

HABILITAČNÁ PRÁCA

2019

Ing. Helena Gbelcová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

ALTERNATÍVNE MOŽNOSTI VYUŽITIA STATÍNOV V MEDICÍNE

Ing. Helena Gbelcová, Ph.D.

Univerzita Komenského v Bratislave

Lekárska fakulta

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky

Habilitačná práca

Obor: Molekulární a buněčná biologie

Bratislava 2019

Prehlasujem, že habilitačnú prácu na tému Alternatívne možnosti využitia statínov v medicíne som vypracovala samostatne s využitím informačných zdrojov, ktoré som citovala.

V Bratislave, 2019

Ing. Helena Gbelcová, Ph.D.

ĎAKUJEM

Tomáš Ruml

Olga Valentová

Libor Vitek

Jan Lipov

Daniel Böhmer

Vanda Repiská

Petra Prišćáková

Vladimír Skalský

OBSAH

Predhovor	5
1. Statíny v úlohe hypolipidemík	8
1.1 Klasifikácia statínov	8
1.2. Inhibícia HMG-CoA reductázy	11
1.3 Statíny v hypolipidemickej liečbe	13
1.4 Statíny a cytosólické lipidové kvapôčky	13
1.4.1 Statíny a vnútrobunkové množstvo lipidových kvapôčok	14
1.4.2 Statíny a expresia génov dôležitých pre funkciu lipidových kvapôčok	14
2 Statíny a nádorové ochorenia	17
2.1 Vplyv statínov na proliferáciu a apoptózu	18
2.2 Statíny a adhezivita, invazivita a angiogenéza	19
2.3 Nádory pankreasu a prenylácia proteínov Ras	19
2.3.1 Štruktúra a posttranslačná modifikácia Ras	21
2.3.2 Regulácia aktivity proteínov Ras	23
2.4 Mechanizmus protinádorového účinku statínov	24
2.4.1 Antiproliferačný vplyv statínov na nádorové bunky <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	24
2.4.2 Vplyv statínov na génovú expresiu	25
2.4.3 Remodelácia bunkového cyklu a aktínového cytoskeletu statínmi	26
2.4.4 Vplyv statínov na vnútrobunkový transport proteínu K-Ras	27
2.4.5 Vplyv medziproduktov mevalonátovej dráhy na účinok statínov	32
3 Statíny a regeneračná medicína	38
3.1 Vplyv statínov na samoobnovovanie a diferenciáciu kmeňových buniek	38
3.2 Vplyv statínov na mobilizáciu kmeňových buniek	40
3.3 Využitie statínov v regeneračnej medicíne	40
3.3.1 Statíny a pacienti po akútnom infarkte myokardu	40
3.3.2 Vplyv statínov na osteogenézu a odontogenézu	41
3.4 Vplyv statínov na kmeňové bunky	43
3.4.1 Vplyv statínov na rast kmeňových buniek tukového tkaniva	43
3.4.2 Statíny a génová expresia kmeňových buniek tukového tkaniva	45
Zoznam použitých skratiek	48
Použitá literatúra	49
Prílohy	57

PREDHOVOR

Statíny sú v súčasnosti celosvetovo najpoužívanjšou skupinou látok v liečbe hypercholesterolémie pacientov trpiacich kardiovaskulárnymi poruchami, alebo pacientov so zvýšeným rizikom rozvoja kardiovaskulárných porúch. Hladinu cholesterolu znižujú kompetitívnou inhibíciou hydroxymetylglutaryl koenzým A reductázy, čo je enzým katalyzujúci rýchlosť limitujúci krok mevalonátovej dráhy, ktorej jedným z mnohých produktov je práve cholesterol.

Problematike statínov som sa začala venovať v roku 2005 počas môjho doktorandského štúdia na Vysokej škole chemicko-technologickej v Prahe pod vedením profesora Tomáša Rumla. Myšlienku štúdia statínov priniesol na pôdu Vysokej školy chemicko-technologickej v Prahe v rámci spolupráce pracovník profesor Libor Vítek. Zaujal ho poznatok, že dlhodobé užívanie statínov v úlohe hypolipidémik u veľkej skupiny amerických veteránov vyústilo v štatisticky významné zníženie výskytu onkologických ochorení. Vznikla hypotéza, že statíny majú kanceroprotektívny účinok. Okamžité zavedenie preventívneho užívania statínov by však bolo nereálne. Na jednej strane je nejednoznačný mechanizmus kanceroprotektívneho účinku statínov, na strane druhej celá škála dobre známych nežiaducich vedľajších účinkov statínov vyplývajúcich z ich pleiotropného pôsobenia. Z mnohých vedľajších účinkov uvediem len, že inhibíciou mevalonátovej dráhy statínmi dochádza súčasne k deplícii izoprénových jednotiek, a tým aj farnezylpyrofosfátu a geranylgeranylpyrofosfátu, ktoré sú potrebné pre správnu posttranslačnú modifikáciu celého radu proteínov. V rámci môjho doktorandského štúdia som sa venovala štúdiu protinádorových účinkov statínov, konkrétne statínmi sprostredkovanej inhibícii farnezylácie proteínov Ras, ktorých tzv. aktivačná mutácia sa s rôzne vysokou frekvenciou objavuje v jednotlivých typoch nádorov. V prípade nádorov pankreasu je uvedená mutácia prítomná až v 90 %, čo ma od obyčajného sledovania antiproliferačných účinkov statínov nasmerovalo k príprave konštruktov obsahujúcich gény kódujúce Ras proteíny, a to i s obsahom už spomenutej aktivačnej mutácie. Zaujímavé bolo porovnanie vplyvu jednotlivých statínov na lokalizáciu tranzientne exprimovaného fluorescenčne značeného proteínu K-Ras v bunkách, ako aj poznatok, že pridanie farnezylpyrofosfátu k bunkám spolu so statínmi efekt statínu eliminuje. Výsledky sme úspešne publikovali a naša štúdia bola v tom čase unikátna tým, že ako jediná porovnávala antiproliferačné účinky, ako aj účinky na vnútrobunkovú lokalizáciu K-Ras proteínu u všetkých statínov na rovnakom experimentálnom modeli v rovnakých koncentráciách a časoch pôsobenia. Napriek tomu, keď som sa po 3,5 rokoch

