozy, przeprowadzono ocenę poziomu białkowych wykładników procesu apoptozy: kaspazy-8, kaspazy-9 oraz kaspazy-3 (rycina 13). Analiza WB wykazała spadek poziomu pro-kaspazy-8 (o 50%) oraz pro-kaspazy-3 (o 40%), wraz ze wzrostem ich aktywnych form -odpowiednio o 50% i 40%, co świadczy o zaangażowaniu drogi zewnętrznej w indukcję procesu apoptozy w badanych komórkach. Ponadto, przeprowadzona analiza poziomu enzymu naprawy uszkodzeń DNA, PARP1, wykazała obniżenie poziomu całkowitej formy tego białka (~15%) z obecnością podwyższonego poziomu rozciętego fragmentu.



Rycina 13. Wpływ HIMOXOL na poziom białkowych wykładników procesu apoptozy w komórkach MDA-MB-231. Przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów. GAPDH – marker ilości nałożonego białka.

Wyniki przeprowadzonych badań wyjaśniają mechanizm zaobserwowanego wzrostu odsetka komórek apoptotycznych w wyniku potraktowania komórek estrogenowo-niezależnych pochodną hydroksyiminową OA (IC₅₀). Dodatkowo zaobserwowano spadek syntezy białka inicjatorowego szlaku zewnętrznego apoptozy – kaspazy-8 oraz białka egzekutorowego, kaspazy-3 wraz z aktywacją substratu dla tego białka, PARP-1, po potraktowaniu komórek najwyższym stężeniem związku (1,5 IC₅₀).

Aby wyjaśnić współistnienie innego mechanizmu cytotoksycznego działania pochodnych OA względem badanych komórek, w kolejnym etapie pracy ekperymentalnej postanowiono sprawdzić zdolność badanych związków do indukcji alternatywnej ścieżki śmierci komórki, autofagii.

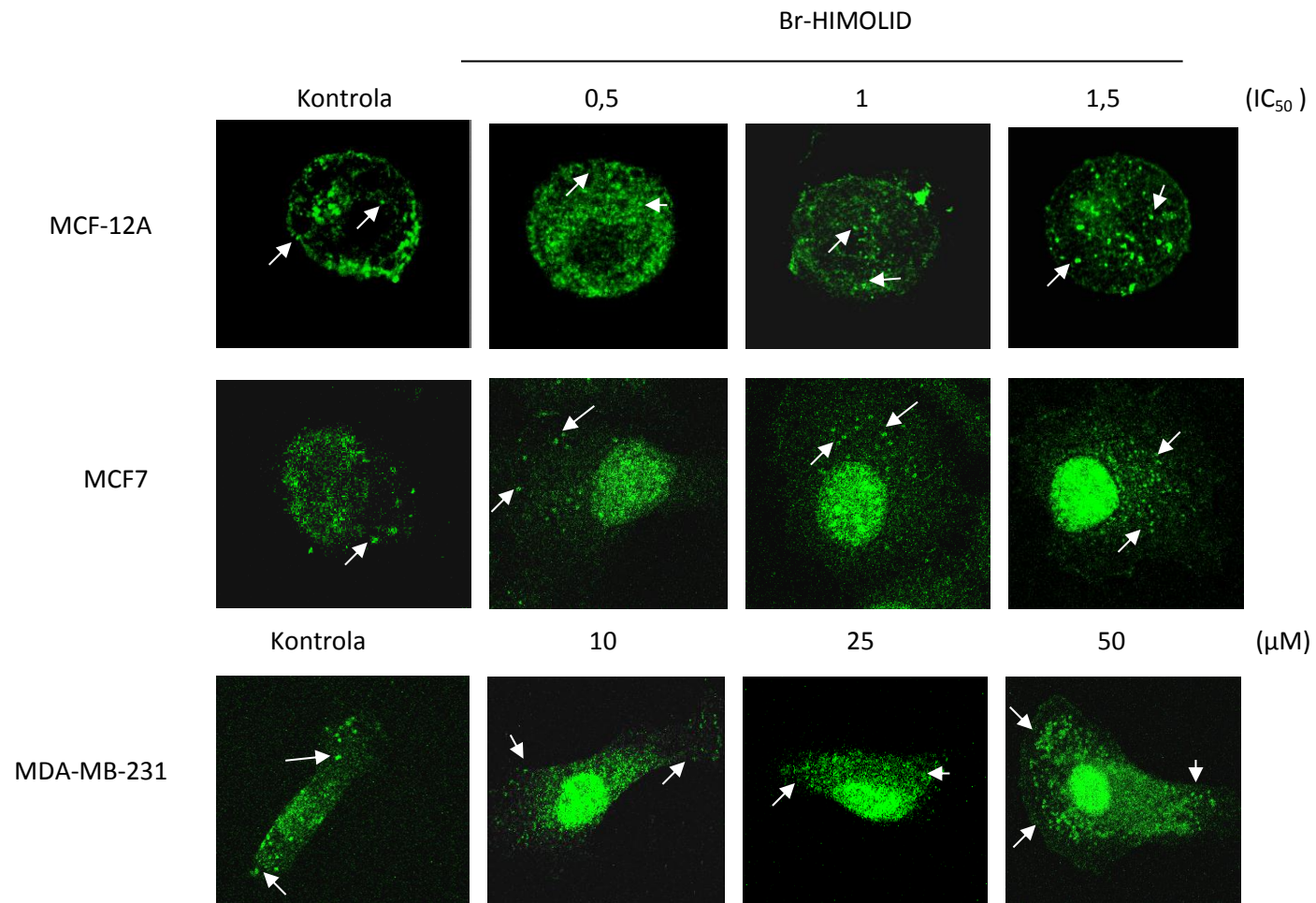
4.4. Wpływ OA, Br-HIMOLID i HIMOXOL na indukcję autofagii w komórkach prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego

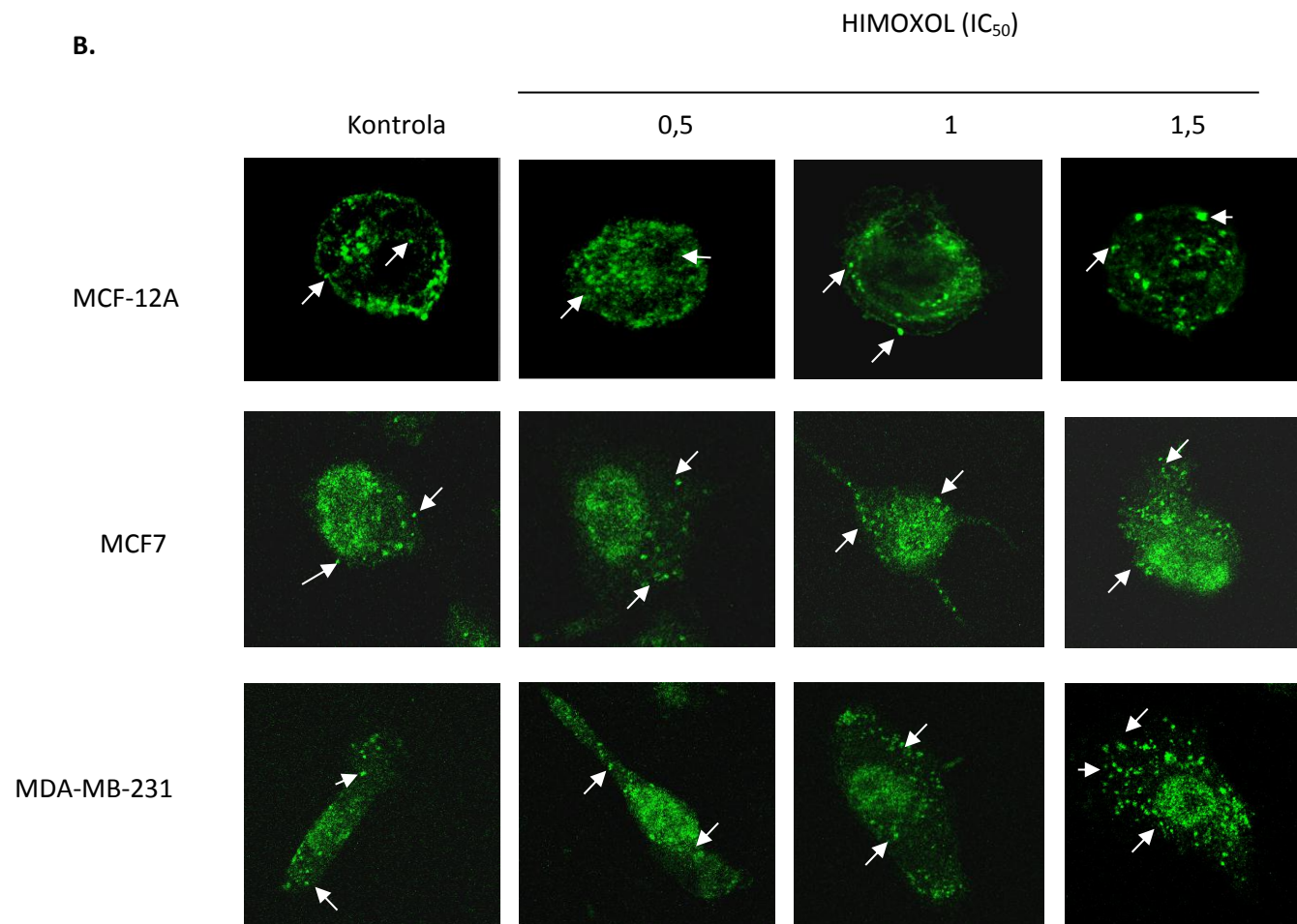
4.4.1. Ocena obecności i lokalizacji autofagosomów - mikroskopia konfokalna

Badanie zdolności związków do indukcji autofagii przeprowadzono techniką mikroskopii konfokalnej, pozwalającą na ocenę występowania i lokalizacji autofagosomów. W obrazie mikroskopowym autofagosomy, wybarwione fluorochromem - izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), związanym z drugorzędowym przeciwciałem, skierowanym przeciwko specyficznemu markerowi autofagii- białku LC3, były widoczne w postaci fluoryzujących punktów. Analiza obrazu fluorescencyjnego polegała na określeniu wzrostu punktowego gromadzenia się znakowanego białka LC3, co odpowiadało formowaniu się struktury autofagosomu.

W komórkach prawidłowych gruczołu piersiowego nie wykazano indukcji autofagii po potraktowaniu kwasem oleanolowym i jego pochodnymi. Natomiast autofagosomy zaobserwowano w największej ilości w komórkach nowotworowych, po 24-godzinnej inkubacji komórek z Br-HIMOLID i HIMOXOL w najwyższym zastosowanym stężeniu związków (rycina 14 A i B).

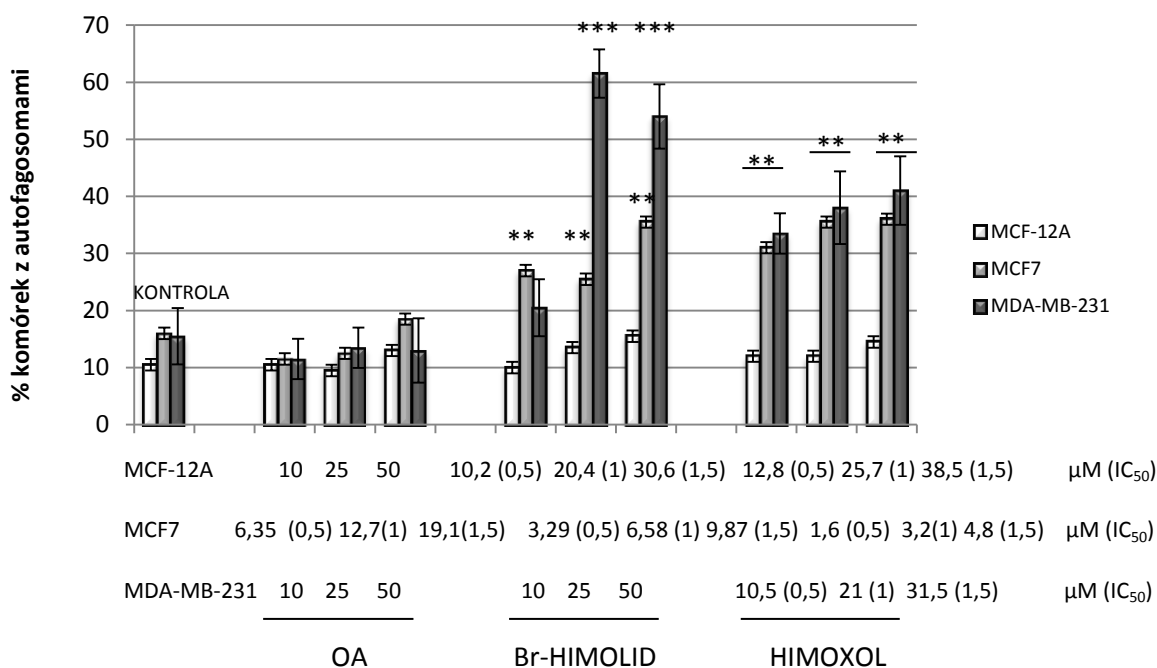
A.





Rycina 14. Wizualizacja autofagosomów w komórkach MCF-12A, MCF7, MDA-MB-231 potraktowanych Br-HIMOLID (A) i HIMOXOL (B). Wykorzystano marker autofagii - białko LC3 (obiektyw 100x).

Komórki po inkubacji ze związkami poddano mikroskopowej analizie ilościowej. Liczbę komórek z obecnymi autofagosomami policzono w populacji 100 komórek. Wynik tej analizy przedstawia rycina 15.



Rycina 15. Analiza liczby komórek MCF-12A, MCF7 oraz MDA-MB-231, wykazujących cechy autofagii po potraktowaniu OA, Br-HIMOLID i HIMOXOL.

n=2; \bar{x} +/- SD; p<0,05 w stosunku do kontroli.

Po potraktowaniu komórek prawidłowych MCF-12A kwasem oleanolowym i jego pochodnymi nie wykazano znamiennego wpływu związków na aktywację procesu autofagii. Z kolei inkubacja komórek raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 z pochodnymi oksymową (HIMOXOL) oraz laktonową (Br-HIMOLID) spowodowała indukcję syntezy markera autofagii, białka LC3-II. Komórki nowotworowe obu linii po potraktowaniu HIMOXOL wykazały zależny od stężenia wzrost odsetka autofagii o 15-30 % w stosunku do komórek kontrolnych. Po potraktowaniu komórek MCF7 Br-HIMOLID zaobserwowano 10-20 % wzrost liczby autofagosomów, natomiast w komórkach estrogenowo-niezależnych (MDA-MB-231) wzrost ten był najwyższy i wynosił 55-60 %.

Otrzymane wyniki eksperymentu potwierdzają brak znamiennego wpływu związków na aktywację procesu autofagii w komórkach prawidłowych oraz znaczącą indukcję tego procesu przez Br-HIMOLID i HIMOXOL w komórkach raka piersi.

