

STANOVENIE POLYAMÍNŮV VO VZORKÁCH LOVO BUNKOVÝCH LÍNIÍ

Lenka Andrllová¹, Alberto Macone² a Roman Kand'ár¹

¹*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

²*Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy and Medicine, Sapienza
University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Rome, Italy*

Abstract

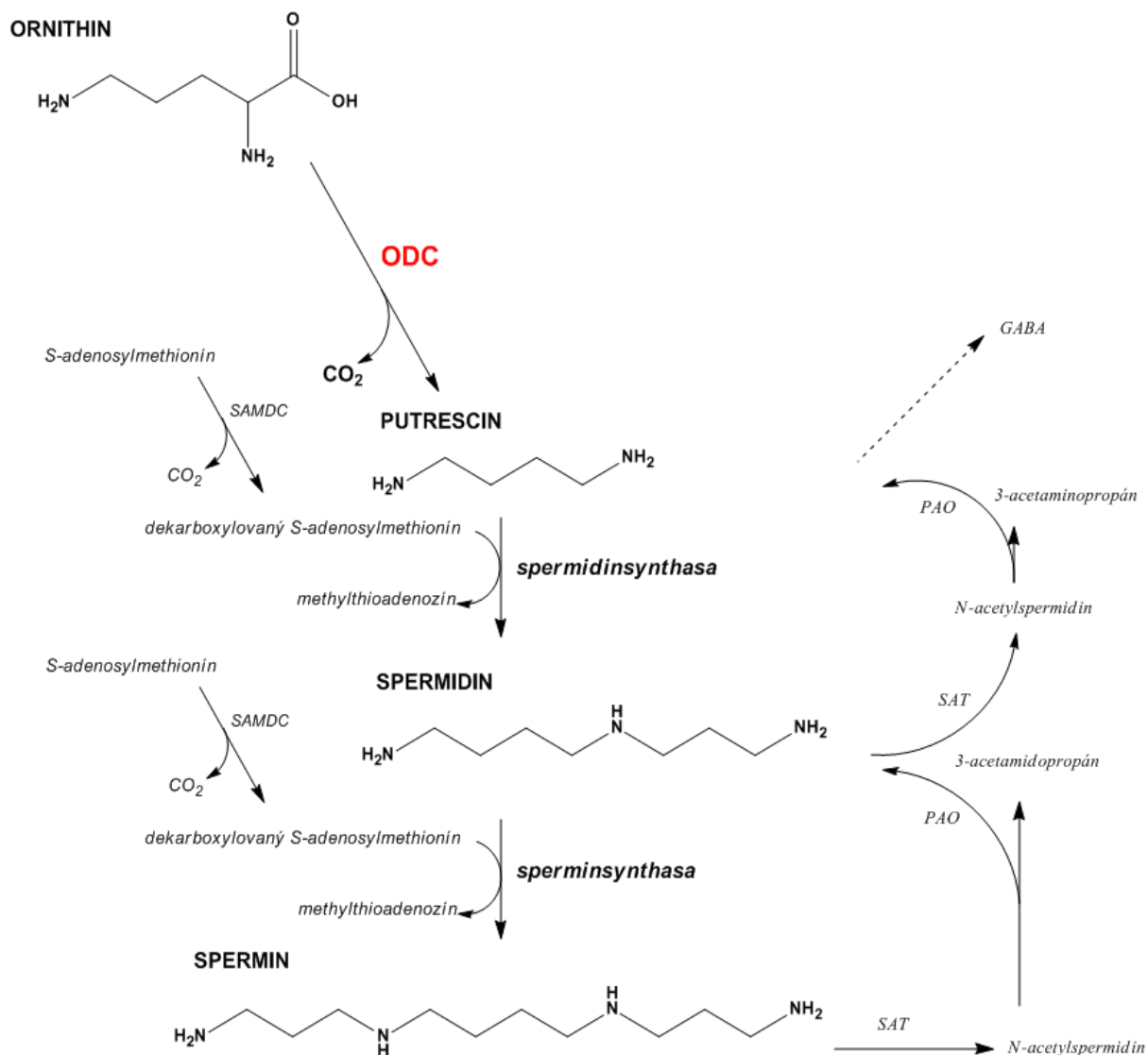
This project deals with the monitoring of levels of polyamines that are considered to play very important role in the cancer growth. The presented work is focused on determination of polyamines in samples of human colorectal adenocarcinoma cells (LoVo cell line) after treatment with ornithine decarboxylase (ODC) inhibitors. Polyamines were extracted from the sample and doubly derivatized using ethyl chloroformate (ECF) and pentafluoropropionic anhydride (PFPA). Derivatives were subsequently separated by gas chromatography (GC) and monitored with mass spectrometry (MS). Data were obtained both in TIC and SIM mode. The results demonstrate the effect of ODC inhibitors on polyamines' synthesis.