intenzívneho porovnávania rozdielov v účinkoch rôznych statínov v rôznych koncentráciách a časoch na modeloch rôznych typov nádorových buniek pankreasu v *in vitro* podmienkach, rozhodla výsledky svojich pozorovaní spísať do dizertačnej práce, prepadli ma pochybnosti a nadobudla som presvedčenie, že získaných výsledkov nie je dost'. Presne z týchto dôvodov, rozšírených o osobnú potrebu pekných farebných obrázkov do dizertačnej práce, vznikol experiment dokazujúci zmenu množstva lipidových kvapôčok v bunkách po účinku statínov. Lenže zmenu sa podarilo dokázať opačným smerom, ako som očakávala. Množstvo lipidových častíc v bunkách vystavených statínom neklesalo, ale stúpalo. Začalo pátranie po zdroji lipidových častíc v bunkách kultivovaných v prítomnosti simvastatínu. Príčina zostala neodhalená. Okrem nedoriešenej otázky týkajúcej sa vzniku lipidových častíc iniciovaného simvastatínom prišla v roku 2009 počas obhajoby mojej dizertačnej práce od jedného z oponentov ďalšia zaujímavá otázka, a síce ak súčasné pridanie farnezylypyrofosfátu a statínu eliminuje účinok statínu na vnútrobunkovú lokalizáciu proteínu K-Ras, eliminuje aj všetky, alebo aspoň väčšinu zmien spôsobených statínmi?

Vďaka uvedeným nedoriešeným otázkam som v roku 2011 po nástupe na Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave uspela najskôr so žiadosťou o grant Univerzity Komenského zameraný na štúdium molekulárnych mechanizmov účinku simvastatínu v *in vitro* podmienkach so zameraním na zmeny v množstve lipidových kvapôčok a o rok neskôr o grant Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV so zameraním na vplyv statínov a medziproduktov mevalonátovej dráhy na vnútrobunkový transport proteínov Ras v adenokarcinóme pankreasu. A konečne v roku 2015 v spolupráci s Jesseniovou lekárskou fakultou Univerzity Komenského v Martine sa nám podarilo získať APVV grant zameraný na porovnanie účinkov statínov na nenádorové, resp. kmeňové bunky a bunky nádorové s vidinou možnosti aplikácie statínov nielen v terapii nádorov, ale aj v regeneračnej medicíne. Inšpiráciou pre štúdium vlastností statínov s možnosťou ich alternatívneho využitia práve v regeneračnej medicíne boli nielen objavujúce sa metaanalýzy poukazujúce na pozitívny vplyv statínov na osteogénu a odontogénu u pacientov dlhodobo liečených statínmi, ale aj skutočnosť, že veľká časť vedeckej kapacity Ústavu lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK v Bratislave je venovaná práve regeneračnej medicíne. A tak vznikli veľké celogenómové štúdie odhaľujúce zmeny expresie génov v bunkách nádorových aj kmeňových po účinku všetkých komerčne dostupných statínov, ako aj po súčasnom účinku statínov a medziproduktov mevalonátovej dráhy. A hoci je to finančne náročné, vo väčšine projektov a experimentov sme sa snažili, a naďalej snažíme zachovať unikátnosť našich výsledkov tým,

že na ich základe je možné porovnávať sledované deje medzi všetkými komerčne dostupnými statínmi navzájom.

Predkladaná habilitačná práca je koncipovaná ako stručný prehľad výsledkov našich experimentov naznačujúcich možnosti alternatívneho využitia statínov v lekárskej praxi. Práca je rozdelená do troch častí, v ktorých sa postupne venujem statínom v úlohe hypolipidemík, v úlohe kanceroprotektívnych látok a nakoniec možnému využitiu statínov v regeneračnej medicíne. V prílohe sú zahrnuté moje prvoautorské a poslednoautorské publikačné výstupy pojednávajúce o problematike statínov, ktoré boli uverejnené v zahraničných alebo domácich periodikách a zborníkoch.

Okrem témy statínov sa od čias druhého stupňa vysokoškolského štúdia až do dnes venujem testovaniu účinku rôznych prírodných a syntetických látok a materiálov na prežívanie buniek kultivovaných v podmienkach *in vitro*. S príchodom na Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave som sa v roku 2010 začala zaoberať aj témou molekulovo-genetickej analýzy polymorfizmov spojených s karcinómom endometria a štúdiom etiológie preeklampsie. V uvedených oblastiach mám spolu 27 prác registrovaných v databázach wos alebo scopus.