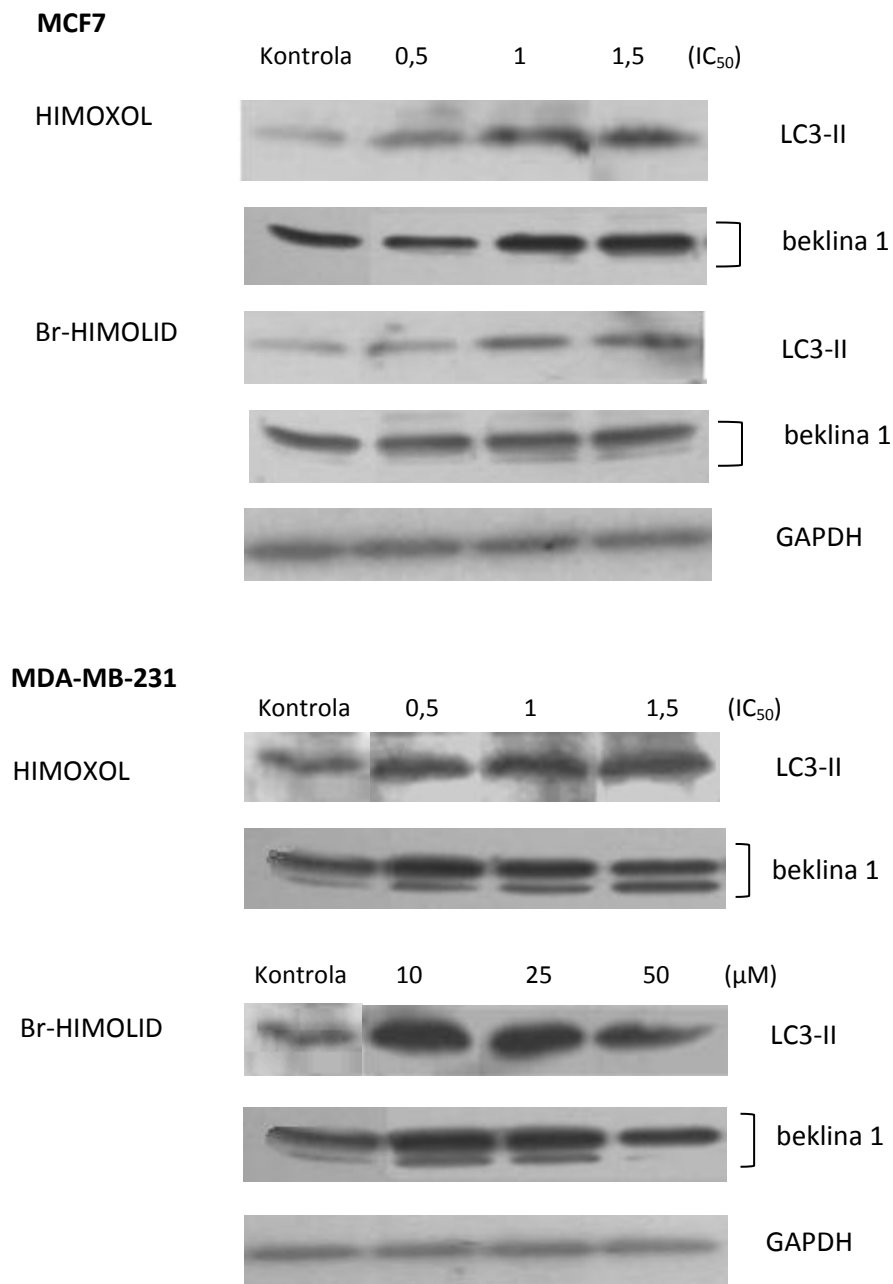
4.4.2. Analiza poziomu białek zaangażowanych w mechanizm autofagii w komórkach raka piersi

Indukcję syntezy białka LC3-II udowodnioną przy pomocy metody mikroskopii konfokalnej potwierdzono metodą immunoblotingu (rycina 16). Wykazano znamiennej indukcję syntezy markera autofagii w obu liniach komórek pod wpływem HIMOXOL. Obserwowana wyższa indukcja syntezy LC3-II wywołana Br-HIMOLID w stosunku do HIMOXOL, koreluje z obrazem uzyskanym metodą mikroskopii konfokalnej wskazującym na większą liczbę autofagosomów w komórkach MDA-MB-231.

W celu wyjaśnienia mechanizmu indukcji autofagii przez badane pochodne OA w komórkach raka piersi, ocenie poddano poziom białka bekliny 1, uczestniczącego w regulacji tego procesu na etapie inicjacji formowania błony izolacyjnej fagoforu.

Komórki MCF7 traktowane HIMOXOL wykazały 40-50% wzrost poziomu bekliny 1 w stężeniach odpowiadających IC_{50} i $1,5 IC_{50}$, natomiast związek ten w komórkach MDA-MB-231 spowodował znamiennej wzrost syntezy tego białka tylko w najwyższym zastosowanym stężeniu - $1,5 IC_{50}$.

Po potraktowaniu komórek MCF7 Br-HIMOLID zaobserwowano 18 % wzrost poziomu badanego regulatora autofagii w najwyższym zastosowanym stężeniu związku. Natomiast w komórkach MDA-MB-231 związek ten spowodował ponad 50 % wzrost poziomu bekliny 1 już w najniższym zastosowanym stężeniu ($10 \mu M$).



Rycina 16. Analiza poziomu LC3-II oraz bekliny 1 w komórkach MCF7 i MDA-MB-231 potraktowanych HIMOXOL i Br-HIMOLID w czasie 24 godzin. Przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów. $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Uzyskane wyniki wskazują, że efektywność działania obu badanych pochodnych OA jest znamienna względem komórek nowotworowych, a obserwowana indukcja procesu autofagii podlega regulacji z udziałem bekliny 1.

4.5. Wpływ Br-HIMOLID i HIMOXOL na migrację komórek prawidłowych i nowotworowych gruczołu piersiowego

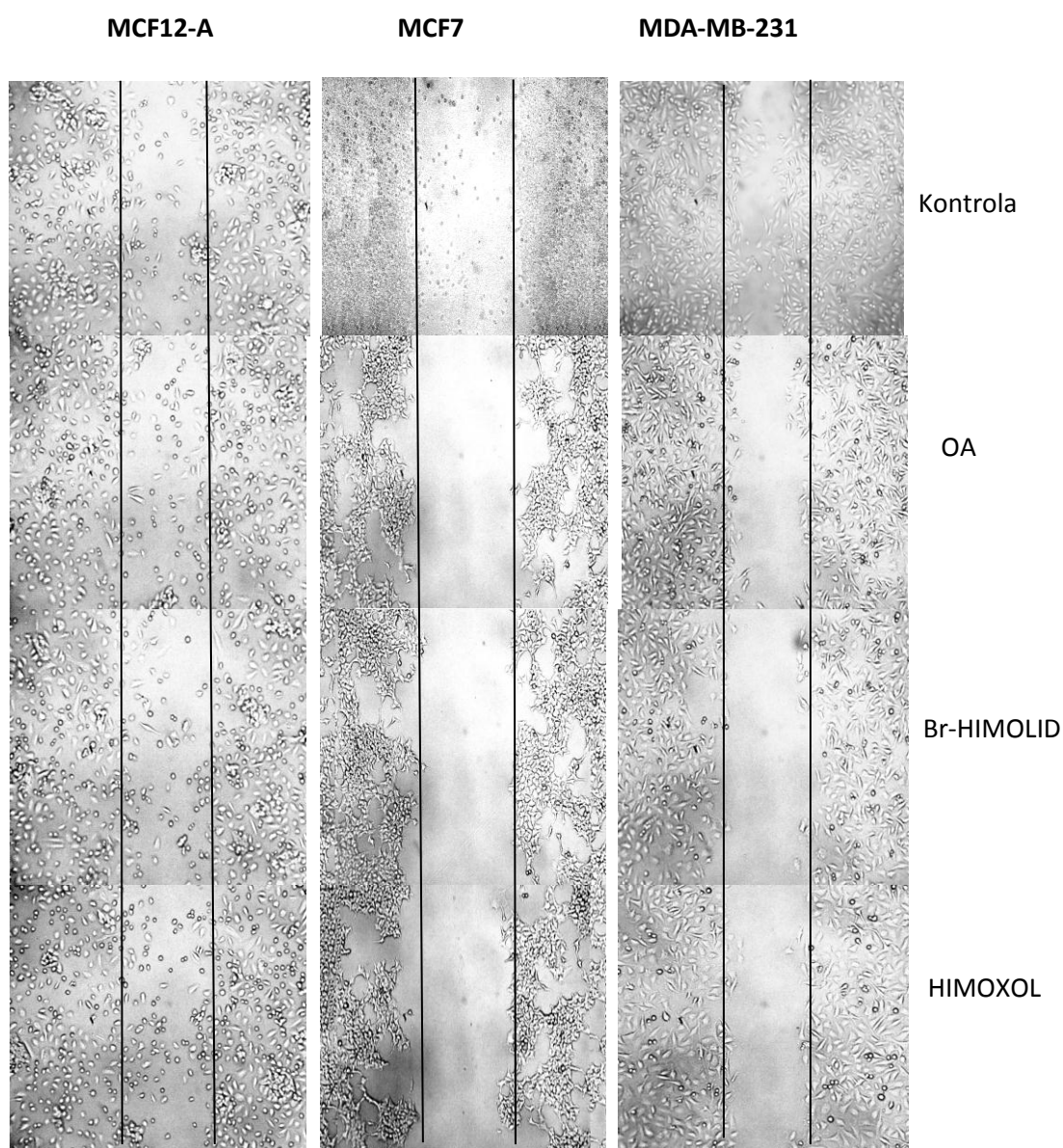
4.5.1. Ocena migracji komórek MCF-12A, MCF7 i MDA-MB-231

Ocenę wpływu pochodnej laktonowej i oksymowej kwasu oleanolowego na migrację komórek prawidłowych oraz komórek raka piersi przeprowadzono za pomocą testu, polegającego na obserwacji „zarastania” przez komórki przestrzeni pomiędzy dwoma krawędziami, wykonanej za pomocą jałowej końcówki po 24 godzinach traktowania związkami w odniesieniu do próby kontrolnej (ang. scratch test). W eksperymencie zastosowano stężenia związków odpowiadające wartościom 0,125 IC₅₀, 0,25 IC₅₀, 0,5 IC₅₀. Komórki MDA-MB-231 traktowano OA i Br-HIMOLID w stężeniach odpowiadających 6,25 μM, 12,5 μM oraz 25 μM (IC₅₀ > 50 μM). Celem tej strategii postępowania była eliminacja cytotoksycznego wpływu związków na badane komórki. Wyniki tego eksperymentu przedstawiają zdjęcia (rycina 17), ukazujące wpływ najwyższych zastosowanych stężeń kwasu oleanolowego i jego pochodnych na migrację komórek prawidłowych oraz nowotworowych gruczołu piersiowego. Wartości liczbowe obrazujące wpływ OA i jego pochodnych w pełnym zakresie stężeń zamieszczono na rycinie 18.

Zarówno kwas oleanolowy, jak i badane pochodne nie hamowały migracji komórek prawidłowych MCF-12A. Z kolei OA w stężeniach odpowiadających 0,25 IC₅₀ i 0,5 IC₅₀ obniżał potencjał migracyjny komórek MCF7 odpowiednio o 82% i 90% (rycina 18. A). Natomiast HIMOXOL i Br-HIMOLID w stężeniach odpowiadających 0,125 IC₅₀ spowodował spadek migracji tych komórek odpowiednio o 18% i 75 %, który wzrastał wraz ze wzrostem stężenia związków odpowiednio do 82 % i 98 %.

Przeprowadzone badania, w kierunku oddziaływania pochodnych na migrację komórek MDA-MB-231, wykazały zbliżoną efektywność działania badanych związków (rycina 18. B i C).

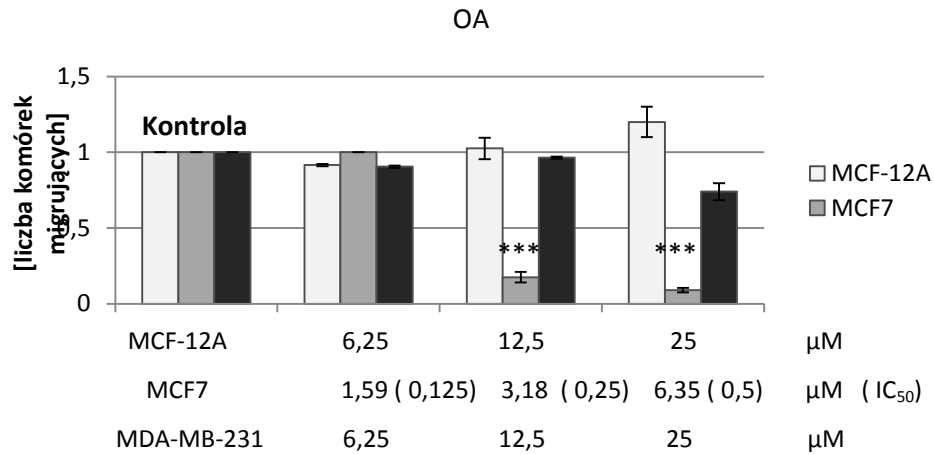
Otrzymane wyniki wskazują, że kwas oleanolowy oraz Br-HIMOLID i HIMOXOL znamienne obniżają potencjał migracyjny komórek raka piersi, nie wpływając na migrację komórek prawidłowych gruczołu piersiowego.



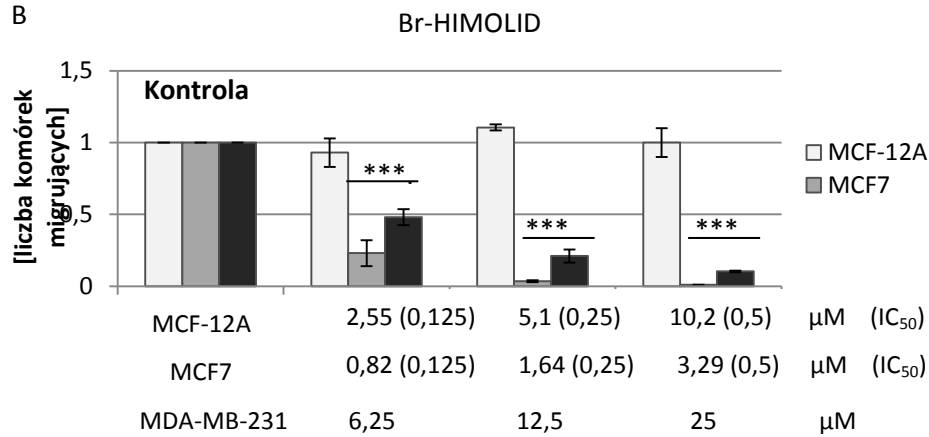
Rycina 17. Wpływ OA i jego pochodnych na migrację komórek prawidłowych gruczołu piersiowego MCF-12A oraz komórek MCF7 i MDA-MB-231.

	OA	Br-HIMOLID	HIMOXOL	
MCF-12A	25	12,8 (0,5)	10,2 (0,5)	μM (IC_{50})
MCF7	6,35 (0,5)	3,28 (0,5)	1,6 (0,5)	μM (IC_{50})
MDA-MB-231	25	25	10,5 (0,5)	μM (IC_{50})

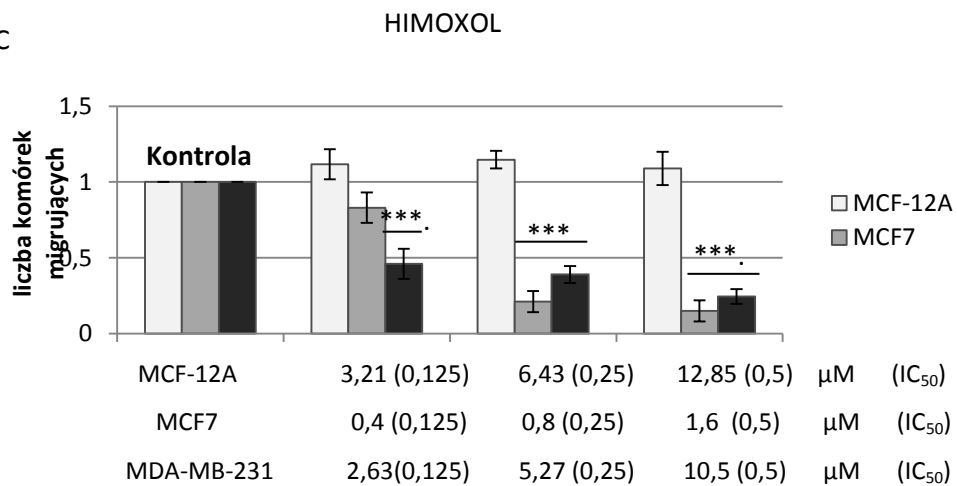
A



B



C



Rycina 18. Analiza liczby komórek MCF-12A, MCF7 i MDA-MB-231 migrujących w obecności kwasu oleanolowego (A), Br-HIMOLID (B) i HIMOXOL (C).