Súhrn

Tento projekt je zameraný na sledovanie koncentrácie polyamínov, ktoré by mali zohrávať veľmi dôležitú úlohu v raste nádorov. Prezentovaná práca sa konkrétne zaoberá stanovením polyamínov vo vzorkách buniek ľudského kolorektálneho adenokarcinómu (bunková línia LoVo) po podaní inhibítorov ornitín-dekarboxylázy (ODC). Polyamíny boli zo vzorky extrahované a dvojnásobne derivatizované použitím ethylchloroformátu (ECF) a anhydridu pentafluoropropiónovej kyseliny (PFPA). Deriváty boli následne rozdelené metódou plynovej chromatografie (GC) a detegované hmotnostným spektrometrom (MS). Dáta boli získané ako v móde TIC, tak aj v móde SIM. Výsledky vypovedajú o vplyve inhibítorov ODC na syntézu polyamínov.

1. Úvod

Polyamíny sú malé, pozitívne nabité molekuly, ktoré nachádzame vo všetkých žijúcich bunkách. Esenciálne sú pre eukaryoty, kde plnia niekoľko dôležitých funkcií, napr. ochrana funkcií a štruktúry bunkovej membrány, syntéza proteínov a nukleových kyselín, regulácia expresie génov a pod. U cicavcov sa prirodzene vyskytujú spermín, spermidín a putrescín, ktoré vznikajú radou enzymatických reakcií počnúc dekarboxyláciou ornitínu (viď obr. 1). Pre správne fungovanie celého systému je potrebné udržiavať správnu hladinu polyamínov, čo



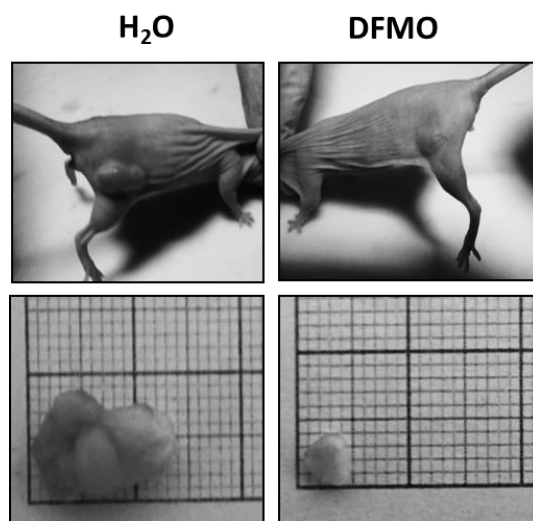
Obrázok 1 Syntéza polyamínov u cicavcov

(ODC – ornithindekarboxylasa, SAMDC – S-adenosylmethionindekarboxylasa, SAT – spermin/spermidin aminotransferasa, PAO – polyamín. oxidáza, GABA – kyselina γ -aminomaslová)

