OCENA INDUKCJI SZLAKU MITOCHONDRIALNEGO APOPTOZY PRZEZ INHIBITORY PROTEASOMÓW W KOMÓRKACH LINII AMELANOTYCZNEJ CZERNIAKA BOMIRSKIEGO

Justyna Sidor-Kaczmarek, Sławomir Wójcik , Jan H. Spodnik , Janusz Moryś

Zakład Anatomii i Neurobiologii, **Gdański Uniwersytet Medyczny**

Wstęp

Czerniak skóry jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z melanocytów. Oporność czerniaka na konwencjonalną chemioterapię oraz szybko wzrastająca liczba zachorowań powoduje, że podejmowane są próby leczenia czerniaka nowymi substancjami o działaniu przeciwnowotworowym, takimi jak inhibitory proteasomów (IP). Związki te hamują w komórkach działanie proteasomów – kluczowego składnika układu ubikwityna-proteasomy (UPS), który odpowiada za degradację białek. Cytotoksyczne działanie inhibitorów proteasomów opiera się na blokowaniu układu UPS, co prowadzi do zaburzenia homeostazy komórki i w konsekwencji śmierci na drodze apoptozy.

Cel

Celem pracy była ocena wpływu trzech IP różniących się strukturą chemiczną: MG-132, epoksomycyny i laktacystyny na indukcję szlaku mitochondrialnego apoptozy w komórkach linii amelanotycznej (Ab) przeszczepialnego czerniaka chomika (czerniaka Bomirskiego).

Materiał i metody

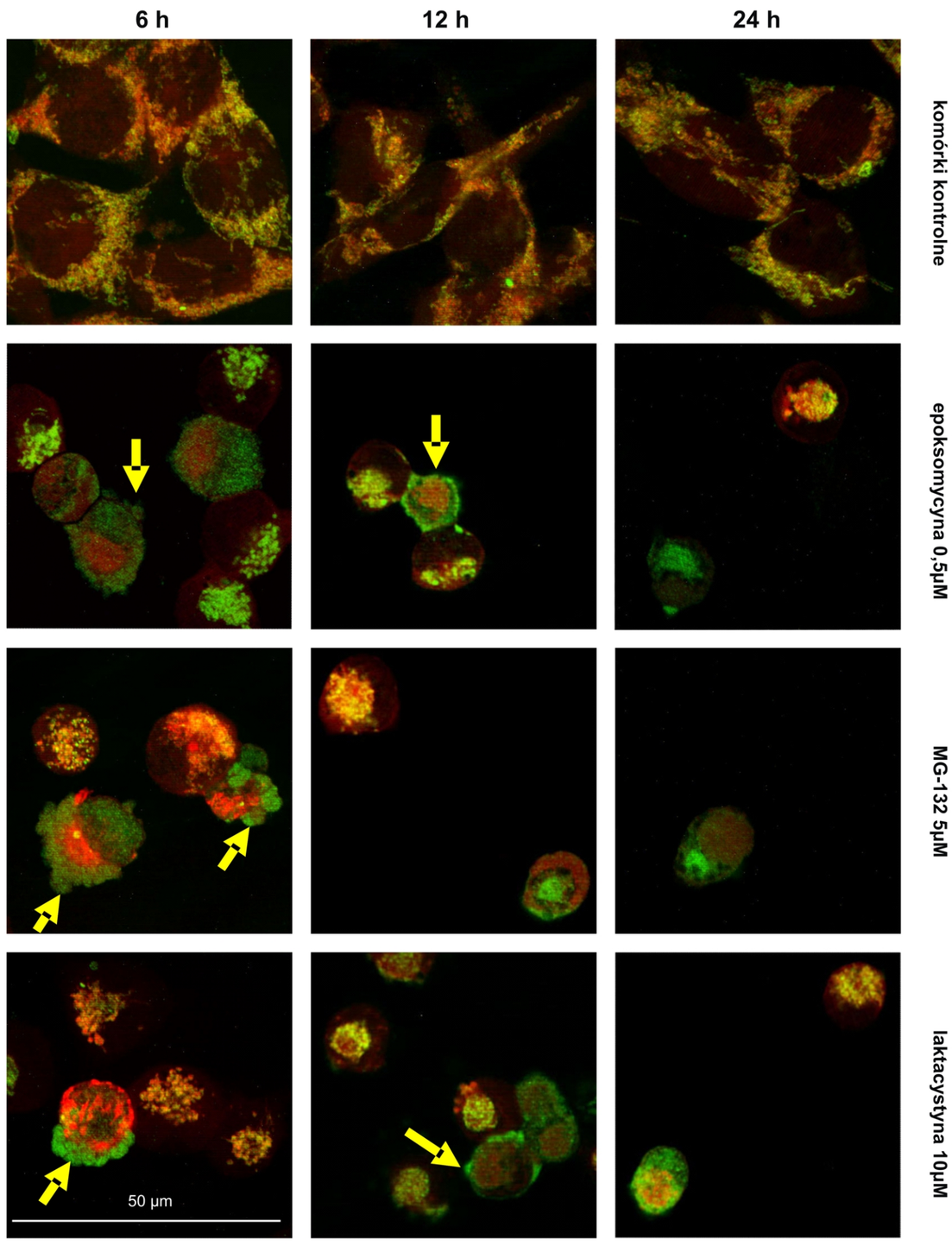
Do badań wykorzystano komórki linii Ab izolowane z guzów nowotworowych pasażowanych na chomikach syryjskich. Po izolacji komórki hodowano w standardowych warunkach (podłoże RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS i antybiotyków, 37°C, 5% CO2) w obecności 0,5μM epoksomycyny, 5μM MG-132 lub 10μM laktacystyny przez 6, 12, lub 24 godziny, a następnie znakowano immunofluorescencyjnie (Tabela 1).