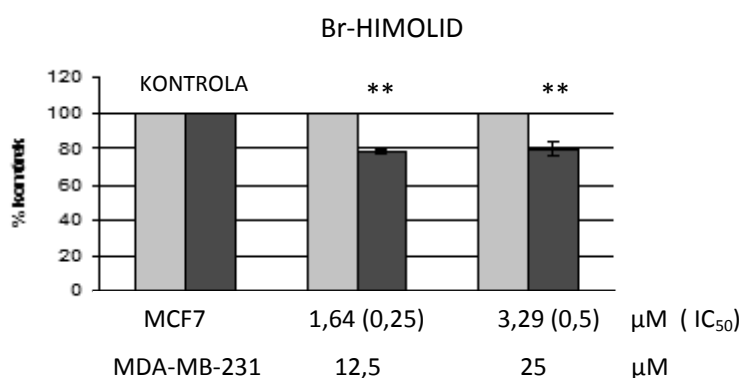
n=3; $\bar{x} \pm SD$; p<0,05 w stosunku do kontroli.

Komórki MCF-12A MCF7 MDA-MB-231

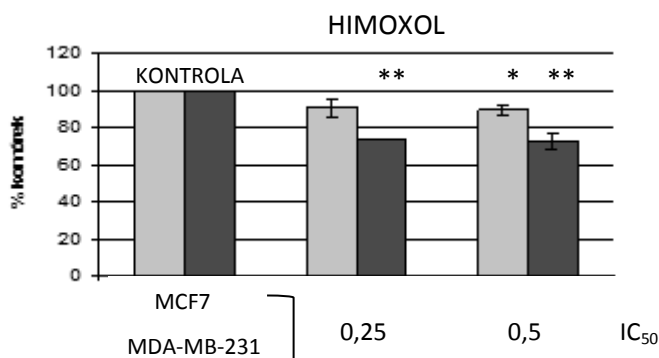
4.5.2. Wpływ na inwazję komórek raka piersi

Analizę wpływu HIMOXOL i Br-HIMOLID na inwazję komórek MCF7 i MDA-MB-231 przeprowadzono za pomocą fluorymetrycznego testu z wykorzystaniem zmodyfikowanych komór Boydena zawierających membrany pokryte Matrigel. Komórki MCF7 wykazały spadek inwazyjności wyłącznie po potraktowaniu HIMOXOL (~ 10 %). Natomiast w komórkach MDA-MB-231 obie badane pochodne obniżyły ich potencjał inwazyjny (20-25 %) ($p < 0,05$) (rycina 19).

A.



B.



Rycina 19. Ocena wpływu Br-HIMOLID (A) i HIMOXOL (B) na inwazyjność komórek MCF7 i MDA-MB-231. Przedstawione wyniki są reprezentatywne dla dwóch niezależnych eksperymentów; $p < 0,05$.

■ MCF7 ■ MDA-MB-231

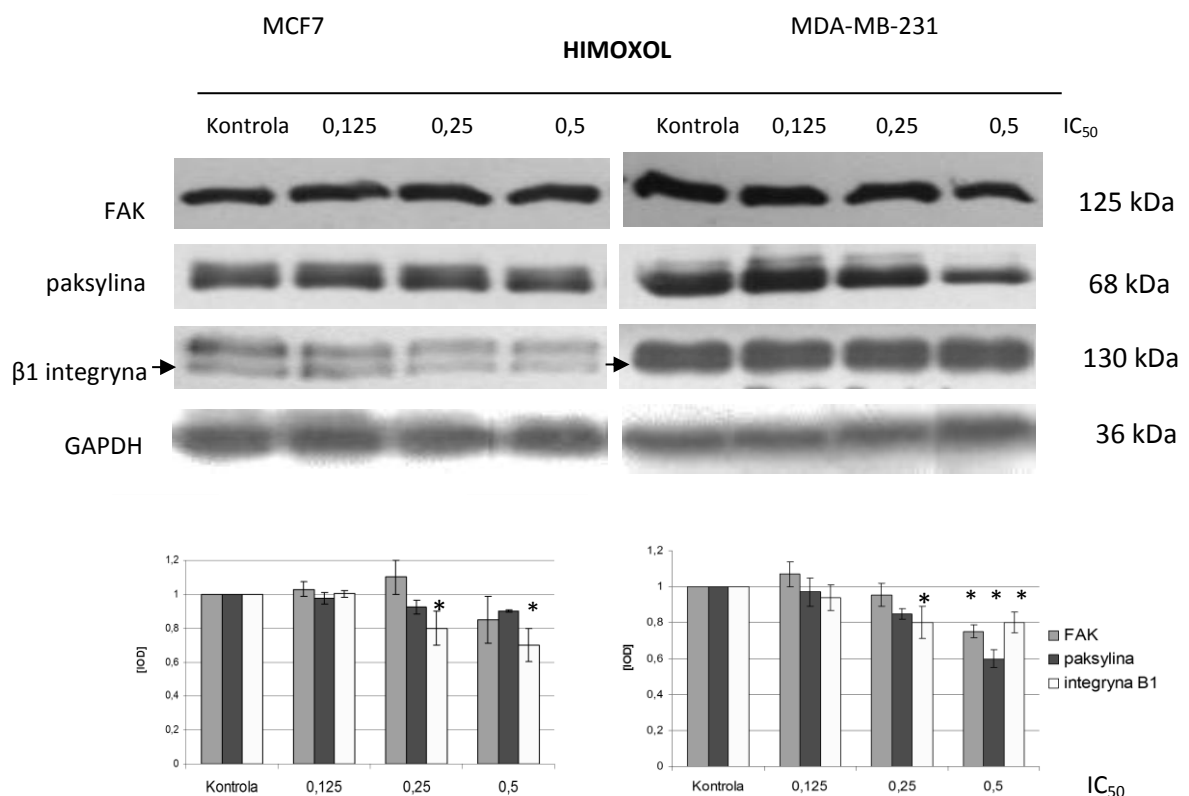
Otrzymane wyniki sugerują, że w niecytotoksycznych stężeniach HIMOXOL hamuje inwazję komórek raka piersi obu linii, natomiast Br-HIMOLID wykazuje aktywność wyłącznie względem komórek MDA-MB-231, charakteryzujących się wyższym potencjałem inwazyjnym.

4.5.3. Wpływ na poziom białek zaangażowanych w proces migracji komórek nowotworowych

Przedstawione wyniki badań wskazują na brak wpływu badanych związków na migrację komórek prawidłowych MCF-12A, w związku z tym kolejne doświadczenia przeprowadzono wyłącznie na komórkach nowotworowych.

Postanowiono wykazać wpływ związków na poziom kluczowych białek uczestniczących w procesie adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej. Stosując technikę WB, oceniono poziom białka połączeń adhezyjnych (FAK), białka receptorowego (integryny $\beta 1$) oraz białka podporowego (paksyliny). Wyniki przedstawiono na rycinie 20.

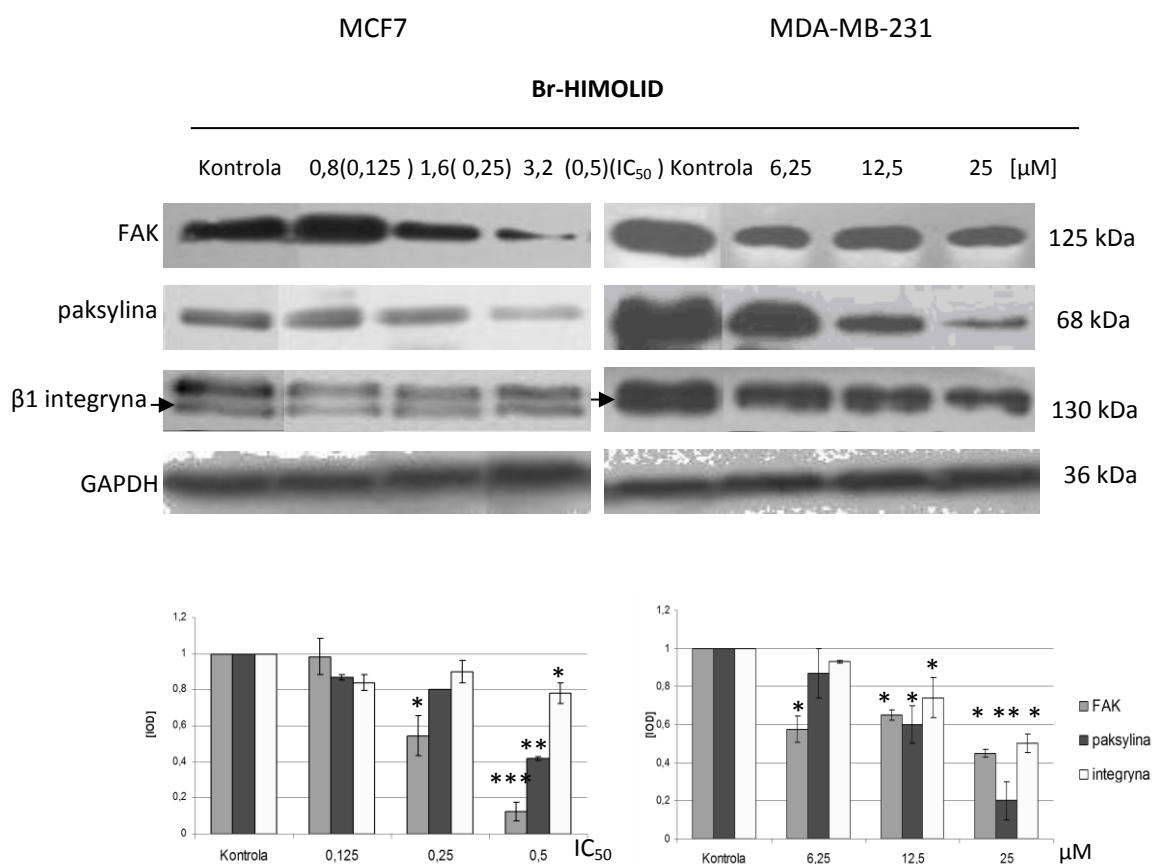
Komórki MDA-MB-231 traktowane HIMOXOL charakteryzowały się obniżonym poziomem integryny $\beta 1$ (0,25 IC_{50} i 0,5 IC_{50}) oraz FAK i paksyliny (0,5 IC_{50}). Natomiast komórki MCF7 tylko obniżonym poziomem integryny $\beta 1$ (0,25 IC_{50} i 0,5 IC_{50}).



Rycina 20. Wpływ HIMOXOL na poziom FAK, paksyliny i $\beta 1$ integryny w komórkach MCF7 i MDA-MB-321. Marker ilości nałożonego białka- GAPDH.

n=3; $\bar{x} \pm SD$; $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Potraktowanie komórek MCF7 Br-HIMOLID, spowodowało w całym zakresie stężeń związku spadek poziomu integryny $\beta 1$ (10-20 %), spadek poziomu białka FAK w dwóch najwyższych zastosowanych stężeniach pochodnej (odpowiednio o 45 % i 88 %) oraz spadek poziomu paksyliny wywołany stężeniem odpowiadającym 0,5 IC_{50} (58 %). Natomiast w komórkach bardziej inwazyjnych MDA-MB-231 potraktowanych tą pochodną OA, analiza WB wykazała obniżenie ekspresji wszystkich badanych białek wraz ze wzrostem stężenia związku. Wartości te dla białek paksylina i integryna $\beta 1$, w porównaniu do wartości uzyskanych dla komórek MCF7, były niższe o 20-30 % (rycina 21).



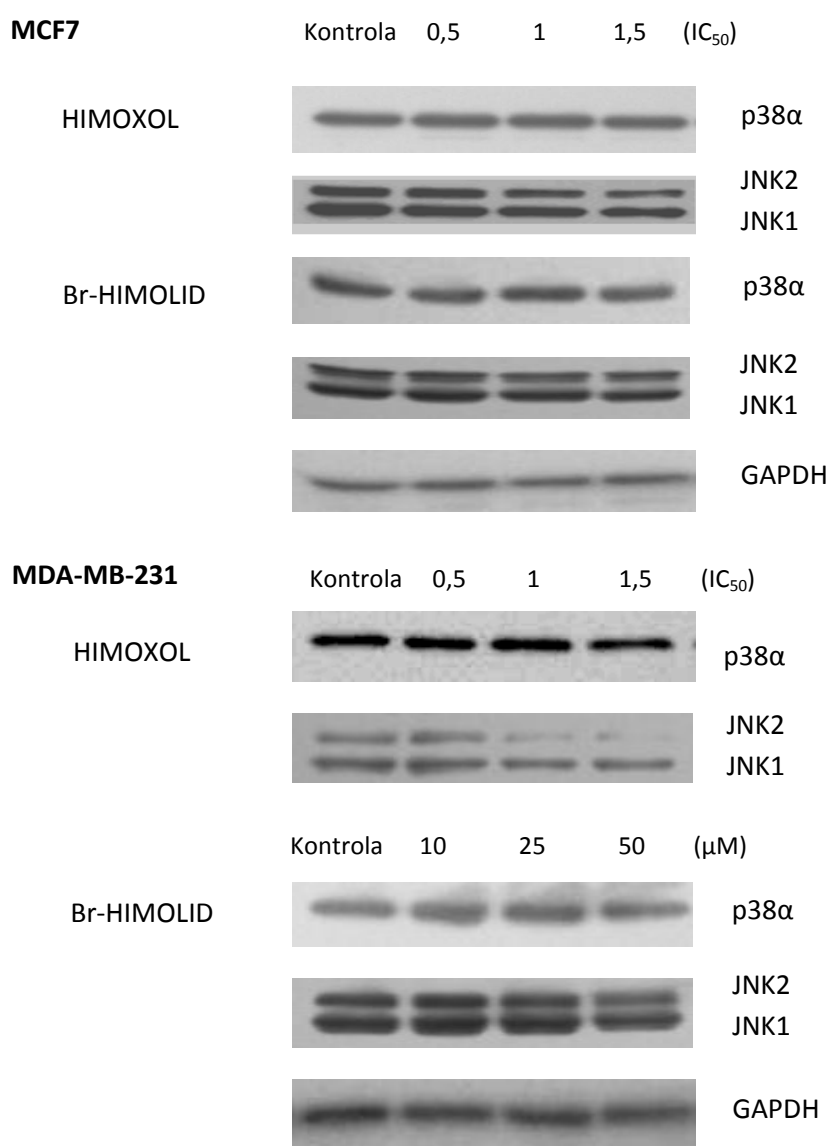
Rycina 21. Analiza WB poziomu białek FAK, paksyliny i integryny $\beta 1$ w komórkach MCF7 i MDA-MB-231 potraktowanych Br-HIMOLID.

$n=3$; $\bar{x} \pm SD$; $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Przeprowadzone badania wskazują, że modyfikacja OA polegająca na wprowadzeniu halogenu oraz ugrupowania laktonowego do struktury związku macierzystego w porównaniu z wprowadzeniem grupy oksymowej zwiększa efektywność działania na poziomie oddziaływania na białka związane z migracją komórek nowotworowych.

4.6. Wpływ Br-HIMOLID i HIMOXOL na poziom MAP kinaz w komórkach raka piersi

Celem zbadania udziału kinaz białkowych aktywowanych mitogenem w mechanizmie działania pochodnych OA, w komórkach raka piersi MCF7 oraz MDA-MB-231 ocenie poddano poziom dwóch białek zaangażowanych w regulację odpowiedzi na sygnały zewnętrzne dochodzące do komórki, p38 α oraz JNK1/2 (rycina 22).



Rycina 22. Analiza poziomu p38 α i JNK1/2 w komórkach MCF7 i MDA-MB-231, potraktowanych HIMOXOL i Br-HIMOLID w czasie 24 godzin.

n=3; $\bar{x} \pm S.D.$; p<0,05 w stosunku do kontroli.

Po potraktowaniu komórek obu linii pochodną oksymową oraz laktonową kwasu oleanolowego, zaobserwowano wyłącznie w komórkach MDA-MB-231 w stężeniu HIMOXOL odpowiadającym IC_{50} wzrost poziomu kinazy p38 (~30 %).

Analiza WB drugiej kinazy MAP, JNK1/2, wykazała w komórkach raka piersi obu linii potraktowanych HIMOXOL spadek poziomu obu izoform białka JNK w stężeniach odpowiadających IC_{50} i $1,5 IC_{50}$. Z kolei potraktowanie tych komórek Br-HIMOLID spowodowało spadek poziomu JNK1/2 wyłącznie w najwyższym stosowanym stężeniu ($1,5 IC_{50}/ 50 \mu M$).