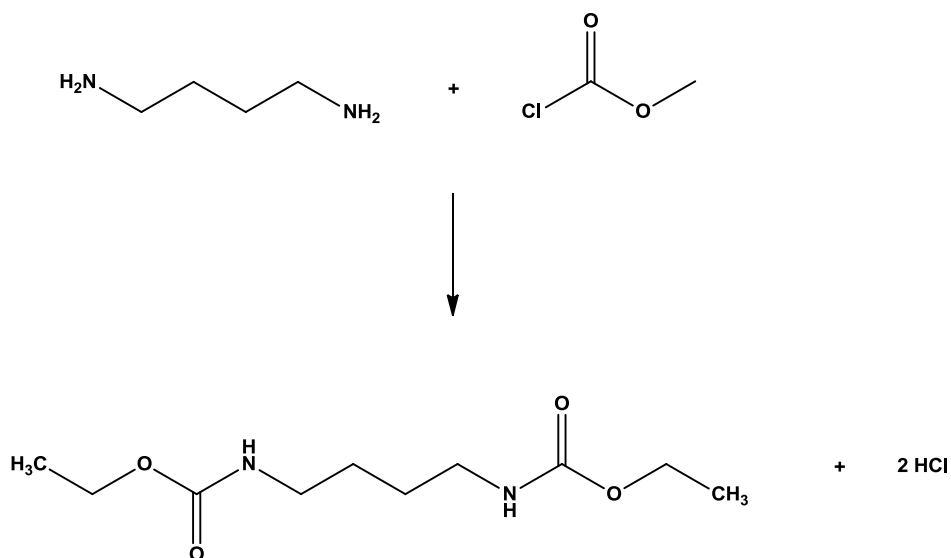
je v tomto prípade zabezpečené negatívnou reguláciou ODC – čím viac polyamínov je nasynetizovaných, tým menej sa tvorí ODC. Zvýšené hladiny polyamínov vedú k toxicite¹.

Meduloblastóm je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich zhubných mozgových nádorov u detí. V 28 % prípadov je nádor spôsobený poruchou intracelulárnej signalizácie cez Sonic Hedgehog proteín (SHH), ktorý je syntetizovaný Purkyňovými bunkami v mozgu. Po naviazaní sa na príslušný receptor (PTCH1) sa spúšťa kaskáda reakcií, ktorá má za následok syntézu ODC, a teda aj syntézu príslušných polyamínov, čo vedie k proliferácii nádorových buniek. Inhibíciou ODC dôjde k zníženiu hladiny polyamínov, a tým aj k zastaveniu rastu nádoru (obr. 2)²⁻⁴.

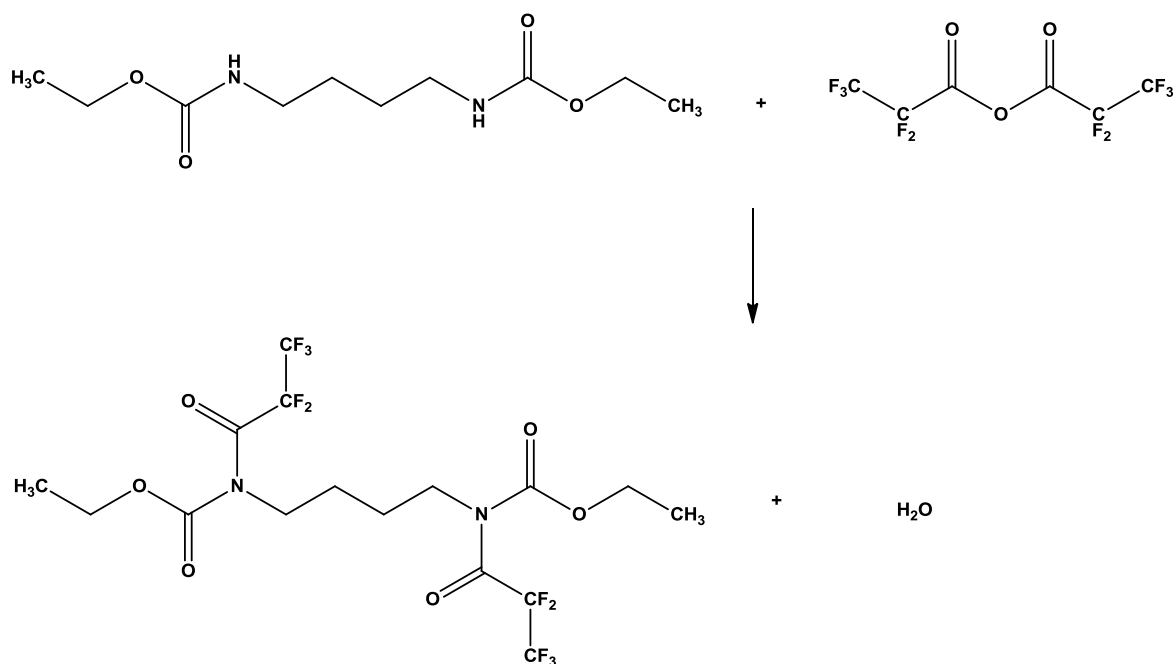
Na inhibíciu ODC boli použité dva rozdielne inhibítory – difluoromethylornithin (DFMO) a anandamín (AEA). Skúmaný bol ich účinok na zastavenie syntézy polyamínov v rozdielnych časových úsekoch, s rozličnou koncentráciou a v rôznych kombináciách vo vzorkách LoVo bunkových línií (bunky ľudského kolorektálneho adenokarcinómu). Polyamíny extrahované zo vzoriek boli dvojnásobne derivatizované použitím ECF a PFPA (obr. 3 a 4) a následne rozdelené a detegované GC-MS.