1. STATÍNY V ÚLOHE HYPOLIPIDEMÍK

Inhibítory 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzýmu A (HMG-CoA) reductázy, bežne označované ako statíny, predstavujú v súčasnosti dominantnú skupinu zlúčenín na liečbu hypercholesterolémie vďaka ich schopnosti inhibovať *de novo* syntézu cholesterolu. Tento účinok statínov bol objavený v roku 1976 a od roku 1980 sa statíny používajú v klinickej praxi (Endo, A. a spol., 1976a). Osem v súčasnosti existujúcich statínov je komerčne dostupných pod nasledujúcimi názvami:

Lovastatín – e.g. *Mevacor, Altacor*

Pravastatín – e.g. *Lipostat, Pravachol, Selektine*

Simvastatín – e.g. *Zocor, Lipex*

Fluvastatín – e.g. *Lescol, Lescol XL*

Atorvastatín – e.g. *Sortis, Lipitor, Torvast*

Rosuvastatín – e.g. *Crestor*

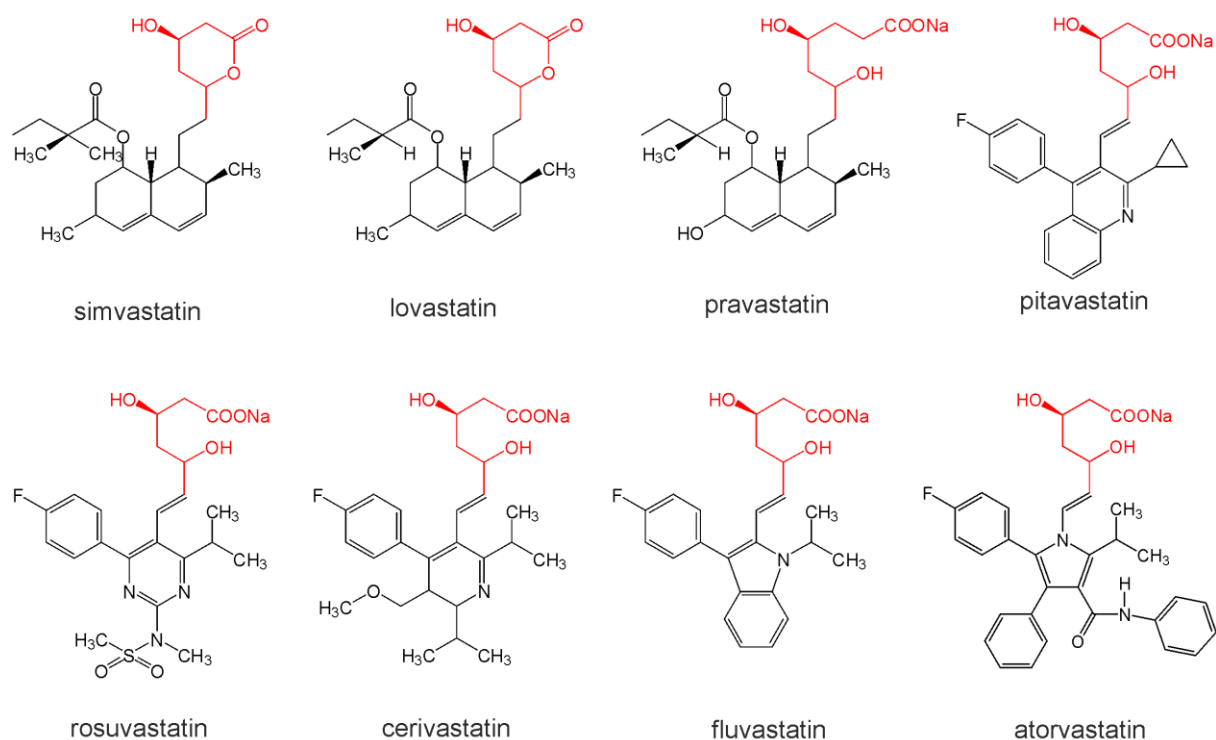
Pitavastatín – e.g. *Livalo, Pitava*

Cerivastatín – e.g. *Baycol, Lipobay*

1.1 KLASIFIKÁCIA STATÍNOV

Existuje niekoľko kritérií na klasifikáciu statínov, vrátane ich štruktúry, fyzikálno-chemických vlastností, zdroja či spôsobu metabolizovania v ľudskom organizme.

Zo štruktúrneho hľadiska pozostávajú statíny z dvoch základných častí. Prvou je farmakofór (červená časť, obrázok 1), ktorý je zodpovedný za biologickú aktivitu statínov, za kompetitívnu inhibíciu HMG-CoA reductázy. Druhú časť molekuly statínov predstavuje systém kruhov s rôznymi substituentami (obrázok 1), na základe ktorých sa statíny rozdeľujú do dvoch tried. Zatiaľ čo inhibítory typu 1 (simvastatín, lovastatín, pravastatín) obsahujú dekahydronaftalénový kruh, inhibítory typu 2 (rosuvastatín, atorvastatín, cerivastatín, fluvastatín, pitavastatín) obsahujú fluórfenylovú skupinu, ktorá v inhibítorech typu 1 prítomná nie je. Inhibítory typu 2 sa líšia vzhľadom na štruktúru centrálného krúžku; centrálna kruhová štruktúra v inhibítore typu 2 rosuvastatínu je pyrimidinylová skupina (Istvan, E., 2003, Istvan, E.S. a Deisenhofer, J., 2001).