Przeciwciała				
	Przeciwciało pierwotne		Przeciwciało wtórne	
cytC	mysie monoklonalne (BD Pharmingen, USA)	1:400	kozie - AlexaFluor 488 (Invitrogen, USA)	1:400
AIF	królicze monoklonalne, (Abcam, Wielka Brytania)	1:500	kozie - AlexaFluor 488 (Invitrogen, USA)	1:400
Barwniki fluorescencyjne				
mitochondria	MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, USA)			250nM
jądro komórkowe	jodek propidyny (Fluka, USA)			2,5 μg/ml

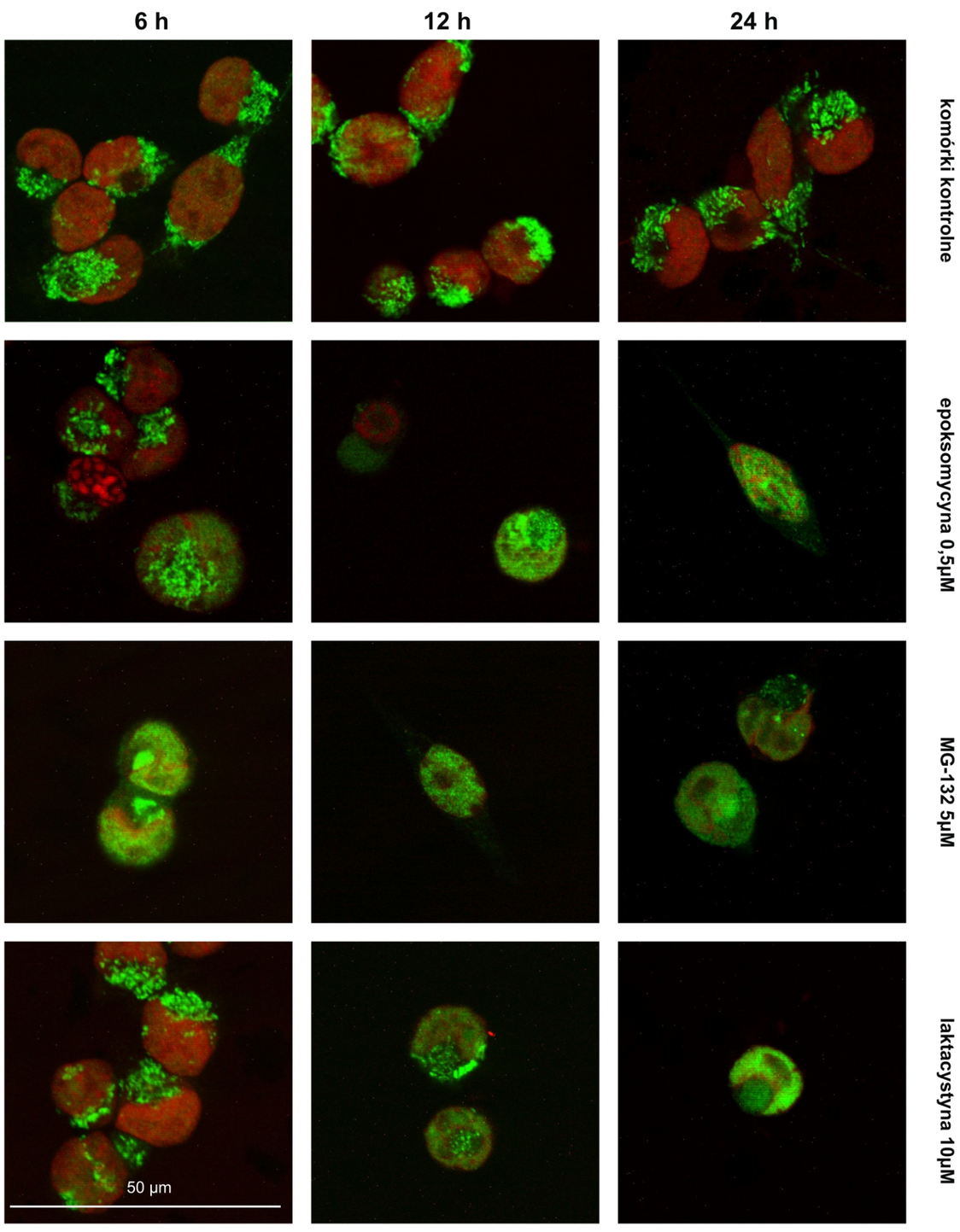
Tabela 1. Przeciwciała i barwniki zastosowane w barwieniach immunofluorescencyjnych.