Obrázok 2 Účinok DFMO (inhibítora ODC) na proliferáciu nádorových buniek



Obrázok 3 Prvý krok derivatizácie polyamínov, reakcia príslušného polyamínu s ECF (na obrázku spermidin)



Obrázok 4 Druhý krok derivatizácie polyamínov, reakcia derivátu príslušného polyamínu (na obrázku spermidín) s PFPA

2. Experimentálna časť

Všetky použité reagenty a rozpúšťadlá boli analytického stupňa čistoty (p.a.).

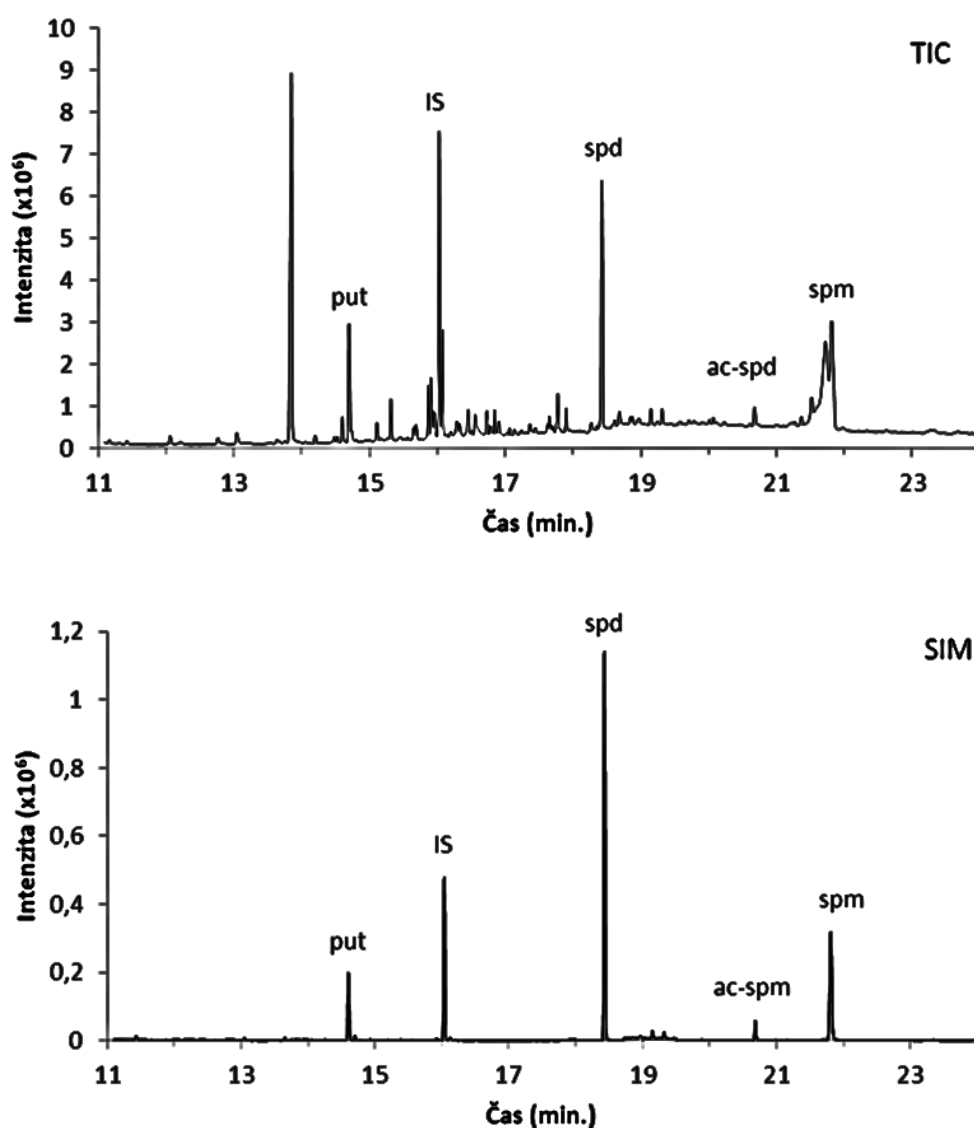
2.1 Príprava vzorky

Keďže výsledky boli vzťahované k počtu živých buniek vo vzorke, spracovaný bol celý objem prinesenej vzorky, bez ohľadu na to, že jednotlivé objemy sa mierne rôznili. K 0,6 ml vzorky ($\pm 0,05$ ml) bolo pridaných 10 μ l interného štandardu (1,6-diaminohexán) o koncentrácii 50 ng/ μ l a pH bolo upravené pridaním 0,5 ml 7mol/l NaOH. V prvom kroku boli vzorky derivatizované pridaním 1 ml zmesi dichlórmetán a ECF v pomere 20:1. Po premiešaní na vortexe (2 min.) bola vzorka saturovaná NaCl. Nasledovala extrakcia najskôr 2 ml ethylacetátu a potom 2 ml diethyléru. Zmiešané extrakty boli odparené pod prúdom N₂. K odparku bolo pridaných 50 μ l PFPA. Druhý krok derivatizácie prebiehal 60 min. pri 70 °C. Vzorka bola následne znova odparená do sucha pod prúdom N₂ a odparok rozpustený v 50 μ l dichlórmetánu.

2.2 GC-MS analýza

Vzniknuté deriváty boli analyzované na plynovom chromatografe Agilent 6850A spojeným s 5973N kvadrupólovým hmotnostným detektorom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Chromatografická separácia prebiehala na kolóne HP-5ms (5% phenyl –

95% dimethylpolysiloxane), 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Dávkovaný bol 1 μl vzorky (splitless mód) pri teplote nástreku 280 °C. Teplotný program: 70 °C po dobu 2 min., následne nárast na 180 °C rýchlosťou 10 °C/min. a opäť nárast na 300 °C rýchlosťou 20 °C/min. Na záver udržiavanie teploty 300 °C po dobu 5 min. Nosným plynom bolo hélium s prietokom 1 ml/min. Spektrá boli získané elektrónovou ionizáciou s použitím energie 70 eV, teplota iónového zdroja 280 °C, vákuum 10⁻⁵ Torr. Dáta boli zbierané od 11. minúty analýzy, a to ako v móde TIC (rozsah m/z 50-800), tak aj v móde SIM (obr. 5). Pre analýzu jednotlivých zložiek v SIM móde boli vybrané hodnoty: putrescín *m/z* 405, spermidín *m/z* 580, spermin *m/z* 709, N-acetylspermin *m/z* 637.