**Obrázok 1** Chemická štruktúra statínov

Fyzikálno – chemické vlastnosti statínov vyplývajú z ich štruktúry (obrázok 1). Atorvastatín, cerivastatín, fluvastatín, pravastatín, pitavastatín a rosuvastatín sa podávajú v aktívnej kyslej forme. Lovastatín a simvastatín sa podávajú v inaktívnej laktónovej forme a do aktívnych foriem sú prevedené enzymatickou hydrolyzou (Blumenthal, R.S., 2000, Kajinami, K. a spol., 2000, McTaggart, F. a spol., 2001). Bočné skupiny na kruhoch definujú rozpustnosť, farmakologické a farmakokinetické vlastnosti statínov a zodpovedajú za účinky statínov, ktoré nesúvisia s ich schopnosťou inhibovať HMG-CoA reductázu. Ide o tzv. pleiotropné účinky statínov, ku ktorým patrí úprava endotelovej dysfunkcie, redukcia oxidačného stresu, protrombolytický účinok, vplyv na funkciu trombocytov, makrofágov a monocytov, protizápalový účinok, stabilizácia aterosklerotického plátu (Sorrentino, S. a Landmesser, U., 2005), ovplyvňovanie mechanizmov bunkového cyklu, diferenciácie, apoptózy, a tým aj procesu onkogenézy (Svoboda, M., a spol., 2005) a iné. Atorvastatín, pitavastatín, fluvastatín, lovastatín a simvastatín sú relatívne lipofilné zlúčeniny, zatiaľ čo pravastatín a rosuvastatín sú viac hydrofilné (McTavish, D. a Sorkin, E.M., 1991, McTaggart, F. a spol., 2001). Rozdiely v lipofilicite sa odrážajú v potenciáli statínov prechádzať cez bunkové membrány neselektívne pasívnou difúziou (Serajuddin, A.T. a spol., 1991). Napríklad polárna hydroxylová skupina pravastatínu prispieva k jeho väčšej hydrofilnosti, a preto pravastatín vyžaduje na vstup do buniek aktívny transportný systém (Bellosta, S.

a spol., 2004). Atorvastatín pozostáva z pyrolového kruhu kovalentne spojeného s viacerými aromatickými štruktúrami, ktoré prispievajú k jeho vysokej lipofilnosti a uľahčujú hydrofóbne interakcie s fosfolipidovými acylovými reťazcami rôznych cieľových bunkových membrán. Fluvastatín je charakterizovaný ako vysoko permeabilný liek napriek relatívne vysokému počtu vodíkových väzieb, ktoré sa v jeho molekule nachádzajú. Vďaka amfifilnému charakteru môže fluvastatín vytvárať intramolekulárne vodíkové väzby, čím zvyšuje svoju lipofilitu a permeabilitu plazmatickej membrány (Lindahl, A. a spol., 1996). Fluvastatín, podobne ako pravastatín, nedokáže prejsť hematoencefalickú bariéru na rozdiel od lipofilných laktónových molekúl lovastatínu a simvastatínu (Guillot, F. a spol., 1993).

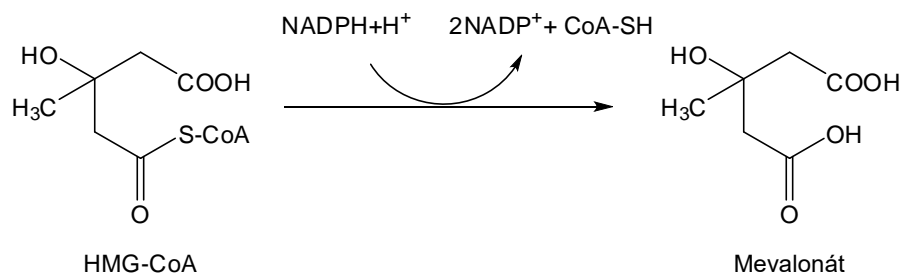
Zdroj statínov predstavuje ďalšie klasifikačné hľadisko. Mevastatín (kompaktín), priamy predchodca statínov, bol izolovaný z vláknitej huby *Penicillium brevicompactum*. Táto zlúčenina inhibovala syntézu cholesterolu z acetátu, acetyl-CoA a HMG-CoA, ale neovplyvnila premenu mevalonátu na steroly (Brown, A.G. a spol., 1976). Pravastatín je cyklický hydroxylovaný metabolit mevastatínu, pôvodne izolovaný z moču psov ošetrovaných mevastatínom. Dnes sa pravastatín vyrába mikrobiálnou hydroxyláciou mevastatínu (Arai, M. a spol., 1988). Niektoré statíny sa vyrábajú chemickou úpravou fermentačných produktov, napr. simvastatín je syntetizovaný z lovastatínu nahradením 2-metylbutanoylového bočného reťazca 2, 2-dimetylbutanoylovou skupinou (Hoffmann, W.F. a spol., 1986). Na fermentačnú produkciu statínov sa používajú mikroorganizmy rodov *Aspergillus*, *Monascus*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Mucor* alebo *Penicillium*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*. Ďalšie statíny sú produktmi celkovej chemickej syntézy (Kajinami, K. a spol., 2000, McTaggart, F. a spol., 2001, Moghadasian, M.H., 1999). Prvým plne syntetickým inhibítorom HMG-CoA reduktázy bol fluvastatín (Kathawala, F.G., 1991).

Metabolizmus všetkých statínov prebieha v pečeni. Lovastatín, simvastatín a atorvastatín sú katabolizované cytochrómami P450 (CYP), 3A4 a 2C8, fluvastatín prostredníctvom cytochrómov CYP 2C9 a CYP 2D6, cerivastatín využíva CYP 3A4 a 2C8, rosuvastatínu CYP 2C9 a 2C19, pitavastatínu CYP 2C9 a 2C18 (Farmer, J.A. a Torre-Amione, G., 2000, Hanefeld, M. a spol. 1999, Kajinami, K. a spol., 2000). Zo všetkých statínov pravastatín vykazuje najvyššiu mieru odbúrania obličkami (Singhvi, S.M. a spol., 1990). Pravastatín je tiež jediným inhibítorom HMG-CoA reduktázy, ktorý je eliminovaný prevažne v nezmenenej forme. Všetky ostatné statíny sú eliminované väčšinou v podobe ich metabolitov a s výnimkou fluvastatínu poskytujú aktívne metabolity, ktoré tiež významne prispievajú k hypolipidemickému efektu statínov (Everett, D.W. a spol., 1991).