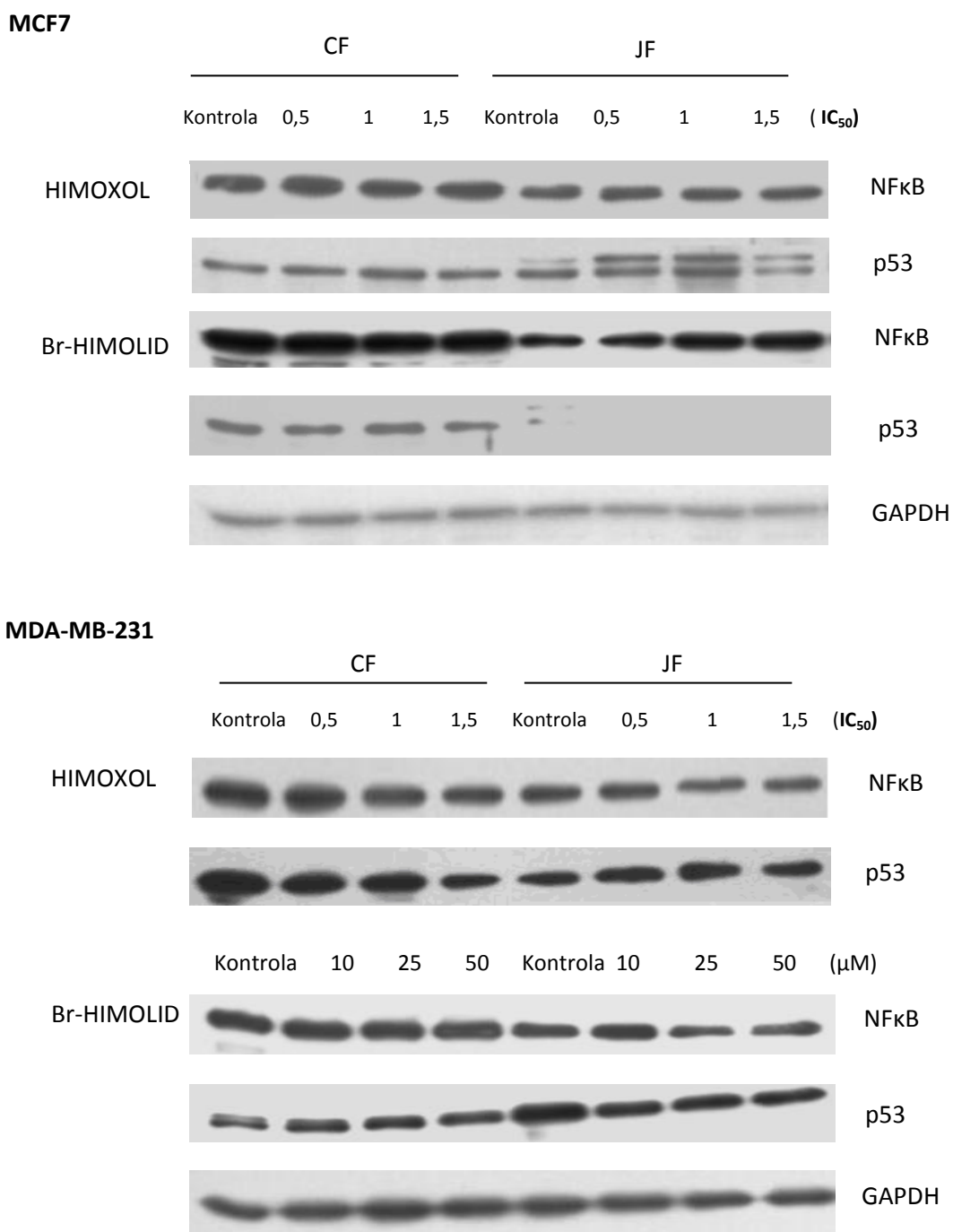
Otrzymane wyniki analizy poziomu MAP kinaz wskazują na udział badanych białek w mechanizmie działania HIMOXOL i Br-HIMOLID w komórkach raka piersi.

4.7. Wpływ pochodnych kwasu oleanolowego na poziom czynników transkrypcyjnych

MAP kinazy regulują aktywację wielu czynników transkrypcyjnych, odpowiedzialnych za oddziaływanie na szereg kluczowych procesów zachodzących w komórce. Kinazy p38 oraz JNK1/2 wpływają m.in. na aktywację czynników p53 oraz NF κ B, dlatego też postanowiono zbadać, czy wymienione białka są zaangażowane w mechanizm działania pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi. Aktywacja tych czynników zależy od lokalizacji w odpowiednim przedziale komórkowym, w związku z tym analizę ich poziomu przeprowadzono we frakcji cytozolowej (CF) i jądrowej (JF) komórek MCF7 i MDA-MB-231 (rycina 23).

Analiza poziomu czynnika transkrypcyjnego p65NF κ B we frakcji cytozolowej i jądrowej komórek MCF7 potraktowanych HIMOXOL nie wykazała znamiennego wpływu związku na poziom tego białka. Natomiast w komórkach MDA-MB-231 potraktowanych tym związkiem wykazano zależny od stężenia spadek ilości p65NF κ B w obu frakcjach, wynoszący maksymalnie 30 % ($p < 0,05$).

W komórkach MCF7 Br-HIMOLID wykazał zdolność do indukcji procesu translokacji tego czynnika transkrypcyjnego do jądra w najwyższych zastosowanych stężeniach związku (IC_{50} oraz $1,5 IC_{50}$), ($p < 0,05$). Natomiast w komórkach MDA-MB-231 potraktowanych tą samą pochodną, w najwyższych stężeniach związku (IC_{50} i $1,5 IC_{50}$) zaobserwowano niewielki spadek poziomu badanego białka we frakcji jądrowej, co jednak nie było różnicą znamieną statystycznie (rycina 23).



Rycina 23. Wpływ pochodnych OA na poziom p65NFkB i p53 we frakcji cytozolowej (CF) i jądrowej (JF) w komórkach MCF7 i MDA-MB-231. Przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech niezależnych eksperymentów. $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Analiza WB poziomu białka p53 w komórkach MCF7 potraktowanych HIMOXOL wykazała wzrost poziomu tego białka w stężeniach odpowiadających 0,5 IC₅₀ oraz IC₅₀ (odpowiednio 32 % i 33 %), a także obniżoną translokację do jądra w najwyższym

zastosowanym stężeniu związku odpowiadającym wartości 1,5 IC₅₀ (28 %). Po potraktowaniu komórek MDA-MB-231 HIMOXOL, odnotowano translokację p53 do jądra już w najniższym zastosowanym stężeniu pochodnej, 0,5 IC₅₀ (10%).

Potraktowanie komórek MCF7 Br-HIMOLID spowodowało zahamowanie translokacji białka p53 z cytozolu do jądra komórkowego, co objawiło się jego brakiem we frakcji jądrowej. Brak kumulacji we frakcji cytoplazmatycznej oraz niewykrywalna w warunkach eksperymentu obecność we frakcji jądrowej wskazuje na oddziaływanie Br-HIMOLID na syntezę białka. Natomiast potraktowanie komórek MDA-MB-231 tym związkiem spowodowało niewielką kumulację p53 w cytozolu jednocześnie z hamowaniem translokacji do jądra komórkowego.

W wyniku 24-godzinnej inkubacji komórek MCF7 z Br-HIMOLID zaobserwowano kumulację białka w cytoplazmie przy całkowitym spadku poziomu p53 we frakcji jądrowej, w całym zastosowanym zakresie stężeń pochodnej. Z kolei po potraktowaniu komórek MDA-MB-231 tym samym związkiem zaobserwowano, że już najniższe zastosowane stężenie tej pochodnej (10 μM) spowodowało kumulację p53 w cytoplazmie, przy równoczesnym spadku poziomu tego białka we frakcji jądrowej.

Przeprowadzona analiza WB czynników transkrypcyjnych sugeruje udział p53 oraz p65NFκB w obserwowanym mechanizmie działania HIMOXOL i Br-HIMOLID w badanych komórkach raka piersi.

5. DYSKUSJA

Głównym celem nowoczesnej onkologii, który ostatecznie powinien doprowadzić do powstania spersonalizowanego leczenia pacjentów, jest możliwość przewidywania odpowiedzi konkretnego typu nowotworu na zastosowany lek. Przeprowadzone na szeroką skalę badania w kierunku oceny wpływu związków o wysokim potencjale przeciwnowotworowym na panel genetycznie różnorodnych linii komórek nowotworowych, przedstawiają ogrom relacji zachodzących pomiędzy zmianami w genomie, a odpowiedzią na zastosowaną terapię (Corona G. i wsp., 2012). Informacje te wskazują na mechanizm i tym samym punkt docelowego działania leków. Obecnie poszukuje się coraz skuteczniejszych związków, działających selektywnie na komórki nowotworowe i nie wpływających na komórki prawidłowe organizmu. Wśród substancji o wysokiej aktywności i znacznym potencjale działania znajdują się triterpeny. Stanowią one grupę naturalnych związków o udowodnionym szerokim zakresie działania przeciwnowotworowego (Deeb D. i wsp., 2009). Do grupy tej należą kwas oleanolowy (OA) i ursolowy (UA), jednakże działanie tych naturalnych związków, choć bardzo obiecujące, nie jest selektywne. W związku z tym prowadzone są badania mające na celu znalezienie, bądź wytworzenie syntetycznych pochodnych triterpenów, które poprzez wprowadzenie chemicznej modyfikacji do struktury związku podstawowego, zwiększą efektywność jego przeciwnowotworowego działania.

Informacji na temat aktywności przeciwnowotworowej pochodnych kwasu oleanolowego jest niewiele, dlatego też głównym celem badań było wyjaśnienie mechanizmu działania syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego: zmodyfikowanych w pozycji C3, C11, C12 oraz C28 struktury OA. Modyfikacje te polegały na wstawieniu w odpowiednie miejsca w strukturze OA grup: hydroksyiminowej, karboksylowej, atomu bromu, ugrupowania laktonowego oraz dodatkowego pierścienia siedmioczłonowego. Pochodne kwasu oleanolowego posiadające te modyfikacje poddano wstępnemu skriningowi w National Cancer Institute (U.S.A.), na panelu złożonym z 60 różnych linii komórkowych. Ze względu na obiecujące wyniki, postanowiono poddać je dalszym, szczegółowym badaniom. Co wymaga podkreślenia, wybór grup funkcyjnych miał swoje uzasadnienie w określonej aktywności biologicznej oraz właściwościach chemicznych tychże podstawników. Udowodniono bowiem, że wprowadzenie grupy hydroksyiminowej w pozycji C3 układu oleananu może wpływać nie tylko na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, ale również powodować śmierć na drodze apoptozy, autofagii lub nekrozy (Baltina L.A. i wsp., 2003). Istnieje również wiele doniesień, wskazujących na wyższą aktywność pochodnych zawierających atom azotu (Zaprutko L. i wsp., 2004). Przykładem może być działanie

proapoptotyczne na komórki raka piersi pochodnych CDDO i CDDO-Im z ugrupowaniem cjanowym przy C2 (Konopleva M. i wsp., 2006; Kim E.H. i wsp., 2011). Piśmiennictwo wskazuje, że grupa iminowa może wykazywać szereg działań biologicznych, w tym aktywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i co jest istotne, także przeciwnowotworową (El-Sawi E.A. i Sayed T.M, 2013). Wiadomo również, że atom wodoru grupy NHOH może tworzyć słabe wiązanie wodorowe z atomem tlenu grupy ketonowej, a cała cząsteczka przyjmować strukturę o większej lipofilności, co umożliwi łatwiejsze wnikiwanie związku w struktury komórkowe (Michalak K. i wsp., 2001; Ferte J. i wsp., 1999). Z kolei wprowadzenie laktonu do struktury związku indukuje aktywność przeciwbakteryjną (Kalkhambkar R.G. i wsp, 2008), przeciwgrzybiczną (Kumar R. i wp., 2012) oraz przeciwnowotworową (Taylor P.G. i wsp. 2008; Tantitharaporn S. i wsp., 2011). Natomiast wprowadzenie atomu bromu zwiększa lipofilność i ułatwia aplikację biomedyczną (Montes de Oca M.N. i wsp, 2013).

Badania wstępne przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wykazały, że badane w niniejszej pracy syntetyczne pochodne kwasu oleanolowego, w porównaniu do związku macierzystego OA, charakteryzuje wyższa efektywność cytotoksycznego działania względem komórek ostrej białaczki promielocytowej HL-60, HL-60/AR, białaczki limfoblastycznej T-komórkowej CCRF-CEM, CCRFVCR1000, CCRFADR5000, raka piersi MCF7 oraz komórek raka jajnika NCI/ADR-Res. Związki te wykazują również aktywność proapoptotyczną względem komórek HL-60, ale także wykazały zdolność modulowania oporności wielolekowej komórek białaczkowych (Paszal A. i wsp., 2011) oraz komórek NCI/ADR-Res (dane nie publikowane).

Biorąc pod uwagę informacje literaturowe dotyczące aktywności biologicznej podstawników wykorzystanych do syntezy pochodnych OA oraz wyniki badań *in vitro*, postanowiono zbadać w niniejszej pracy doktorskiej mechanizm działania tych związków na komórki gruczołu piersiowego.

Badania własne przeprowadzone na komórkach raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 wskazują, że najbardziej efektywnym związkiem spośród grupy badanych pochodnych OA jest ester metylowy kwasu 3-hydroksyimino-11-oksoolean-12-en-28-owego (HIMOXOL). Wysoka aktywność tej pochodnej jest prawdopodobnie związana z obecnością w strukturze tego związku ugrupowania oksymowego przy węglu trzecim. Należy podkreślić różnicę w efektywności działania HIMOXOL na obie linie komórek raka piersi, która była znacznie wyższa dla komórek estrogenowo-zależnych, MCF7. Do badań zakwalifikowano również 28→13 lakton kwasu 12 α -bromo-3-hydroksyiminoolean-28-owego (Br-HIMOLID),

posiadający w swojej strukturze wbudowany atom bromu oraz ugrupowanie laktonowe. Związek ten w teście MTT charakteryzował się wysoką cytotoksycznością względem komórek raka piersi MCF7. Pomimo, iż wykazywał niższą efektywność działania w komórkach MDA-MB-231, postanowiono sprawdzić jak ta modyfikacja struktury OA wpływa na aktywność komórek nowotworowych o bardziej inwazyjnym fenotypie.

Zatrzymanie rozwoju procesu nowotworowego poprzez indukcję śmierci komórek nowotworowych jest najistotniejszym celem z punktu widzenia chemioterapii. Różnorodność czynników regulujących programowaną śmierć komórki wzbudza szerokie zainteresowanie wśród onkologów (Notte A. i wsp., 2011). Wiele badań, w których jako model badawczy wykorzystywana jest komórka nowotworowa, skupia się na procesie apoptozy. Z tego względu podejmuje się szereg prób ingerencji w toczące się procesy nowotworowe poprzez modulowanie przebiegu procesu apoptozy. Działania te mają na celu umożliwić regulację wrażliwości komórek nowotworowych na leki oraz zwiększyć skuteczność ich działania, i co istotne, obniżyć toksyczność względem komórek prawidłowych organizmu (Vindrieux D. i wsp., 2011). Ponieważ apoptoza umożliwia organizmom żywym kontrolowanie liczby komórek w trakcie dojrzewania, pozwala także usunąć komórki uszkodzone lub zmienione nowotworowo, dlatego też wywołanie apoptozy jest pożądanym efektem terapii przeciwnowotworowej (Sun X. i wsp., 2013).