Obrázok 5 Chromatografický záznam polyamínov vo vzorke LoVo WT v móde TIC a SIM (put – putrescín, IS – interný štandard, spd – spermidín, ac-spm – acetylspermin, spm – spermin) GC-MS podmienky (viď kapitola 2.2)

3. Výsledky a diskusia

Táto práca sledovala zmeny v hladinách vybraných polyamínov vo vzorkách LoVo bunkových línií po ošetrení vzoriek inhibítormi ODC – DFMO a AEA. Ako dokázali predchádzajúce štúdie, koncentrácia polyamínov je úzko spätá s rakovinovým bujnením a inhibícia ODC – enzýmu potrebného práve k syntéze polyamínov – vedie k zastaveniu rastu nádoru⁴. Testované boli dve línie buniek ľudského kolorektálneho adenokarcinómu – LoVo WT a LoVo Dx. Zatiaľ čo prvá z nich predstavuje klasické wild type nádorové bunky, druhá línia vykazuje vyššiu odolnosť nielen k doxorubicínu, ale aj k ďalším látkam⁵ a mala by tak simulovať reálnu situáciu vzniku rezistencie u buniek po podaní inhibítora ODC.

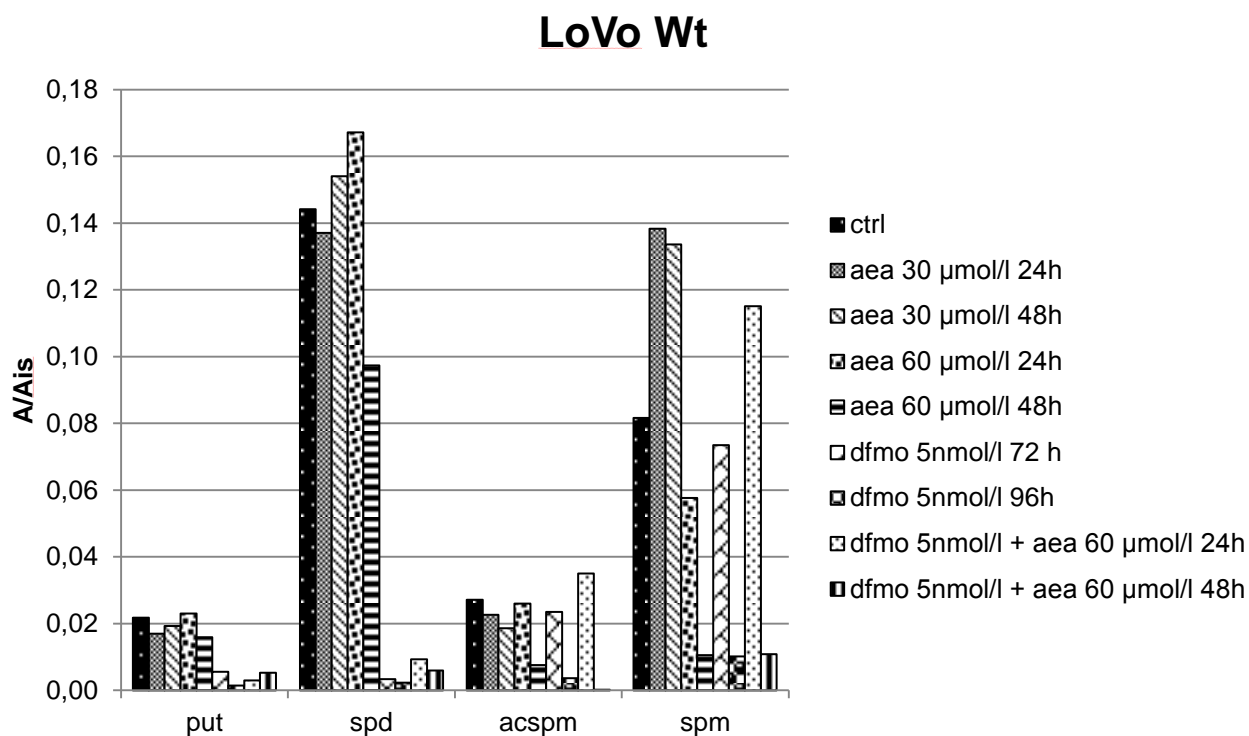
Získané výsledky sa vzťahujú na množstvo živých buniek prítomných v testovanej vzorke. Bunky boli sčítané pod fluorescenčným mikroskopom po podaní látky, ktorá vykazuje fluorescenčné vlastnosti až po naštiepení vnútrobunkovými esterázami. Tie u mŕtvych buniek chýbajú⁶.