Ak sa súčasne so statínmi metabolizujú aj iné zlúčeniny, ktoré sú podrobené degradácii prostredníctvom CYP, môže dôjsť k narušeniu eliminácie statínov, čo vedie k nebezpečne vysokým hladinám statínov a zvýšenému riziku vážnych vedľajších účinkov. Bežne používané látky, ktoré sú metabolizované prostredníctvom CYP 3A4, zahŕňajú cyklosporín A, makrolidové antibiotiká, azolové antifungálne látky a grapefruitovú šťavu. Tieto môžu interferovať s elimináciou atorvastatínu, cerivastatínu, lovastatínu a simvastatínu. K liečivám metabolizovaným prostredníctvom CYP 2C9 patria diazepam, fenytoín, warfarín, amitriptylín, ibuprofén a omeprazol. Niektoré iné lieky, ako napríklad rifampin, zvyšujú elimináciu statínov tým, že indukujú pečeňové enzýmy. Rovnako aj porucha obličiek alebo pečene môže s elimináciou statínov interferovať. U pacientov s ochorením pečene sa môže hromadiť atorvastatín, pravastatín, fluvastatín a simvastatín. Ochorenie obličiek môže predĺžiť elimináciu cerivastatínu, lovastatínu a simvastatínu (Piepho, R.W., 2000).

1.2. INHIBÍCIA HMG-COA REDUKTÁZY

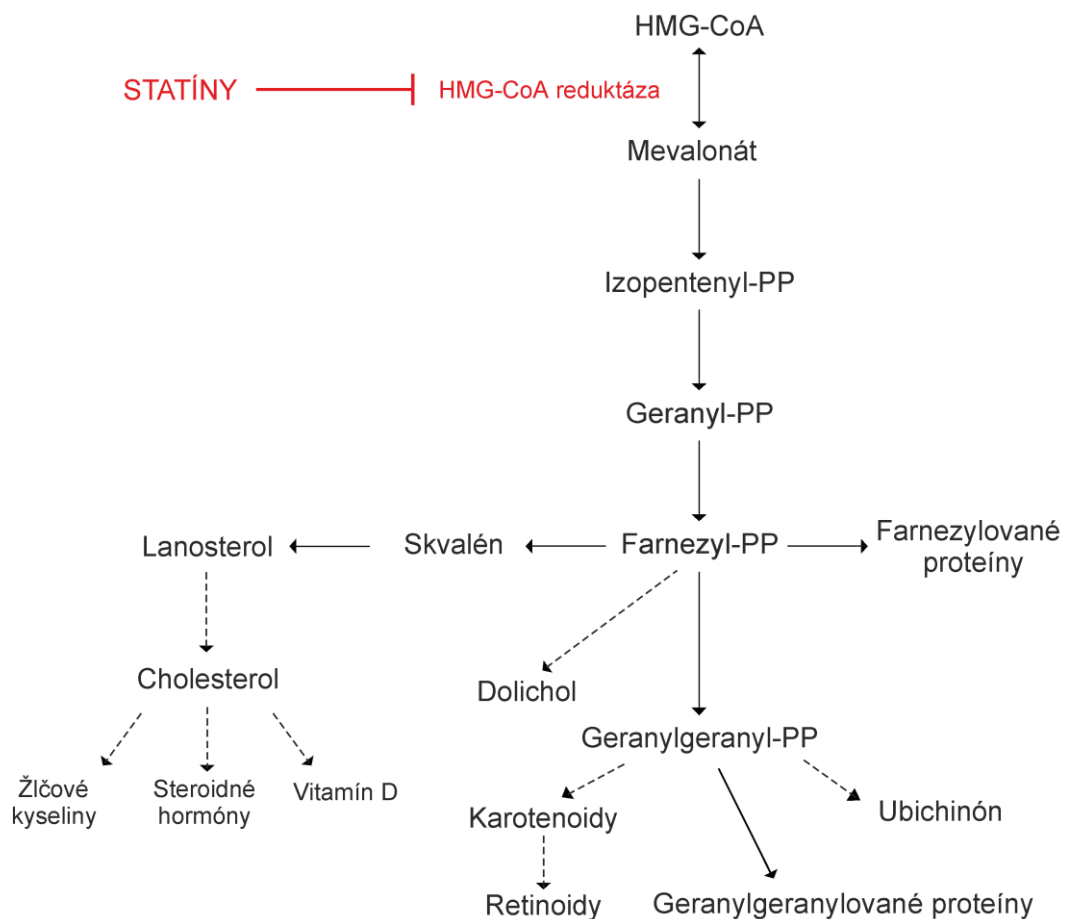
Statíny špecificky inhibujú rýchlosť limitujúci krok mevalonátovej dráhy, deacyláciu HMG-CoA na CoA a mevalonát katalyzovanú HMG-CoA reductázou v reakcii, ktorá prebieha nasledujúcim spôsobom:



Všetky statíny sú kompetitívnymi inhibítormi HMG-CoA reductázy vzhľadom na väzbu substrátu HMG-CoA. Statíny sa viažu s HMG-CoA reductázou približne 1000-násobne účinnejšie ako jej prirodzený substrát (Corsini, A. a spol., 1995), pričom väzba statínov na enzým je reverzibilná (Endo, A. a spol., 1976b).