Aby ocenić charakterystyczny dla szlaku mitochondrialnego apoptozy wypływ cytochromu C (cytC) i białka AIF (*apoptosis inducing factor*) z mitochondriów, wykonano podwójne barwienia: cytochromu C i mitochondriów oraz AIF i jądra komórkowego. Lokalizację białek w komórce analizowano pod mikroskopem Eclipse 600 (Nikon, Japonia) współpracującym z systemem konfokalnym Radiance 2100 (BioRad, Wielka Brytania) i oprogramowaniem LaserSharp 2000 v.4 (BioRad, Wielka Brytania).

W Y N I K I



Uwalnianie cytochromu C z mitochondriów komórek Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 lub 24 godzinach. Aktywne mitochondria uwidoczniono kolorem czerwonym. Kolorem zielonym wybarwiono cytochrom C. Strzałkami zaznaczono pączkowanie błony komórkowej komórek apoptotycznych.



Uwalnianie AIF z mitochondriów w komórkach Ab pod wpływem działania IP po 6, 12 lub 24 godzinach. Kolorem czerwonym wybarwiono jądra komórkowe. Kolorem zielonym wybarwiono AIF.

- **IP powodowały zmiany morfologiczne mitochondriów.**
  Mitochondria w nitkowatych i równomiernie rozproszonych w cytoplazmie stały się pęcherzykowate i utworzyły pojedynczy agregat na obwodzie jądra komórkowego.

- **IP prowadziły do translokacji cytC do cytoplazmy, a AIF do cytoplazmy i jądra komórkowego.**
  Początkowo badane białka zlokalizowane był niemal całkowicie w mitochondriach. Już po 6 godzinach w dużej części komórek doszło do uwolnienia cytC i AIF do cytoplazmy. Dodatkowo w pojedynczych komórkach obserwowano „pączkowanie" błony komórkowej i gromadzenie się cytC w pączkujących fragmentach. Dłuższe działanie IP powodowało we wszystkich obserwowanych komórkach wypływ badanych białek z mitochondriów. Po 24 godzinach obserwowano również akumulację AIF w jądrach komórkowych.

- **Nie obserwowano istotnych różnic z mechanizmie działania badanych IP.**

W N I O S K I

Uwalnianie cytochromu C oraz białka AIF z mitochondriów pod wpływem epoksomycyny, MG-132 i laktacystyny dowodzi, że inhibitory proteasomów wywierają efekt cytotoksyczny na komórki linii Ab czerniaka poprzez indukcję szlaku mitochondrialnego apoptozy.
Śmierć komórki indukowana jest w podobny sposób, pomimo odmiennej struktury chemicznej badanych związków.

Design Sylwia Ścisłowska www.scislowska.pl