Pri testovaní wild type línie sa zistilo, že 30 μM AEA nemá na ODC dostatočný inhibičný účinok ani po 48 hod. pôsobenia, a preto bol z ďalších testov vyradený. Účinnosť použitých inhibítorov na LoVo WT bunkovú líniu možno sledovať na obr. 6. Najlepší účinok má 5nmol/l DFMO po 96 hodinách, podobné výsledky však dosahuje aj kombinácia 5nmol/l DFMO s 60 $\mu\text{mol/l}$ AEA po 48 hodinách. Obr. 7 potvrdzuje vyššiu odolnosť LoVo Dx línie na podanie inhibítorov v porovnaní s wild type líniou. Ani jeden z použitých inhibítorov, či ich kombinácia, však v tomto prípade nedokázala znížiť koncentráciu dvojice polyamínov acetylspermín a spermín.

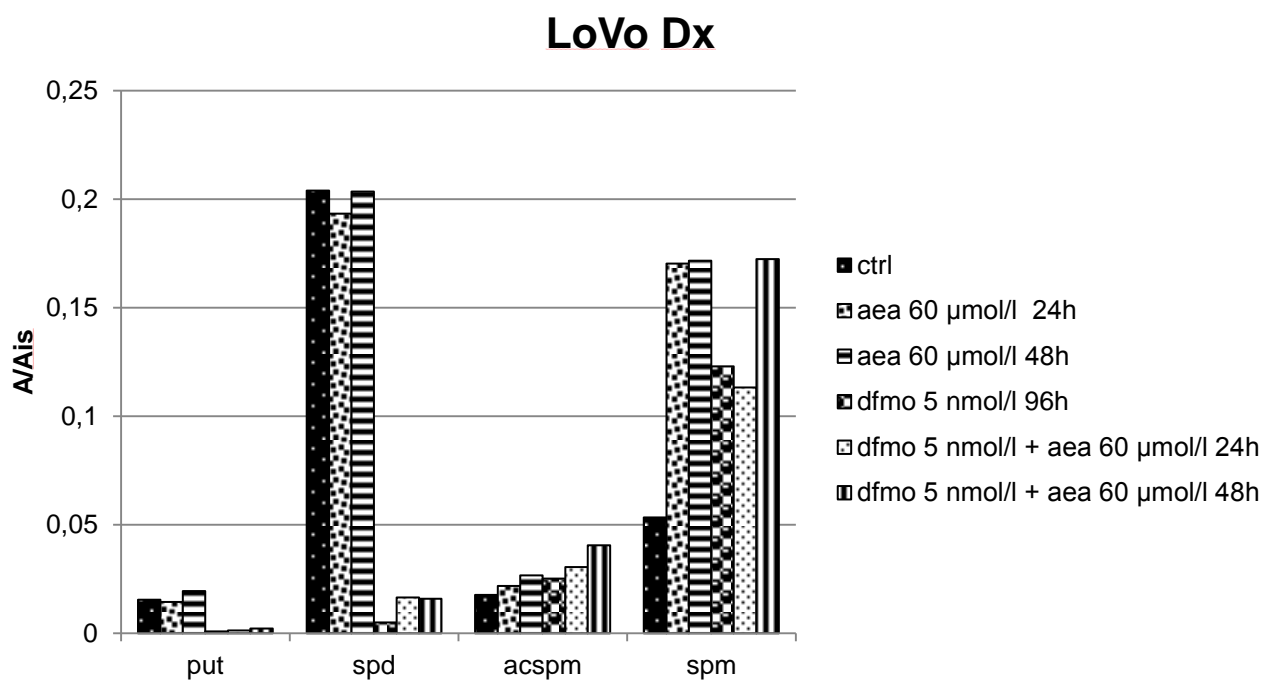
Pri oboch testovaných líniách je zaujímavosťou odozva koncentrácie polyamínov po podaní niektorých inhibítorov, ktorá sa prejaví len poklesom koncentrácie putrescínu a spermidínu. Hladiny acetylspermínu a spermínu ostávajú nezmenené, resp. sa v grafe javia ako zvýšené. Pre hlbšie pochopenie dejov vedúcich k týmto výsledkom je potrebný ďalší výskum. Získané výsledky sú dôležitou súčasťou projektu a na ich základe budú plánované ďalšie pokusy s cieľom nájsť čo najvhodnejší inhibítor ODC, ktorý by v čo najkratšom čase a s čo najmenším zaťažením organizmu viedol k inhibícii syntézy polyamínov, a tým k spomaleniu či zastaveniu proliferácie nádorových buniek.