Mevalonátová metabolická dráha (obrázok 2) je prítomná vo všetkých vyšších eukaryotoch a v mnohých baktériách. Za už spomínané pleiotropné účinky statínov nie sú zodpovedné len ich rozličné postranné reťazce, ale aj deplécia mnohých, pre fyziologické fungovanie bunky nepostrádateľných molekúl, ktoré sú medziproduktmi, prípadne konečnými produktmi mevalonátovej dráhy. Okrem cholesterolu, ktorý je podstatnou zložkou bunkových membrán a podieľa sa na tvorbe žľových kyselín, lipoproteínov a steroidných hormónov, je

v dôsledku inhibície mevalonátovej dráhy v bunke nedostatok dolicholu, ubichinónu, izopentenyladenínu, geranylgeranyl pyrofosfátu (GGPP), farnezylyl pyrofosfátu (FPP) a iných látok. Ubichinón sa zúčastňuje mitochondriálnej respirácie a má dôležitú úlohu v inhibícii peroxidácie lipidov. Pokles jeho hladiny môže viesť k poškodeniu mitochondrií a oxidačnému poškodeniu bunky. Dolichol je dôležitým vychytávačom voľných radikálov v bunkových membránach. Izopentenyladenín je nepostrádateľný pre správnu funkciu tRNA a syntézu proteínov. GGPP a FPP majú významnú rolu v posttranslačnej modifikácii bunkových proteínov zúčastňujúcich sa procesov bunkového delenia a diferenciácie, exprese génov, tvorby cytoskeletu, transportu proteínov a lipidov v bunkách, obrany proti patogénom (Goldstein, J.L. a Brown, M.S., 1990, Tavintharan, S. a spol., 2007).



Obrázok 2 Mevalonátová dráha

1.3 STATÍNY V HYPOLIPIDEMICKEJ LIEČBE

V dôsledku inhibície HMG-CoA reductázy dochádza k zníženiu intracelulárneho cholesterolu. Zníženie cholesterolu v hepatocytoch vedie k zvýšeniu množstva hepatálnych receptorov pre lipoproteíny s nízkou hustotou (LDL), čo vedie k zníženiu množstva cirkulujúcich LDL a ich prekursorov (IDL – lipoproteíny so strednou hustotou, VLDL lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou) (Sehayek, E. a spol., 1994). Všetky statíny znižujú hladinu LDL cholesterolu, ich účinok závisí od podanej dávky (Blum, C.B., 1994, Barter, P.J. a spol., 2010). Tiež inhibujú syntézu apolipoproteínu (apo) B100 v hepatocytoch, ako aj syntézu a sekréciu lipoproteínov bohatých na triglyceridy (Ginsberg, H.N. a spol., 1987). Mierne zvyšujú množstvo lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL). Efektivita hypolipidemickej liečby je pre jednotlivé statíny rôzna (Wierzbicki, A.S. a spol., 2000).

1.4 STATÍNY A CYTOSÓLICKÉ LIPIDOVÉ KVAPÔČKY

Zo všetkých dejov prebiehajúcich v bunke, ktoré statíny ovplyvňujú, sa najmenej pozornosti na molekulárnej úrovni venuje ich vplyvu na množstvo tzv. cytosólických lipidových kvapôčok (angl. *lipid droplet*, LD), čo môže byť spôsobené i tým, že lipidy nie sú geneticky kódované, a teda zmeny génovej expresie odrážajú ich homeostázu len nepriamo. Okrem toho samotné LD nachádzajúce sa v cytosóle predstavujú nie úplne charakterizované organely, ktoré existujú prakticky v každom type buniek (prokaryotických, eukaryotických, rastlinných aj živočíšnych). V cicavčích bunkách a vo väčšine bunkových línií kultivovaných *in vitro* pozostávajú lipidové kvapôčky z jadra, ktoré tvoria neutrálne lipidy, najmä triacylglyceroly a estery cholesterolu. Jadro obkolesuje monovrstva z fosfolipidov a s nimi asociovaných proteínov. Neutrálne lipidy sú skladované v jadre lipidových kvapôčok, aby mohli byť v prípade potreby využité v metabolizme, pri syntéze membrány (fosfolipidy a cholesterol) a syntéze steroidov. Navyše majú LD kľúčovú úlohu pri uskladňovaní cholesterolu vo forme esterov, čím sa zúčastňujú mechanizmov zahrnutých v regulácii hladiny vnútrobunkového voľného cholesterolu (Murphy, D.J., 2001). Hakumäki a Kauppinen (2000), ako aj neskôr publikované výsledky vyplývajúce z dát získaných metódou nukleárnej magnetickej rezonancie (Di Vito, M. a spol., 2001), popisujú vysoko dynamickú úlohu vnútrobunkových LD v mnohých významných vývojových procesoch vrátane proliferácie, inflamácie, malignity, apoptózy, nekrózy a zastavenia bunkového cyklu. Vedomosť o molekulárnych účinkoch statínov na množstvo LD v cytosóle môže poskytnúť vysvetlenie aj pre ďalší, žiaľ negatívny efekt statínov. V prípade výskytu toxického účinku statínov na svalové tkanivo

pacientov (aj keď s nízkou incidenciou) bolo v 20 % z nich v tkanive po biopsii pozorované nezvyčajné akumulovanie lipidov, ktoré bolo eliminované po vysadení liečby statínmi (Masters, B.A. a spol., 1995, Ucar, M. a spol., 2000, Phillips, P.S. a spol., 2002).

1.4.1 Statíny a vnútrobunkové množstvo lipidových kvapôčok

Pre potreby sledovania množstva LD v bunkách bola využitá fluorescenčná mikroskopia. Bunky boli kultivované v prítomnosti simvastatínu 48 hodín v koncentrácii 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Po 48 hodinách kultivácie bolo kultivačné médium odstránené a bunky zafixované (4 % paraformaldehyd, 20 minút). Aby sa predišlo technickým chybám spôsobeným nesprávnym výberom farbičky, pre detekciu cytosólických lipidových kvapôčok boli použité dve rôzne fluorescenčné próby, konkrétne Nílaska červená (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) a BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene). Bunky boli značené fluorescenčnými próbami podľa odporúčaní výrobcu, a to v koncentrácii 10 ng / ml počas 10 minút. Pred samotnou mikroskopiou bola nezreagovaná fluorescenčná farbička eliminovaná premytím preparátu s predchladeným PBS (fosfátový tlmivý roztok, pH 7,4).