Apoptoza i autofagia choć są odmiennymi z molekularnego punktu widzenia procesami, to celem ich działania jest eliminacja uszkodzonej, nieprawidłowej, zainfekowanej, bądź po prostu zbędnej komórki (Ghavami S. i wsp., 2011; Stanton M.J., 2013). Apoptoza jest procesem szybkim, którego szczyt pojawia się już po 60 minutach ekspozycji na lek, natomiast autofagia narasta w komórkach stopniowo, przez 24 godziny. Biorąc pod uwagę te obserwacje oraz fakt różnej wrażliwości komórek rakowych na apoptozę, nawet w obrębie tego samego guza, skuteczniejsza może być terapia wykorzystująca kombinację leków cytostatycznych, indukujących z jednej strony apoptozę, a z drugiej autofagię, aby „sojusz” tych dwóch różnych typów śmierci przeistoczył się w skuteczną walkę z rakiem (Lamparska-Przybysz M. i wsp., 2005).

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na proapoptotyczne właściwości HIMOXL, ale tylko względem komórek bardziej inwazyjnych, estrogenowo-niezależnych, MDA-MB-231, i wyłącznie w jednym ze stężeń odpowiadającym IC_{50} . Badany mechanizm działania proapoptotycznego wskazuje na zaangażowanie szlaku zewnętrznego apoptozy, z udziałem kaspazy-8 i kaspazy-3 oraz substratu dla tego enzymu wykonawczego apoptozy, PARP1. Komórki MCF7 charakteryzują się mutacją w genie kodującym kaspazę 3,

stąd prawdopodobnie brak indukcji procesu apoptozy w tych komórkach (Yang P.M. i wsp., 2011). Poza wzrostem odsetka komórek apoptotycznych w komórkach MDA-MB-231, w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} nie zaobserwowano istotnych zmian w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Natomiast interesujący jest fakt, że w najwyższym zastosowanym stężeniu HIMOXOL ($1,5 IC_{50}$) zaobserwowano zmiany w syntezie kaspazy-8 oraz rozcięcie PARP1, mimo iż nie wykazano w tym stężeniu związku zmian w fazach cyklu oraz indukcji apoptozy. Zmiany w poziomie tych białek można tłumaczyć innym mechanizmem indukcji śmierci komórki, jakim jest autofagia. Niezależne badania przeprowadzone przez Munoz-Gamez i współpracowników oraz zespół Zhang potwierdzają, iż rozcięcie PARP1 jest kluczowe dla kierowania komórki na tę ścieżkę śmierci (Munoz-Gamez J.A. i wsp., 2009; Zhang N. i wsp., 2011). Natomiast Bohensky i współpracownicy wykazali w chondrocytach, że supresja autofagii wzmacnia aktywność kaspazy-8 (Bohensky J. i wsp., 2010). W badaniach własnych zaobserwowano spadek syntezy tego białka w stężeniu HIMOXOL odpowiadającym $1,5 IC_{50}$, co może korelować ze wzrostem odsetka komórek MDA-MB-231 kierowanych do autofagii.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania pokazały, że wprowadzenie ugrupowania laktonowego oraz atomu bromu do struktury OA (Br-HIMOLID) nie indukuje apoptozy, nie wywiera też efektu cytostatycznego, ale indukuje drugi typ programowanej śmierci komórki, autofagię. Odkąd trwają badania nad mechanizmem działania oraz rolą autofagii w procesach fizjologicznych i patologicznych, pojawiają się sprzeczne informacje na temat znaczenia tego procesu dla rozwoju nowotworu (Chen H.Y. i White E., 2011). Część badaczy wskazuje, że autofagia jest narzędziem przeżycia nowotworu, kiedy to degradacja pojedynczych komórek nowotworowych dostarcza energii dla dalszego rozwoju (Das G., 2012). Z drugiej jednak strony wiele badań wskazuje, że autofagia to proces pozwalający na eliminację komórek nowotworowych (Kung C.P. i wsp., 2011; White E., 2012). Przeprowadzone badania własne dotyczące wpływu syntetycznych pochodnych OA na indukcję procesu autofagii, z wykorzystaniem swoistego markera tego procesu, białka LC3 II, związanego z membraną autofagosomu, pokazały, że oba związki indukują II typ programowanej śmierci komórki, ale stopień tej indukcji jest specyficzny dla związku i potraktowanej nim linii komórkowej oraz jest najsilniej wyrażony w wyższych zastosowanych stężeniach związków.

Wykazano, że autofagia hamuje rozwój procesu nowotworzenia, szczególnie we wczesnej fazie inicjacji, natomiast zahamowanie autofagii poprzez hamowanie ekspresji określonych genów (np. *bekliny 1*) może promować rozwój nowotworu. Ponadto ostatnie badania

wskazują na indukcję autofagii w komórkach nowotworowych w efekcie stosowania chemioterapii i radioterapii (Chen N. i Debnath J., 2010; Turcotte S. i Giaccia A.J., 2010). W przypadku mutacji genów promotorowych, proces ten może rekompensować deficyt apoptozy, co ma pozytywne przełożenie w aspekcie leczenia chorób nowotworowych. Autofagia może odgrywać kluczową rolę w terapii przeciwnowotworowej poprzez usuwanie uszkodzonych, zmutowanych komórek oraz ograniczanie wielkości guza (Erenpreisa J. i wsp., 2012). Analiza ważnego regulatora autofagii, Bekliny-1, pokazała, że obie pochodne indukują syntezę tego białka, zależnie od zastosowanego stężenia związków i wykazują różnicę w aktywności względem obu typów komórek. Mianowicie, w komórkach MCF7 zaobserwowano wyższą efektywność działania HIMOXOL, natomiast w komórkach MDA-MB-231, pochodnej posiadającej w swej strukturze atom bromu i ugrupowanie laktonowe (Br-HIMOLID).

Beklina-1, ulega monoallelicznej delecji w 40-70% przypadków raka piersi, prostaty i jajników (Sun Q. i wsp., 2009). W kulturach in vitro MCF7, nadekspresja *bekliny-1* indukuje autofagię i jest związana z zahamowaniem proliferacji tych komórek (Yang Y.P. i wsp., 2005). Dlatego szczególnego znaczenia nabierają przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań, które wskazują na zdolność HIMOXOL i Br-HIMOLID do hamowania nowotworzenia poprzez indukcję autofagii w badanych komórkach raka piersi z udziałem Bekliny 1.

Zahamowanie rozprzestrzeniania w ustroju komórek nowotworowych poprzez modulację procesu adhezji i migracji tychże komórek, a także wpływ na inwazyjność jest kluczowym elementem strategii przeciwnowotworowej (Bendas G. i Borsig L., 2012). Komórki nowotworowe są zdolne do rozprzestrzeniania się w obrębie organizmu wykorzystując dwa mechanizmy: inwazyjność, odnoszącą się do migracji w obrębie otaczających komórek oraz metastazę, oznaczającą zdolność komórek nowotworowych do penetracji ścian naczyń krwionośnych i limfatycznych, przemieszczania się do innych, często odległych tkanek i tworzenia wtórnych guzów (Pavese J.M. i wsp., 2010). Zdolność komórek nowotworowych do metastazy jest najważniejszym czynnikiem związanym z obniżoną skutecznością terapeutyczną względem raka piersi (Yeh C.T. i wsp., 2010).

Celem niniejszych badań była ocena zdolności pochodnych OA, oksymowej i laktonowej do modulacji wymienionych procesów w komórkach prawidłowych gruczołu piersiowego, MCF-12A oraz komórkach raka piersi, szczególnie istotnych z powodu zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania i związanej z tym wysokiej śmiertelności wśród pacjentów chorych na ten typ nowotworu (Lin K.L. i wsp., 2011). Adhezja komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej jest możliwa dzięki szlakom przekazywania sygnału z

udziałem białek ognisk adhezji, do których należą m.in. kinaza ognisk adhezji, FAK, białka receptorowe - integryny i białko podporowe - paksylina. Białka te równocześnie są zaangażowane w proces migracji i mają zasadniczy wpływ na inwazyjność komórek nowotworowych (Nalla A.K. i wsp., 2010; Chen J.Y. i wsp., 2011).

Ocena migracji komórek za pomocą testu zarastania (scratch) wykazała brak wpływu kwasu oleanolowego oraz dwóch wybranych pochodnych na migrację komórek prawidłowych gruczołu piersiowego. Natomiast w komórkach raka piersi potraktowanych związkami w czasie 24 godzin, zaobserwowano obniżenie tego procesu. Ponadto badanie wpływu HIMOXOL i Br-HIMOLID na inwazyjność komórek MCF7 i MDA-MB-231 wykazało wyższą aktywność obu pochodnych w kierunku obniżania inwazji komórek, estrogenowo-niezależnych, MDA-MB-231. Co należy podkreślić, dla wszystkich typów komórek zastosowano zakres niecytotoksycznych stężeń, odpowiadających określonym wartościom IC_{50} lub w przypadku niemożności ustalenia IC_{50} , wartości stężeń równe i niższe od 50 μM . Aby zbadać ten mechanizm działania związków, poddano ocenie poziom kinazy ognisk adhezji, FAK. Analiza poziomu tego białka wykazała, że zarówno w komórkach MCF7, jak i MDA-MB-231 związki obniżają poziom FAK, a pochodna laktonowa wykazuje wyższą efektywność działania. Badania innych autorów pokazały, że nadekspresja kinazy ognisk adhezji w różnych typach nowotworów skorelowana jest ze zwiększeniem stopnia zezłośliwienia guza. Nawet niewielka zmiana w funkcjonowaniu białka FAK w komórkach prawidłowych powoduje progresję nowotworową i może prowadzić do przerzutowania oraz skróconego czasu przeżycia chorego [Hao H.F. i wsp., 2009; Huanwen W. i wsp., 2009]. Ponadto uważa się, że nadekspresja tego białka może skutkować zmianami w obrębie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w inwazyjność komórek nowotworowych (Bury M. i wsp. 2013).

Białko FAK jest kluczowym mediatorem przekazywania sygnału przez integryny (Guan J.L.; 2010). Analiza poziomu $\beta 1$ -integryny, stanowiącej marker przerzutowania, pokazała, że obie badane pochodne OA obniżają poziom tego białka. Podobny efekt związki wywierają na poziom białka podporowego – paksyliny. Analiza poziomu tych białek w komórkach MCF7 i MDA-MB-231 pokazała zdolność związków do obniżania poziomu białek wchodzących w skład ognisk adhezji, co ma znaczenie dla obniżenia migracji oraz zahamowania w pewnym stopniu inwazyjności tych komórek. Co ciekawe, związki wydają się wykazywać wyższą siłę działania w komórkach o bardziej inwazyjnym fenotypie, MDA-MB-231. Badania dostarczyły dowodów na to, że obie pochodne OA obniżają poziom $\beta 1$ integryny, która jest określana markerem inwazyjności. W komórkach estrogenowo-zależnych MCF7, taki efekt jest

silniejszy pod wpływem działania związku z ugrupowaniem oksymowym, natomiast w komórkach MDA-MB-231, pochodna laktonowa wykazuje większą efektywność działania w kierunku obniżania poziomu tego białka receptorowego. Rodzina integryn odgrywa bardzo ważną rolę w procesach fizjologicznych, jak i w procesach nowotworowych. Integryny uczestniczą w progresji i przerzutowaniu nowotworu, poprzez migrację, inwazyjność, proliferację oraz zdolność komórek nowotworowych do przetrwania (Onodera Y. i wsp., 2013). Istnieją doniesienia, że białka te nie są niezbędne w procesie migracji komórek nowotworowych, ale ich obecność wyraźnie zwiększa zdolność przerzutowania nowotworu, w porównaniu z komórkami migrującymi, charakteryzującymi się obniżonym poziomem tych białek (Mach M., 2005). W nowotworach piersi wykazano najwyższą ekspresję integryn $\alpha 6\beta 4$ oraz $\alpha \nu\beta 3$, co powoduje zwiększenie rozmiaru guza oraz przerzutowanie do kości (Desgrosellier J.S. i wsp., 2010). *Jednak to* $\beta 1$ -integryny wydają się być wskaźnikami przerzutowania, dlatego ich najwyższą ekspresję obserwujemy w komórkach metastatycznych (Rathinam R. i wsp., 2010).

Paksylina jest białkiem, związanym zarówno z FAK, jak i z integryną, umożliwiając migrację komórek (Harburger D.S. i wsp., 2009; Virtanen S.S., 2010). Spadek poziomu paksyliny prowadzi do zmniejszenia metastazy komórek nowotworowych, co poprawia prognozę pacjentów chorych na nowotwór (Rosse C. i wsp., 2009). Przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej badania dotyczące wpływu pochodnych OA na poziom paksyliny wykazały, że Br-HIMOLID charakteryzuje się wyższą aktywnością i obniża poziom tego białka podporowego zarówno w komórkach MCF7, jak i MDA-MB-231. Badania innych autorów wykazały, że komórki nie zawierające paksyliny, mają nieprawidłową strukturę ognisk adhezji, co powoduje ograniczenie lokalizacji FAK do ognisk przylegania, stopnia rozprzestrzeniania oraz migracji komórek (Surawska H. i wsp., 2008).

Szereg procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, apoptoza, autoapoptoza czy migracja, które uległy w pewnym stopniu modyfikacji w wyniku działania badanych pochodnych, jest regulowana przez kinazy białkowe aktywowane mitogenem, p38 i JNK1/2 oraz czynniki transkrypcyjne, p53 i p65NFkB (Hang J.Y. i Selim M.A., 2012). W celu wyjaśnienia mechanizmu działania związków w komórkach MCF7 i MDA-MB-231 analizie poddano poziom tych białek. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że oba związki w zależności od zastosowanego stężenia obniżają poziom JNK1/2 w obu liniach komórek nowotworowych oraz podwyższają poziom p38 α MAPK w komórkach MDA-MB-231, nie wpływając istotnie na poziom tego białka w komórkach raka piersi estrogenowo-zależnych, MCF7. Badania przeprowadzone przez Yeh i współpracowników pokazały, że

przedstawiciel triterpenów, kwas ursolowych, hamuje migrację oraz inwazję komórek raka piersi MDA-MB-231 przez zahamowanie aktywności JNK oraz obniżenie poziomu p65NFkB w jądrze (Yeh C.T. i wsp., 2010). Istnieją doniesienia, że p38 α może hamować proliferację komórek poprzez antagonizowanie ścieżki JNK/c-Jun, ważnego regulatora proliferacji i apoptozy. Jedną z ważniejszych funkcji p38 α jest promocja różnicowania komórek. Wiele badań wskazuje na obniżenie aktywacji ścieżki z udziałem p38 w różnych typach ludzkiego raka. Genetyczne modyfikacje białek zaangażowanych w tą ścieżkę pokazały, że p38 α może działać jako supresor nowotworu. Ostatnie badania sugerują, że p38 α może również negatywnie regulować proliferację komórki poprzez modulowanie ekspresji EGFR (Swat A. i wsp., 2011). Nadekspresja lub mutacja receptorów EGFR w komórkach nowotworowych może doprowadzić do dysregulacji mechanizmu przekazywania sygnałów poprzez te receptory, czego skutkiem jest nadmierna proliferacja, a także inwazja okolicznych tkanek przez komórki nowotworowe oraz wzrost procesu angiogenezy. Nieprawidłowości te mogą także spowodować oporność nowotworu na radioterapię i chemioterapię (Dutta P.R. i Maity A., 2007). Informacje te są istotne w kontekście przedstawionych w niniejszej pracy wyników badań, gdzie wybrane pochodne OA modulują poziom kinazy p38 α w komórkach z nadekspresją EGFR, MDA-MB-231. Obserwowane działanie pochodnych OA ma szczególne znaczenie, ponieważ kinaza p38 α może również aktywować czynnik transkrypcyjny p53 w kierunku hamowania proliferacji komórki, w wyniku działania różnych bodźców stresowych (Hui L. i wsp., 2007). Białko p53 jest uważane za strażnika genomu, który w przypadku braku możliwości naprawy uszkodzonego materiału genetycznego prowadzi do eliminacji komórki na drodze programowanej śmierci. Istotnym jest fakt, że białko to ulega mutacji w przeszło 50% przypadków ludzkich nowotworów złośliwych (Rivlin N. i wsp., 2011). Aktywacja p53 indukuje śmierć, z kolei drugi badany czynnik transkrypcyjny, NFkB, jest odpowiedzialny za przetrwanie komórek, w wyniku reakcji na różnorodne bodźce (Ho J.Q. i wsp., 2011; Gancz D. i wsp., 2013). A więc, czynnik ten w postaci aktywnej wykazuje działanie antyapoptotyczne. Dowiedziono również roli wyżej wymienionych czynników w procesie śmierci komórki na drodze autofagii (Zhang Y. i wsp., 2009), co wykorzystano w poszukiwaniu wyjaśnienia mechanizmu działania pochodnych OA.