4. Záver

Na základe výsledkov predchádzajúceho výskumu, ktoré svedčia o úzkej spojitosti medzi syntézou polyamínov a rastom nádoru, bola testovaná účinnosť inhibítorov ODC na syntézu polyamínov vo vzorkách LoVo bunkových línií. Polyamíny boli po extrakcii zo vzorky dvojnásobne derivatizované, rozdelené metódou plynovej chromatografie



Obrázok 6 Účinnok inhibítorov ODC na syntézu polyamínov vo vzorkách LoVo Wt (ctrl – kontrolná vzorka)



Obrázok 7 Účinnok inhibítorov ODC na syntézu polyamínov vo vzorkách LoVo Dx (ctrl – kontrolná vzorka)

a detegované kvadrupólovým hmotnostným spektrometrom. Získané výsledky budú použité pri plánovaní ďalších pokusov.

Pod'akovanie

Moja spoluúčasť na tomto projekte a táto práca boli podporené programom Erasmus+ a grantom SGSFCHT_2016004.

Literatura

1. Pegg A.E.: Chem. Res. Toxicol. **26** (2013) 1782-1800.
2. de Bont J.M., Packer J.M., Michiels E.M., den Boer M.L., Pietersde R.: Neuro-Oncology **10** (2008) 1040-1060.
3. Kool M., Korshunov A., Remke M., Jones D.T.W., Schlanstein M., Northcott P.A., Cho Y.-J., Koster J., Schouten-van Meeteren A., van Vuurden D., Clifford S.C., Pietsch T., von Bueren A.O., Rutkowski S., McCabe M., Collins V.P., Bäcklund M.L., Haberler Ch., Bourdeaut F., Delattre O., Doz F., Ellison D.W., Gilbertson R.J., Pomeroy S.L., Taylor M.D., Lichter P., Pfister S.M.: Acta Neuropathol. **123** (2012) 473-484.
4. D'Amico D., Antonucci L., Di Magno L., Coni S., Sdruscia G., Macone A., Miele E., Infante P., Di Marcotullio L., De Smaele E., Ferretti E., Ciapponi L., Giangaspero F., Yates J.R., Agostinelli E., Cardinali B., Screpanti I., Gulino A., Canettieri G.: Dev. Cell. **35** (2015) 21-35.
5. Brogini M., Grandi M., Ubezio P., Geroni Ch., Giuliani F.C., D'Incalci M.: Biochem. Pharmacol. **37** (1988) 4423-4431.
6. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C3099?ICID=search-product>
[11-04- 2016]