V HEK 293T (nenádorová ľudská bunková línia odvodená z obličky embrya) bunkách kultivovaných v kultivačnom médiu so sérom (FBS) sme pozorovali lipidové častice, ktorých množstvo výrazne stúplo po pridaní simvastatínu v koncentrácii 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Aby sme zabránili možnému transportu cholesterolu do buniek z média, kultivovali sme následne bunky v médiu bez FBS (jediný zdroj cholesterolu v kultivačnom médiu), čo malo za následok takmer úplné vymiznutie lipidových častíc z buniek. Po porovnaní množstva LD v takto kultivovaných bunkách s množstvom LD v bunkách v bezsérovom médiu po pridaní simvastatínu v koncentrácii 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ sme však opäť pozorovali väčšie množstvo LD v bunkách v prítomnosti statínu. Experiment sme paralelne realizovali aj na inom type bunkovej línie, konkrétne na ľudskej málo diferencovanej bunkovej línii odvodenej z adenokarcinómu pankreasu s aktivačnou mutáciou v géne *K-ras* MiaPaCa-2. Výsledok bol rovnaký ako v prípade buniek HEK 293T s tým rozdielom, že efekt bol pozorovaný až po 48 hodinovej expozícii buniek simvastatínu v koncentrácii 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

1.4.2 Statíny a expresia génov dôležitých pre funkciu lipidových kvapôčok

Pre potreby sledovania vplyvu statínov na zmeny expresie génov kódujúcich proteíny zúčastňujúce sa životného cyklu LD a ich zložiek bola využitá metóda analýzy DNA mikročipov. K MiaPaCa-2 bunkám boli statíny pridané v dvoch koncentráciách, a to

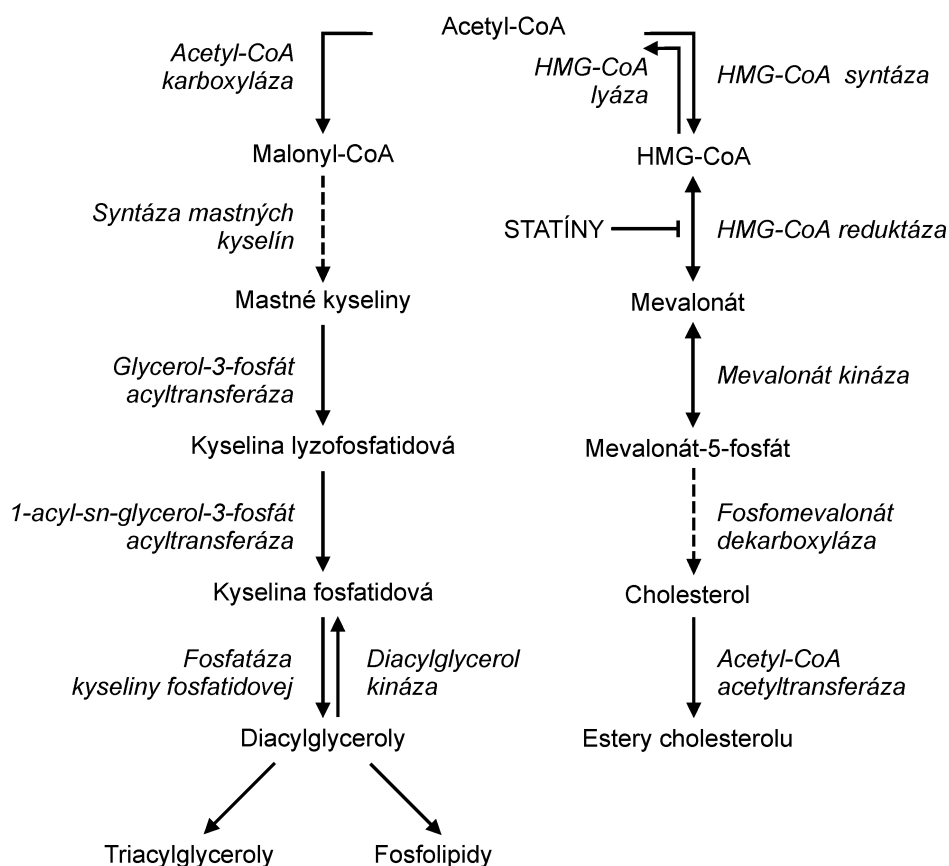
v hodnote rovných IC_{50} a $IC_{50/2}$ stanovených pre simvastatín po 24 hodinách pôsobenia (Gbelcová, H. a spol., 2008). Použité boli zároveň dve kontroly, bunky kultivované v médiu podľa odporúčaní ATCC a bunky kultivované v médiu s rozpúšťadlom (v tomto prípade bol simvastatín rozpustený v metanole). Následne boli bunky zlyzované (RTL – lyzačný tlmivý roztok obsiahnutý v RNeasy Mini Kite od Qiagen, USA) a RNA bola izolovaná (RNeasy Mini Kite, Qiagen, USA) podľa protokolu pre potreby analýzy DNA mikročipov (Illumina Human-6, USA). Po vyhodnotení výsledkov (zaujímavé sú také zmeny v génovej expresii, ktoré sú oproti kontrole minimálne dvakrát väčšie alebo dvakrát menšie), boli významné zmeny v génovej expresii potvrdené metódou real-time PCR. Bunky boli kultivované a ovplyvnené simvastatínom rovnako ako pre potreby analýzy DNA mikročipov.