Rola p53 w autofagii zależy od komórkowej lokalizacji tego białka. W jądrze p53 wzmaga autofagię, poprzez oddziaływanie z efektem śmierci mediowanej przez p53 DRAM i sestriną1/2 (Lorin S. i wsp., 2010). Cytoplazmatyczna lokalizacja p53 hamuje z kolei autofagię niezależnie od jego roli jako czynnika transkrypcyjnego (Green D.R. i Kroemer G., 2010). Wyczerpanie p53 lub zahamowanie jego funkcji jest zdolne do indukcji autofagii w

komórkach ludzkich oraz mysich. Wzmocniona autofagia może faworyzować przeżycie komórek rakowych nie posiadających p53 w warunkach braku pożywienia lub hipoksji, wskazując na zaangażowanie autofagii w związaną z rakiem dysregulację p53 (Tasdemir E. i wsp., 2008). Z kolei drugi z badanych w niniejszej pracy czynników transkrypcyjnych, p65NFκB, znajdując się w cytoplazmie indukuje śmierć komórki, natomiast w wyniku translokacji do jądra, promuje jej przeżycie. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania związków z udziałem tychże czynników wskazują, że apoptoza indukowana przez HIMOXOL w komórkach MDA-MB-231, a także autofagia, jest zależna od tych właśnie białek, gdyż HIMOXOL w stężeniu aktywującym autofagię powoduje translokacje p53 do jądra oraz spadek poziomu p65NFκB w tym przedziale komórkowym. Ocena mechanizmu autofagii wywoływanej przez HIMOXOL w komórkach MCF7 wskazuje na udział w tej ścieżce p53 (translokacja do jądra).

W przypadku traktowania komórek MDA-MB-231 pochodną laktonową (Br-HIMOLID), nie zaobserwowano znamienych statystycznie zmian w poziomach białek p53 i p65NFκB. W przypadku komórek MCF7 obserwujemy efekt działania przeciwny do tego, jaki wywołała w komórkach MDA-MB-231 pochodna oksymowa. Mianowicie, pod wpływem związku, p65NFκB ulega translokacji do jądra, a p53 kumulacji w cytoplazmie. A więc obserwowana w tych komórkach indukcja śmierci na drodze autofagii, prawdopodobnie jest regulowana przez inne niż p53 i p65NFκB czynniki transkrypcyjne, tj., c-Jun, czy ATF-2 i wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wskazują, że OA i jego syntetyczne pochodne nie wpływają na proces migracji oraz indukcję śmierci komórki na drodze apoptozy i autofagii w komórkach prawidłowych gruczołu piersiowego MCF-12A, natomiast HIMOXOL i Br-HIMOLID wykazują odmienny mechanizm działania względem komórek raka piersi. Duże znaczenie z pewnością ma ekspresja specyficznych receptorów w badanych komórkach. Uzyskane w pracy wyniki badań sugerują, że w komórkach estrogenowo-zależnych wyższą aktywnością charakteryzuje się HIMOXOL, natomiast w komórkach nie wykazujących ekspresji receptora estrogenowego, pochodna zawierająca w swej strukturze atom bromu oraz ugrupowanie laktonowe. Nie bez znaczenia jest z pewnością potencjał inwazyjny obu typów komórek nowotworowych. Badania wykazały, że Br-HIMOLID w zastosowanych niecytotoksycznych stężeniach, posiada wyższą aktywność w komórkach MDA-MB-231, których 10-krotnie wyższa inwazyjność, warunkowana jest obecnością EGFR i TLR2.

Badania kliniczne wskazują, że wysoka śmiertelność pacjentów z nowotworami piersi wykazującymi przerzutowanie, nie ulega poprawie podczas leczenia chirurgicznego,

radioterapii czy wspomagającej chemioterapii, jako że ten typ raka piersi jest wysoko oporny na działanie chemioterapeutyków i niestety ciągle brak jest efektywnych skutków leczenia wśród pacjentów z zaawansowaną postacią choroby. W związku z tym poszukuje się nowych celów terapeutycznych i związków wykazujących aktywność przeciwnowotworową, chroniących przed inwazją i metastazą raka piersi (Mach M., 2004; Yeh C.T. i wsp., 2010). Podsumowując, niniejsza praca dostarcza dowodów na obiecujące działanie syntetycznych pochodne kwasu oleanolowego, HIMOXOL i Br-HIMOLID, które indukują programowaną śmierć komórek raka piersi zależną od MAP kinaz oraz czynników transkrypcyjnych, a także hamują rozwój nowotworu poprzez ograniczenie jego rozprzestrzeniania się. Co należy podkreślić, badane pochodne kwasu oleanolowego, nie wykazują wpływu na komórki prawidłowe gruczołu piersiowego, tym samym wskazują kierunek dla projektowania związków o wyższej aktywności przeciwnowotworowej względem komórek nowotworowych gruczołu piersiowego.

6. WNIOSKI

Przeprowadzone badania wskazują, że:

1. Modyfikacja struktury chemicznej kwasu oleanolowego polegająca na wstawieniu ugrupowania hydroksyiminowego w pozycji C3, grupy ketonowej w pozycji C11 oraz estryfikacji grupy karboksylowej w pozycji C28 szkieletu podstawowego, zwiększa efektywność działania związku w komórkach raka piersi.
2. HIMOXOL w stężeniu odpowiadającym wartości IC_{50} wykazuje aktywność proapoptotyczną w komórkach estrogenowo-niezależnych MDA-MB-231, a proces ten zachodzi ścieżką zewnątrzpochodną.
3. Br-HIMOLID oraz HIMOXOL aktywują proces autofagii wyłącznie w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego, a mechanizm ten jest regulowany przez białko beklinę 1.
4. Br-HIMOLID i HIMOXOL w stężeniach niecytotoksycznych nie wpływają na migrację komórek prawidłowych gruczołu piersiowego MCF-12A, natomiast poprzez obniżanie poziomu białek: FAK, paksyliny oraz integryny $\beta 1$, wykazują zdolność do hamowania migracji oraz inwazji komórek raka piersi MCF7 i MDA-MB-231.
5. Mechanizm działania badanych pochodnych kwasu oleanolowego w komórkach raka piersi podlega regulacji przez kinazy MAP: p38 α i JNK1/2 oraz czynniki transkrypcyjne p53 i p65NF κ B.

7. PIŚMIENICTWO

1. Ahmad R., Raina D., Meyer C., Kufe D., Triterpenoid CDDO-methyl ester inhibits the Janus-activated kinase-1 (JAK1)-->signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) pathway by direct inhibition of JAK1 and STAT3, *Cancer Res.* 2008; 68(8):2920-6.
2. Agarwal A., Mahfouz R.Z., Sharma R.K., Sarkar O., Mangrola D., Mathur P.P., Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes, *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:143.
3. Albiges-Rizo C., Bouvard D., Bouin AP., Planus E., Faurobert E., Block MR., Talin, a bodybuilder-like protein for integrin mediated force transmission in cells, *Med Sci.* 2009; 25(11):909-11.
4. Anthis N.J., Wegener K.L., Ye F., Kim C., Goult B.T., Lowe E.D., Vakonakis I., Bate N., Critchley D.R., Ginsberg M.H., Campbell I.D., The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction, *EMBO J.* 2009;28(22):3623-32.
5. Arold S.T., How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action, *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21(6):808-13.
6. Baltina L.A., Flekhter O.B., Nigmatullina L.R., Boreko E.I., Pavlova N.I., Nikolaeva S.N., Savinova O.V., Tolstikov G.A. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity, *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13(20):3549-52.
7. Basuroy S., Dunagan M., Sheth P., Seth A., Rao R.K., Hydrogen peroxide activates focal adhesion kinase and c-Src by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent mechanism and promotes cell migration in Caco-2 cell monolayers, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Jul;299(1):G186-95.
8. Bellot G., Garcia-Medina R., Gounon P., Chiche J., Roux D., Pouysségur J., Mazure N.M., Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains, *Mol Cell Biol.* 2009; 29(10):2570-81.
9. Bendas G., Borsig L., Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins, *Int J Cell Biol.* 2012;2012:676731.
10. Bohensky J., Leshinsky S., Srinivas V., Shapiro I.M., Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression, *Pediatr Nephrol.* 2010; 25(4):633-42.
11. Boya P., Kroemer G., Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis, *Oncogene.* 2009 28;28(21):2125-7.
12. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

13. Bury M., Andolfi A., Rogister B., Cimmino A., Mégalizzi V., Mathieu V., Feron O., Evidente A., Kiss R., Fusicocin a, a phytotoxic carbocyclic diterpene glucoside of fungal origin, reduces proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting multiple tyrosine kinases, *Transl Oncol.* 2013; 6(2):112-23.
14. Cao Y., Kilonsky D.J., Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein, *Cell Res.* 2007; 17(10):839-49.
15. Cai X., Li M., Vrana J., Schaller M.D., Glycogen synthase kinase 3- and extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of paxillin regulates cytoskeletal rearrangement, *Mol Cell Biol.* 2006; 26(7):2857-68.
16. Carew J.S., Kelly K.R., Nawrocki S.T., Autophagy as a target for cancer therapy: new developments, *Cancer Manag Res.* 2012; 4:357-65.
17. Chen N., Debnath J., Autophagy and tumorigenesis, *FEBS Lett.* 2010; 584(7):1427-35.
18. Chen J.Y., Tang Y.A., Huang S.M., Juan H.F., Wu L.W., Sun Y.C., Wang S.C., Wu K.W., Balraj G., Chang T.T., Li W.S., Cheng H.C., Wang Y.C., A novel sialyltransferase inhibitor suppresses FAK/paxillin signaling and cancer angiogenesis and metastasis pathways, *Cancer Res.* 2011; 71(2):473-83.
19. Chen H.Y., White E., Role of autophagy in cancer prevention, *Cancer Prev Res.* 2011; 4(7):973-83.
20. Chojnicka I., Janiszowska W., Przeciwnowotworowe działanie roślinnych triterpenoidów: kwasu oleanolowego i ursolowego oraz ich pochodnych, *KOSMOS.* 2007; 56 (3-4): 335-341.
21. Chołuj A., Janiszowska W., Pochodne kwasu oleanolowego i ich działanie farmakologiczne *Herb Pol.* 2005; 51: 65-75.
22. Chonghaile T.N., Letai A., Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells, *Oncogene.* 2008; 27 1:S149-57.
23. Corona G., Rizzolio F., Giordano A., Toffoli G.J., Pharmaco-metabolomics: an emerging "omics" tool for the personalization of anticancer treatments and identification of new valuable therapeutic targets, *Cell Physiol.* 2012; 227(7):2827-31.
24. Criollo A., Chereau F., Malik S.A., Niso-Santano M., Mariño G., Galluzzi L., Maiuri M.C., Baud V., Kroemer G., Autophagy is required for the activation of NFκB, *Cell Cycle.* 2012; 11(1):194-9.
25. Czaja J.M., Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease, *Gastroenterology.* 2011; 140(7):1895-908.
26. Das G., Shrivage B.V., Baehrecke E.H., Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(6).
27. de Almagro M.C., Vucic D., The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy, *Exp Oncol.* 2012; 34(3):200-11.

28. Deakin N.O., Turner C.E., Paxillin comes of age, *J Cell Sci.* 2008;121(Pt15):2435-44.
29. Decuypere J.P., Bultynck G., Parys J.B., A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation, *Cell Calcium.* 2011; 50(3):242-50.
30. Deeb D., Gao X., Jiang H., Dulchavsky S.A., Gautam S.C., Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells by independently targeting pro-survival Akt and mTOR, *Prostate.* 2009; 69(8):851-60.
31. Desgrosellier J.S., Cheresch D.A., Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(1):9-22.
32. Dlamini Z., Mbita Z., Zungu M., Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis, *Pharmacol Ther.* 2004; 101(1):1-15.
33. Dutta P.R., Maity A., Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett.* 2007; 254(2):165-77.
34. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.U., Kimchi A., Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them, *Cell Death Differ.* 2009;16(7):966-75.
35. El-Sawi E.A., Sayed T.M, Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, Metallation of Some New Imines and Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Activity, 2013;43(6):722-727.
36. Erenpreisa J., Huna A., Salmina K., Jackson T.R., Cragg M.S., Macroautophagy-aided elimination of chromatin: sorting of waste, sorting of fate? *Autophagy.* 2012; 8(12):1877-81.
37. Fan D.M., Shi H.R., Pilot study: alteration of deleted in liver cancer1 and phosphorylated focal adhesion kinase Y397 cytoplasmic expression and the prognostic value in advanced epithelial ovarian carcinoma, *Int J Mol Sci.* 2011; 12(12):8489-501.
38. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., De Laurenzi V., Role of apoptosis in disease, *Aging.* 2012; 4(5):330-49.
39. Ferté J., Kühnel J.M., Chapuis G., Rolland Y., Lewin G., Schwaller M.A., J Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships, *Med Chem.* 1999; 42(3):478-89.
40. Fiandalo M.V., Kyprianou N., Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis, *Exp Oncol.* 2012 ; 34(3):165-75.
41. Fujita N., Matsunaga K., Noda T., Yoshimori T., Molecular mechanism of autophagosome formation in mammalian cells, *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2008;53(16 Suppl):2106-10.
42. Gancz D., Lusthaus M., Fishelson Z., A role for the NFκB Pathway in cell protection from Complement-Dependent Cytotoxicity, *J Immunol.* 9, 2013.

43. Gavathiotis E., Suzuki M., Davis M.L., Pitter K., Bird G.H., Katz S.G., Tu H.C., Kim H., Cheng E.H., Tjandra N., Walensky L.D., BAX activation is initiated at a novel interaction site, *Nature*. 2008; 455(7216):1076-81.
44. Ghavami S., Mutawe M.M., Sharma P., Yeganeh B., McNeill K.D., Klonsch T., Unruh H., Kashani H.H., Schaafsma D., Los M., Halayko A.J., Mevalonate cascade regulation of airway mesenchymal cell autophagy and apoptosis: a dual role for p53. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16523.
45. Giansanti V., Torriglia A., Scovassi A.I., Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?", *Apoptosis*. 2011; 16(4):321-33.
46. Gloire G., Piette J., Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation, *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(9):2209-22.
47. Green D.R., Kroemer G., Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53, *Nature*. 2009; 458(7242):1127-30.
48. Goetz J.A., Mechref Y., Kang P., Jeng M.H., Novotny M.V., Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells, *Glycoconj J*. 2009; 26(2):117-31.
49. Gogvadze V., Targeting mitochondria in fighting cancer, *Curr Pharm Des*. 2011; 17(36):4034-46.
50. Guan J.L., Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer, *IUBMB Life*. 2010; 62(4):268-76.
51. Gump J.M., Thorburn A., Autophagy and apoptosis: what is the connection?, *Trends Cell Biol*. 2011; 21(7):387-92.
52. Hao H.F., Naomoto Y., Bao X.H., Watanabe N., Sakurama K., Noma K., Tomono Y., Fukazawa T., Shirakawa Y., Yamatsuji T., Matsuoka J., Takaoka M., Progress in researches about focal adhesion kinase in gastrointestinal tract, *World J Gastroenterol*. 2009; 15(47):5916-23.
53. Hao J., Pei Y., Ji G., Li W., Feng S., Qiu S., Autophagy is induced by 3 β -O-succinyl-lupeol (LD9-4) in A549 cells via up-regulation of Beclin 1 and down-regulation mTOR pathway, *Eur J Pharmacol*. 2011; 670(1):29-38.
54. Harburger D.S., Calderwood D.A, Integrin signalling at a glance, *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 2):159-63.
55. Hay N., Sonenberg N., Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev*. 2004; 18(16):1926-45.
56. Ho J.Q., Asagiri M., Hoffmann A., Ghosh G., NF- κ B potentiates caspase independent hydrogen peroxide induced cell death, *PLoS One*. 2011; 6(2):e16815.
57. Honda T., Rounds B.V., Gribble G.W., Suh N., Wang Y., Sporn M.B., Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages, *Bioorg Med Chem Lett*. 1998; 8(19):2711-4.

58. Honda T., Rounds B.V., Bore L., Favaloro F.G. Jr, Gribble G.W., Suh N., Wang Y., Spor M.B., Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages, *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9(24):3429-34.
59. Hua Y., Zhang Z., Li J., Li Q., Hu S., Li J., Sun M., Cai Z., Oleanolic acid derivative Dex-OA has potent anti-tumor and anti-metastatic activity on osteosarcoma cells in vitro and in vivo, *Invest New Drugs*. 2011; 29(2):258-65.
60. Huanwen W., Zhiyong L., Xiaohua S., Xinyu R., Kai W., Tonghua L., Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines, *Mol Cancer*. 2009; 8:125.
61. Jagadeeswaran R., Surawska H., Krishnaswamy S., Janamanchi V., Mackinnon A.C., Seiwert T.Y., Loganathan S., Kanteti R., Reichman T., Nallasura V., Schwartz S., Faoro L., Wang Y.C., Girard L., Tretiakova M.S., Ahmed S., Zumba O., Soulii L., Bindokas V.P., Szeto L.L., Gordon G.J., Bueno R., Sugarbaker D., Lingen M.W., Sattler M., Krausz T., Vigneswaran W., Natarajan V., Minna J., Vokes E.E., Ferguson M.K., Husain A.N., Salgia R., Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion, *Cancer Res*. 2008; 68(1):132-42.
62. Jaeger P.A., Wyss-Coray T., Beclin 1 complex in autophagy and Alzheimer disease, *Arch Neurol*. 2010; 67(10):1181-4.
63. Jia W., Pua H.H., Li Q.J., He Y.W., Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes, *J Immunol*. 2011; 186(3):1564-74.
64. Jinka R., Kapoor R., Pavuluri S., Raj A.T., Kumar M.J., Rao L., Pande G., Differential gene expression and clonal selection during cellular transformation induced by adhesion deprivation, *BMC Cell Biol*. 2010; 11:93.
65. Kalkhambkar R.G., Kulkarni G.M., Kamanavalli C.M., Premkumar N., Asdaq S.M., Sun C.M., Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins, *Eur J Med Chem*. 2008; 43(10):2178-88.
66. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, *Cell Death Differ*. 2011; 18(4):571-80.
67. Kelly P.N., Strasser A., The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy, *Cell Death Differ*. 2011; 18(9):1414-24.
68. Kim E.H., Deng C.X., Sporn M.B., Liby K.T., CDDO-Imidazolide induces DNA damage, G2/M arrest and apoptosis in BRCA1-mutated breast cancer cells, *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4(3): 425-434.
69. Kimmelman A.C., The dynamic nature of autophagy in cancer, *Genes Dev*. 2011; 25(19):1999-2010.
70. Konopleva M., Zhang W., Shi Y.X., McQueen T., Tsao T., Abdelrahim M., Munsell M.F., Johansen M., Yu D., Madden T., Safe S.H., Hung M.C., Andreeff M., Synthetic triterpenoid 2-

cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells, *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(2):317-28.

71. Kost A., Kasprowska D., Labuzek K., Wiaderkiewicz R., Gabryel B., Autophagy in brain ischemia, *Postepy Hig Med Dosw.* 2011; 65:524-33.
72. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Pitiakoudis M., Gatter K.C., Harris A.L., Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia, *Br J Cancer.* 2010; 103(8):1209-14.
73. Kumar R., Saha A., Saha D., A new antifungal coumarin from *Clausena excavate*, *Fitoterapia.* 2012; 83(1):230-3.
74. Kung C.P., Budina A., Balaburski G., Bergenstock M.K., Murphy M., Autophagy in tumor suppression and cancer therapy, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011; 21(1):71-100.
75. Lahlou H., Muller W.J., β 1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer, *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):229.
76. Lal H., Suresh K. V., Foster D.H., Golden H.B., Reneau J.C., Watson L.E., Singh H., Dostal D.E., Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease, *Frontiers in Bioscience* 2009; 14, 2307-2334.
77. Lamparska-Przybysz M., Gajkowska B., Motyl T.J., Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin, *Physiol Pharmacol.* 2005; 56 Suppl 3:159-79.
78. Lee J.S., Li Q., Lee J.Y., Lee S.H., Jeong J.H., Lee H.R., Chang H., Zhou F.C., Gao S.J., Liang C., Jung J.U., FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control, *Nat Cell Biol.* 2009; 11(11):1355-62.
79. Lee S.J., Kim H.P., Jin Y., Choi A.M., Ryter S.W., Beclin 1 deficiency is associated with increased hypoxia-induced angiogenesis, *Autophagy.* 2011; 7(8):829-39.
80. Lefranc F., Mijatovic T., Decaestecker C., Kaltner H., André S., Brotchi J., Salmon I., Gabius H.J., Kiss R., Monitoring the expression profiles of integrins and adhesion/growth-regulatory galectins in adamantinomatous craniopharyngiomas: their ability to regulate tumor adhesiveness to surrounding tissue and their contribution to prognosis, *Neurosurgery.* 2005; 56(4):763-76.
81. Lefranc F., Facchini V., Kiss R., Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas, *Oncologist.* 2007; 12(12):1395-403.
82. Levine B., Sinha S., Kroemer G., Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy, *Autophagy.* 2008; 4(5):600-6.
83. Levine B., Kroemer G., Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor, *Cell Death Differ.* 2009; 16(1):1-2.

84. Levine B., Mizushima N., Virgin H.W., Autophagy in immunity and inflammation, *Nature*. 2011; 469(7330):323-35.
85. Li Z., Chen B., Wu Y., Jin F., Xia Y., Liu X., Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors, *BMC Cancer*. 2010; 10:98.
86. Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.H., Jung J.U., Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG, *Nat Cell Biol*. 2006; 8(7):688-99.
87. Liby K., Risingsong R., Royce D.B., Williams C.R., Yore M.M., Honda T., Gribble G.W., Lamph W.W., Vannini N., Sogno I., Albini A., Sporn M.B., Prevention and treatment of experimental estrogen receptor-negative mammary carcinogenesis by the synthetic triterpenoid CDDO-methyl Ester and the rexinoid LG100268, *Clin Cancer Res*. 2008; 14(14):4556-63.
88. Lin K.L., Tsai P.C., Hsieh C.Y., Chang L.S., Lin S.R., Antimetastatic effect and mechanism of ovatodiolide in MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Chem Biol Interact*. 2011; 194(2-3):148-58.
89. Liu B., Cheng Y., Liu Q., Bao J.K., Yang J.M., Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin*. 2010; 31(9):1154-64.
90. Liu L., Fu J., Li T., Cui R., Ling J., Yu X., Ji H., Zhang Y., NG, a novel PABA/NO-based oleanolic acid derivative, induces human hepatoma cell apoptosis via a ROS/MAPK-dependent mitochondrial pathway, *Eur J Pharmacol*. 2012; 691(1-3):61-8.
91. Lockshin R.A., Zakeri Z., Apoptosis, autophagy, and more, *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(12):2405-19.
92. Lorin S., Pierron G., Ryan K.M., Codogno P., Djavaheri-Mergny M., Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy, *Autophagy*. 2010; 6(1):153-4.
93. Lucas D.M., Still P.C., Pérez L.B., Grever M.R., Kinghorn A.D., Potential of plant-derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma, *Curr Drug Targets*. 2010; 11(7):812-22.
94. Mach M., Białka adhezyjne w komórkach nowotworowych, 2005 www.biotechnolog.pl
95. Martyniszyn L., Orłowski P., Krzyżowska M., Niemiałtowski M.G., Autofagia w zakażeniach wirusowych i bakteryjnych: molekularna ruletka, *Post. Biol. Kom*. 2008; 35(3), 351-368.
96. Martyniszyn L., Szulc L., Boratyńska A., Niemiałtowski M.G., Beclin 1 is involved in regulation of apoptosis and autophagy during replication of ectromelia virus in permissive L929 cells, *Arch Immunol Ther Exp*. 2011; 59(6):463-71.
97. Mason S.D., Joyce J.A., Proteolytic networks in cancer, *Trends Cell Biol*. 2011; 21(4):228-37.
98. Maycotte P., Thorburn A., Autophagy and cancer therapy, *Cancer Biol Ther*. 2011; 11(2):127-37.

99. Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P., Autophagy in health and disease, Regulation and significance of autophagy: an overview, *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298(4):C776-85.
100. Michalak K., Hendrich A.B., Wesolowska O., Poła A., Compounds that modulate multidrug resistance in cancer cells, *Cell. Biol. Mol. Lett.* 2001, 6(2A): 362-368.
101. Mizushima N., Ohsumi Y., Yoshimori T., Autophagosome formation in mammalian cells, *Cell Struct Funct.* 2002; 27(6):421-9.
102. Mizushima Y., Ikuta A., Endoh K., Oshige M., Kasai N., Kamiya K., Satake T., Takazawa H., Morita H., Tomiyasu H., Yoshida H., Sugawara F., Sakaguchi K., Inhibition of DNA polymerases and DNA topoisomerase II by triterpenes produced by plant callus, *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(2):365-73.
103. Mizushima N., Autophagy: process and function, *Genes Dev.* 2007; 21(22):2861-73
104. Monian P., Jiang X., Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release, *Exp Oncol.* 2012; 34(3):185-91.
105. Montes de Oca M.N., Vara J., Milla L., Rivarola V., Ortiz C.S., Physicochemical properties and photodynamic activity of novel derivatives of triarylmethane and thiazine, *Arch Pharm (Weinheim).* 2013; 346(4):255-65.
106. Morselli E., Galluzzi L., Kepp O., Criollo A., Maiuri M.C., Tavernarakis N., Madeo F., Kroemer G., Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol, *Aging (Albany NY).* 2009; 1(12):961-70
107. Morselli E., Galluzzi L., Kepp O., Vicencio J.M., Criollo A., Maiuri M.C., Kroemer G., Anti- and pro-tumor functions of autophagy, *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(9):1524-32
108. Moscat J., Diaz-Meco M.T., p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer, *Cell.* 2009; 137(6):1001-4
109. Muñoz-Gámez J.A., Rodríguez-Vargas J.M., Quiles-Pérez R., Aguilar-Quesada R., Martín-Oliva D., de Murcia G., Menissier de Murcia J., Almendros A., Ruiz de Almodóvar M., Oliver F.J., PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage, *Autophagy.* 2009; 5(1):61-74
110. Nagano M., Hoshino D., Sakamoto T., Kawasaki N., Koshikawa N., Seiki M., ZF21 protein regulates cell adhesion and motility, *J Biol Chem.* 2010; 285(27):21013-2210
111. Nalla A.K., Asuthkar S., Bhoopathi P., Gujrati M., Dinh D.H., Rao J.S., Suppression of uPAR retards radiation-induced invasion and migration mediated by integrin β 1/FAK signaling in medulloblastoma, *PLoS One.* 2010; 5(9):
112. Nemchenko A., Caspase-3 regulates the release of autophagic vacuoles, *Designed for Autophagy.*, 2012
113. Notte A., Leclere L., Michiels C., Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer, *Biochem Pharmacol.* 2011; 82(5):427-34.

114. Olsson M., Zhivotovsky B., Caspases and cancer, *Cell Death Differ.* 2011; 18(9):1441-9
115. Onodera Y., Nam J.M, Sabe H., Intracellular trafficking of integrins in cancer cells, *Pharmacol Ther.* 2013; S0163-7258(13)00122-8.
116. Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F.T., Zhou T.T., Liu B., Bao J.K., Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif.* 2012; 45(6):487-98
117. Paszel A., Rubiś B., Bednarczyk-Cwynar B., Zaprutko L., Kaczmarek M., Hofmann J., Rybczyńska M., Oleanolic acid derivative methyl 3,11-dioxoolean-12-en-28-olate targets multidrug resistance related to ABCB1, *Pharmacol Rep.* 2011; 63(6):1500-17.
118. Patlolla J.M., Rao C.V., Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects, *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(1):147-55
119. Pattingre S., Espert L., Biard-Piechaczyk M., Codogno P., Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes, *Biochimie.* 2008; 90(2):313-23
120. Pavese J.M., Farmer R.L., Bergan R.C., Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein, *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(3):465-82.
121. Perycz M., Świech Ł., Malik A., Jaworski J., mTOR w fizjologii i patologii układu nerwowego, *Post. Biol. Kom.*2007; 34(3)511-525.
122. Piwko-Czuchra A., Koegel H., Meyer H., Bauer M., Werner S., Brakebusch C., Fässler R., Beta1 integrin-mediated adhesion signalling is essential for epidermal progenitor cell expansion, *PLoS One.* 2009;4(5):e5488.
123. Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R.N., Gilpin C., Levine B., Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development, *Cell.* 2007; 128(5):931-46
124. Radoshevich L., Murrow L., Chen N., Fernandez E., Roy S., Fung C., Debnath J., ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death, *Cell.* 2010; 142(4):590-600.
125. Rathinam R., Alahari S.K., Important role of integrins in the cancer biology, *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(1):223-37.
126. Relou I.A., Bax L.A., van Rijn H.J., Akkerman J.W., Site-specific phosphorylation of platelet focal adhesion kinase by low-density lipoprotein, *Biochem J.* 2003; 369(Pt 2):407-16.
127. Resende F.A., Mattos C.A., de Barcala A., Tavares D.C., Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice, *Life Sci.*2006; 79(13):6.
128. Reubold T.F., Eschenburg S., A molecular view on signal transduction by the apoptosome, *Cell Signal.* 2012; 24(7):1420-5.

129. Rivin N., Brosh R., Oren M., Rotter V., Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene-Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis, *Gen Can.* 2011; 2(4) 466-474.
130. Robertson L.K., Ostergaard H.L., Paxillin associates with the microtubule cytoskeleton and the immunological synapse of CTL through its leucine-aspartic acid domains and contributes to microtubule organizing center reorientation, *J Immunol.* 2011; 187(11):5824-33
131. Rosenfeldt M.T., Ryan K.M., The role of autophagy in tumour development and cancer therapy, *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:
132. Rosenfeldt M.T., Ryan K.M., The multiple roles of autophagy in cancer, *Carcinogenesis.* 2011; 32(7):955-63
133. Rosse C., Formstecher E., Boeckeler K., Zhao Y., Kremerskothen J., White M.D., Camonis J.H., Parker P.J., An aPKC-exocyst complex controls paxillin phosphorylation and migration through localised JNK1 activation, *PLoS Biol.* 2009; 7(11):
134. Roy S., Debnath J., Autophagy and tumorigenesis, *Semin Immunopathol.* 2010; 32(4):383-96
135. Rubinsztein D.C., Gestwicki J.E., Murphy L.O., Klionsky D.J., Potential therapeutic applications of autophagy, *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(4):304-12.
136. Saito Y., Shiota Y., Nishisaka M., Owaki T., Shimamura M., Fukai F., Inhibition of angiogenesis by a tenascin-c peptide which is capable of activating beta1-integrins, *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(5):1003-7
137. Samudio I., Kurinna S., Ruvolo P., Korchin B., Kantarjian H., Beran M., Dunner K. Jr, Kondo S., Andreeff M., Konopleva M., Inhibition of mitochondrial metabolism by methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-diene-28-oate induces apoptotic or autophagic cell death in chronic myeloid leukemia cells, *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(5):1130-9
138. Sankari S.L., Masthan K.M., Babu N.A., Bhattacharjee T., Elumalai M., Apoptosis in cancer-an update, *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(10):4873-8
139. Scheswohl D.M., Harrell J.R., Rajfur Z., Gao G., Campbell S.L., Schaller M.D., Multiple paxillin binding sites regulate FAK function, *J Mol Signal.* 2008; 3:1.
140. Serrels A., Canel M., Brunton V.G., Frame M.C., Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: insights from in vivo imaging, *Cell Adh Migr.* 2011; 5(4):360-5
141. Shin S., Wolgamott L., Yoon S.O., Integrin trafficking and tumor progression, *Int J Cell Biol.* 2012; 2012:516789
142. Sporn M.B., Liby K.T., Yore M.M., Fu L., Lopchuk J.M., Gribble G.W., New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress, *J Nat Prod.* 2011; 74(3):537-45

143. Sridharan S., Basu A., S6 kinase 2 promotes breast cancer cell survival via Akt, *Cancer Res.* 2011; 71(7):2590-9.
144. Stamatios E.T., Klijanienko J.T., Padoy E., Athanassiou S., Sastre-Garau X.X., Focal adhesion kinase (FAK) immunocytochemical expression in breast ductal invasive carcinoma (DIC): correlation with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity, *Med Sci Monit.* 2009; 15 (8):BR221-226.
145. Subauste CS., Autophagy as an antimicrobial strategy, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(6):743-52
146. Sultana N., Ata A.J., Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds, *Enzyme Inhib Med Chem.* 2008; 23(6):739-56.
147. Sun H.X., Zheng Q.F., Tu J., Induction of apoptosis in HeLa cells by 3beta-hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*, *Bioorg Med Chem.* 2006; 14(4):1189-98
Sun Q., Fan W., Zhong Q., Regulation of Beclin 1 in autophagy, *Autophagy.* 2009; 5(5):713-6
148. Sun W., Hu W., Xu R., Jin J., Szulc Z.M., Zhang G., Galadari S.H., Obeid L.M., Mao C., Alkaline ceramidase 2 regulates beta1 integrin maturation and cell adhesion, *FASEB J.* 2009; 23(2):656-66.
149. Sun X., Ai M., Wang Y., Shen S., Gu Y., Jin Y., Zhou Z., Long Y., Yu Q., Selective induction of tumor cell apoptosis by a novel P450-mediated reactive oxygen species (ROS) inducer methyl 3-(4-nitrophenyl) propionate, *J Biol Chem.* 2013; 288(13):8826-37
150. Stanton M.J., Dutta S., Zhang H., Polavaram N.S., Leontovich A.A., Hönscheid P., Sinicropo F.A., Tindall D.J., Muders M.H., Datta K., Autophagy control by the VEGF-C/NRP-2 axis in cancer and its implication for treatment resistance, *Cancer Res.* 2013; 73(1):160-71.
151. Sun Y., Zhang J., Peng Z.L., Beclin1 induces autophagy and its potential contributions to sensitizes SiHa cells to carboplatin therapy, *Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19(4):772-6.
152. Tanida I., Ueno T., Kominami E., LC3 and Autophagy, *Methods Mol Biol.* 2008; 445:77-88
153. Tasdemir E., Chiara K., Maiuri M., Morselli E., Criollo A., D'Amelio M., Djavaheri-Mergny M., Cecconi F., Tavernarakis N., Kroemer G., A dual role of p53 in the control of autophagy, *Autophagy.* 2008; 4(6):810-4.
154. Tasdemir E., Maiuri M.C., Orhon I., Kepp O., Morselli E., Criollo A., Kroemer G., p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion, *Cell Cycle.* 2008; 7(19):3006-11
155. Tantithanaporn S., Wattanapiromsakul C., Itharat A., Keawpradub N., Cytotoxic activity of acetogenins and styryl lactones isolated from *Goniothalamus undulatus* Ridl. root extracts against a lung cancer cell line (COR-L23), *Phytomedicine.* 2011; 18(6):486-90.
156. Taylor P.G., Dupuy Loo O.A., Bonilla J.A., Murillo R., Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia.* 2008; 79(6):428-32.

157. Thorburn A., Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes, *Apoptosis*. 2008; 13(1):1-9.
158. Thornton T.M., Rincon M., Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival, *Int J Biol Sci* 2009; 5(1):44-52.
159. Totoń E., Rybczyńska M., The characteristics of focal adhesion kinase (FAK) and its role in carcinogenesis, *Postepy Hig Med Dosw*. 2007; 61:303-9
160. Turcotte S., Giaccia A.J., Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy, *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22(2):246-51.
161. Turecková J., Vojtechová M., Krausová M., Sloncová E., Korínek V., Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells, *Transl Oncol*. 2009; 2(4):281-90.
162. Turner C.E., Paxillin interactions, *J Cell Sci*. 2000; 113(23): 4139-40.
163. van Ham T.J., Mapes J., Kokel D., Peterson R.T., Live imaging of apoptotic cells in zebrafish, *FASEB J*. 2010; 24(11):4336-42.
164. Vindrieux D., Réveiller M., Chantepie J., Yakoub S., Deschildre C., Ruffion A., Devonec M., Benahmed M., Grataroli R., Down-regulation of DcR2 sensitizes androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells to TRAIL-induced apoptosis, *Cancer Cell Int*. 2011; 11:42.
165. Virtanen S.S., Sandholm J., Yegutkin G., Kalervo Väänänen H., Härkönen P.L., Inhibition of GGTase-I and FTase disrupts cytoskeletal organization of human PC-3 prostate cancer cells, *Cell Biol Int*. 2010; 34(8):815-26.
166. Wang C., Wang Y., McNutt M.A., Zhu W.G., Autophagy process is associated with anti-neoplastic function, *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011; 43(6):425-32.
167. Watanabe H., Gan T., Kagaku R., Extracellular matrix--regulation of cancer invasion and metastasis, 2010; 37(11):2058-61.
168. Weidberg H., Shpilka T., Shvets E., Elazar Z., Mammalian Atg8s: one is simply not enough, *Autophagy*. 2010; 6(6):808-9.
169. Weidberg H., Shvets E., Elazar Z., Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes, *Annu Rev Biochem*. 2011; 80:125-56.
170. Weyhenmeyer B., Murphy A.C., Prehn J.H., Murphy B.M., Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer, *Exp Oncol*. 2012; 34(3):192-9.
171. White E., Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(6):401-10.
172. Wirawan E., Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claeerhout S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenabeele P., Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced

autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria, *Cell Death Dis.*

173. Wu W.K., Coffelt S.B., Cho C.H., Wang X.J., Lee C.W., Chan F.K., Yu J., Sung J.J., The autophagic paradox in cancer therapy, *Oncogene.* 2012; 31(8):939-53.
174. www.reading.ac.uk
175. Yadav V.R., Prasad S., Sung B., Kannappan R., Aggarwal B.B., Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer, *Toxins (Basel).* 2010; 2(10):2428-66.
176. Yan S.L., Huang C.Y., Wu S.T., Yin M.C., Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicol In Vitro.* 2010; 24(3):842-8.
177. Yang P.M., Chen C.C., Life or death? Autophagy in anticancer therapies with statins and histone deacetylase inhibitors, *Autophagy.* 2011; 7(1):107-8.
178. Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H., Molecular mechanism and regulation of autophagy, *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26(12):1421-34.
179. Yang Z., Klionsky D.J., Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation, *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22(2):124-31.
180. Zaprutko L., Partyka D., Bednarczyk-Cwynar B., Part 21: Oleanolic acid derivatives as percutaneous transport promoters, *Triterpenoids. Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14(18):4723-6.
181. Zhang J.Y., Selim M.A., The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer, *Am J Cancer Res.* 2012; 2(6):691-8.
182. Zhang Y., Wu Y., Wu D., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T., NF-kappaB facilitates oridonin-induced apoptosis and autophagy in HT1080 cells through a p53-mediated pathway, *Arch Biochem Biophys.* 2009; 489(1-2):25-33.
183. Zhao X., Guan J.L., Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis, *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(8):610-5.

8. STRESZCZENIE

Ogromna chemiczna różnorodność, występujących w przyrodzie związków w połączeniu z długoletnią biologiczną selekcją, przyniosła ogrom niezbadanych, unikalnych struktur chemicznych cechujących się aktywnością biologiczną. Do grupy takich związków należą triterpeny, spośród których, ze względu na wysoką aktywność farmakologiczną, ważne miejsce zajmuje kwas oleanolowy (OA). Jednakże mała selektywność działania tego związku, wraz z występowaniem szeregu skutków ubocznych skłoniła do poszukiwania nowych substancji, charakteryzujących się wyższą efektywnością działania w kierunku komórek nowotworowych.

Celem niniejszej rozprawy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie: jakie mechanizmy są odpowiedzialne za działanie nowo syntetyzowanych triterpenów, pochodnych kwasu oleanolowego na różne fenotypowo i genotypowo komórki raka piersi. Realizując postawione cele oceniono efekt cytotoksyczny *in vitro* nowych analogów OA: laktonowego (Br-HIMOLID), diketonowego (DIOXOL), oksymowego (HIMOXOL) oraz laktamowego (HIMOXAZOL) w stosunku do linii komórek prawidłowych, MCF-12A oraz komórek nowotworowych gruczołu piersiowego, MCF7 i MDA-MB-231. Pochodne kwasu oleanolowego zsyntetyzowano w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Spośród badanych związków, największym potencjałem względem badanych linii komórkowych charakteryzował się HIMOXOL. Wysoką efektywność względem komórek MCF7 i MCF-12A wykazywał również Br-HIMOLID, dlatego do dalszych etapów badań zakwalifikowano te związki.

Przeprowadzone badania dostarczyły informacji o sile działania związków, natomiast należało określić, czy jest to efekt cytostatyczny czy cytotoksyczny. Dlatego też w kolejnym etapie badań oceniono wpływ OA oraz obu pochodnych na poszczególne fazy cyklu komórkowego oraz indukcję procesu apoptozy. Cytometryczna analiza wykazała, że w komórkach prawidłowych (MCF-12A) oraz MCF7, związki nie wpływają na proliferację, nie kierują również komórek na drogę apoptozy. Natomiast w komórkach raka piersi bardziej inwazyjnych, MDA-MB-231, charakteryzujących się brakiem receptora estrogenowego, związki nie powodowały zmian w poszczególnych fazach cyklu, natomiast HIMOXOL w stężeniu odpowiadającym IC_{50} indukował wzrost odsetka komórek kierowanych do apoptozy. Dla wyjaśnienia tego zjawiska oceniono poziom białek z rodziny Bcl-2 (Bax i Bcl-2), a także enzymów, białek inicjatorowych szlaku zewnętrznego i wewnętrznego apoptozy (kaspaza-8 i kaspaza-9) oraz enzymu wykonawczego apoptozy (kaspaza-3) i substratu dla kaspazy-3, PARP1. Badania te wykazały wzrost poziomu

białka proapoptotycznego Bax oraz udział drogi zewnętrznej w indukcji tego procesu. Ponadto, tylko w komórkach raka piersi obu linii, badania z wykorzystaniem znanego markera autofagii LC3-II, wykazały zdolność obu badanych pochodnych OA do indukcji procesu autofagii podlegającej regulacji przez Beklinę 1.

Zahamowanie rozprzestrzeniania w ustroju komórek nowotworowych poprzez modulację procesu adhezji i migracji, a także wpływ na inwazyjność, jest istotnym elementem walki z rakiem. Dlatego też podjęto próbę zbadania wpływu OA i wybranych pochodnych na migrację i inwazję komórek gruczołu piersiowego. Eksperymenty wykazały zdolność pochodnych OA do hamowania migracji oraz obniżania inwazji komórek MCF7 i MDA-MB-231, natomiast nie wpływały na migrację komórek prawidłowych, MCF-12A.

Cykl komórkowy, proces apoptozy i autofagii oraz migracja komórek podlegają regulacji z udziałem MAP kinaz oraz czynników transkrypcyjnych. Dlatego analizie poddano poziom białek JNK1/2 i p38 α oraz p53 i p65NF κ B. W komórkach MDA-MB-231, potraktowanych HIMOXOL, zaobserwowano spadek poziomu obu izoform białka JNK, jak również wzrost poziomu białka p38 α . Równocześnie badana pochodna wywołała spadek poziomu frakcji cytozolowej i jądrowej czynnika transkrypcyjnego p65NF κ B oraz translokacji białka p53 z cytozolu do jądra, co sugeruje obniżenie potencjału antyapoptotycznego i koreluje z obserwowanym procesem apoptozy i autofagii.

Przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej badania wskazują na zależną od struktury aktywność biologiczną pochodnych kwasu oleanolowego względem komórek gruczołu piersiowego i dostarczają informacji, które mogą być wykorzystane w molekularnym modelowaniu związków działających selektywnie na komórki nowotworowe.

9. ABSTRACT

The huge chemical diversity of naturally occurring compounds in combination with a long biological selection revealed many unexplored and unique chemical structures showing a biological activity. The group of such compounds contains triterpenes of which, due to the high pharmacological activity, oleanolic acid (OA) is supposed to be one of the most important. However, the low selectivity of this compound with accompanying side effects has led to an attempt to search for new derivatives with a higher effectiveness in tumor cells.

The aim of this work was to answer the question: what mechanisms are responsible for the activity of the newly synthesized triterpenes, oleanolic acid derivatives, in genetically different breast cancer cells? Thus the *in vitro* cytotoxic effect of the new analogues of OA: lactone (Br-HIMOLID), diketone (DIOXOL), oxime (HIMOXOL) and lactam (HIMOXAZOL) in normal cell line, MCF-12A, and breast tumor cells, MCF7 and MDA-MB-231, was investigated. All of the synthetic derivatives were synthesized in the Department of Organic Chemistry, Poznan University of Medical Sciences. Among all tested compounds, HIMOXOL revealed the highest cytotoxic potential in tested cancer cell lines. The high activity of Br-HIMOLID was also shown in MCF-12A and MCF7 cells. In applied concentration (up to 50 μ M), the lactone derivative did not show cytotoxic effect against MDA-MB-231 cells. However, it was interesting how this chemical modifications influence on more invasive breast cancer cells. Thus further studies were performed with these two derivatives.

The results of the study provided the information on the potency of the compounds. Consequently, it was to be determined whether it was a cytostatic or cytotoxic effect. Therefore, in the next stage of investigation, the effect of OA and its derivatives on the phases of the cell cycle and on apoptosis induction was assessed. The cytometric analysis showed that in normal (MCF-12A) and cancer (MCF7) cells, the compounds did not affect the proliferation, and did not induce apoptosis. However, in more invasive breast cancer cells, MDA-MB-231, characterized by the absence of estrogen receptor, the compounds did not cause any significant changes in the cell cycle phases, but in a concentration corresponding to IC_{50} of HIMOXOL, increased the percentage of cells directed to apoptosis. To explain this phenomenon the level of proteins Bcl-2 (Bax and bcl-2), as well as enzymes, protein initiators of external and internal pathways of apoptosis (caspase-8 and caspase-9), the apoptosis executive enzyme (caspase-3) and the substrate for caspase-3, PARP1, were investigated. These studies showed an increase in the level of pro-apoptotic protein Bax and a significant

role of the external pathway in this process. Moreover, it was revealed in both breast cancer cell lines, but not in normal ones (using a well-known autophagy marker LC3-II) that both tested OA derivatives induced autophagy and that this process was regulated by Beclin 1.

Inhibition of cancer cells spreading by modulating the process of adhesion and migration, as well as the invasion, are important elements in the cancer fighting strategy. Therefore, an attempt was made to examine the influence of OA derivatives on the migration and invasion of breast cells. The results demonstrated the ability of Br-HIMOLID and HIMOXOL to inhibit migration and decrease MCF7 and MDA-MB-231 cells invasion, but without any influence on the migration of normal breast cells, MCF-12A.

The cell cycle, apoptosis, autophagy and cell migration are regulated through MAP kinases and transcription factors. Therefore the influence of OA derivatives on the level of proteins JNK1 / 2, p38 α and p53, p65NF κ B was studied. In MDA-MB-231 cells treated with HIMOXOL, a decrease in the level of both JNK isoforms, as well as an increase in the level of p38 α was observed. Simultaneously, the tested derivatives caused a decrease in translocation of cytosolic and nuclear fractions of the transcription factor p65NF κ B, and p53 from the cytosol to the nucleus, suggesting a reduction in the anti-apoptotic potential and a correlation with the observed apoptosis and autophagy.

In conclusion, results obtained in this dissertation indicate a structure-activity relationship (SAR) of oleanolic acid derivatives with breast cells metabolism and provide information that could be useful in molecular modeling of compounds acting selectively on breast cancer cells.