V testovaných koncentráciách všetky statíny s výnimkou pravastatínu a rosuvastatínu významne ovplyvnili mevalonátovú dráhu. Cerivastatín, pitavastatín a simvastatín ovplyvnili navyše aj Kennedyho dráhu, v ktorej dochádza k syntéze fosfolipidov a glycerolipidov, ďalších zložiek lipidových kvapôčok.

V prípade simvastatínu bol najvýznamnejšie upregulovaný gén *HMGCS1*, ktorý kóduje enzým katalyzujúci kondenzáciu acetyl-CoA s acetoacetyl-CoA za vzniku HMG-CoA. Ďalším významne upregulovaným génom bol *HMGCR* (3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A reductáza), ktorého produktom je enzým (priamy cieľ statínov) zodpovedný za premenu HMG-CoA na kyselinu mevalonátovú. Gén *MVD* (fosfomevalonát dekarboxyláza), ktorého transkripcia bola vplyvom simvastatínu dvojnásobná (v porovnaní s kontrolou), katalyzuje premenu mevalonát pyrofosfátu na izopentenyl pyrofosfát (Goldstein, J.L. a Brown, M.S., 1990). Zaujímavá je významná upregulácia génov pre 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázu beta a fosfatázu kyseliny fosfatidovej 1, čo sú enzýmy katalyzujúce *de novo* syntézu fosfolipidov a glycerolipidov (Leung, D.W., 2001). Ďalším, vplyvom simvastatínu významne upregulovaným génom, bol gén *ACSS2*, ktorého produkt katalyzuje aktiváciu mastných kyselín a esterifikuje ich pred tým, ako podstúpia oxidačnú degradáciu, aby mohli byť využité pre syntézu lipidov (napríklad triacylglyceridov alebo membránových lipidov) (Fujino, T. a spol., 2001). Proteín kódovaný génom *ABCA7* (posledný významne upregulovaný vplyvom simvastatínu) je členom transmembránových transportérov, ktoré sa podieľajú okrem iného na transporte lipidov a sterolov (Abe-Dohmae, S. a spol., 2004).

Interpretácia získaných výsledkov a záver

Vzťahy medzi produktmi génov, ktorých expresia bola vplyvom simvastatínu významne ovplyvnená, sú zhrnuté na obrázku 3. Inhibíciou HMG-CoA reductázy sa hromadí v bunke Acetyl-CoA, ktorý je zároveň substrátom pre syntézu mastných kyselín a následne triacylglyceridov. Tie predstavujú druhú najvýznamnejšiu zložku lipidových častíc po esteroch cholesterolu, čo môže vysvetľovať zvýšenie množstva intracelulárnych lipidových častíc v bunkách kultivovaných v prítomnosti simvastatínu.



Obrázok 3 Dráhy ovplyvnené simvastatínom súvisiace s metabolizmom lipidov

Výsledky boli prezentované na konferencii ISCOM 2012 v Groningene v Holandsku a publikované:

Gbelcová, H., Švéda, M., Laubertová, L., Varga, I., Vitek, L., Kolář, M., Strnad, H., Zelenka, J., Böhmer, D., Ruml, T.: The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. In: Lipids in Health and Disease [elektronický zdroj]. - Vol. 12, No. 1 (2013), Art. No. 126 [9 s.] [online]. - ISSN 1476-511X

2 STATÍNY A NÁDOROVÉ OCHORENIA

V dôsledku deplécie produktov mevalonátovej dráhy majú statíny okrem hypolipidemických účinkov aj rad ďalších pleiotropných biologických efektov, ktoré hrajú významnú úlohu v prevencii progresie niektorých ochorení. Ide najmä o účinky protizápalové, imunomodulačné, účinky brániace endotelovej dysfunkcii, antioxidantné, proapoptotické či antiproliferačné účinky (Lacerda, L. a spol., 2014, Bellosta, S. a spol., 2000). Uvedené pleiotropné efekty ovplyvňujúce mechanizmy bunkového cyklu, diferenciáciu, apoptózu a ďalšie fyziologické deje odkazujú na dôležitú úlohu statínov aj v procese onkogenézy (Svoboda, M. a spol., 2005).

Výsledky liečby zameranej na zníženie hladiny lipidov u zvierat spočiatku poukazovali na zvýšené riziko rakoviny (Newman, T.B. a Hulley, S.B., 1996). Dávka statínov použitá v tejto štúdií však bola veľmi vysoká a nepoužiteľná pre človeka (Dalen, J.E. a Dalton, W.S., 1996). Výsledky štúdií týkajúcich sa vývoja rakoviny konkrétneho tkaniva jedincov užívajúcich statíny ako hypolipidemiká boli kontroverzné. V jednej štúdií bola pozorovaná zvýšená incidencia rakoviny prsníka (Sacks, F.M. a spol., 1996), iná štúdiá však dané zistenie nepotvrdila (Downs, J.R. a spol., 1998). Na druhej strane bol po podaní statínov zaznamenaný znížený výskyt melanómov (Downs, J.R. a spol., 1998). Podobný prospešný účinok statínov bol pozorovaný v súvislosti s vývojom karcinómov hrubého čreva (Graaf, M.R. a spol., 2004). Avšak väčšina týchto štúdií nebola pôvodne určená na skúmanie súvislosti medzi príjmom statínov a rakovinou, ale skôr medzi statínmi a kardiovaskulárnymi ochoreniami. V niektorých prácach bol skutočne preukázaný štatisticky významne nižší výskyt nádorových ochorení, a to i napriek relatívne krátkej dobe sledovania a nevhodnému výberu chorých (tieto štúdie sú primárne zamerané na prevenciu kardiovaskulárných ochorení) (4S Group, 1994, Shepherd, J. a spol., 1995, Lewis, S.J. a spol., 1998, Ridker, P.M. a spol., 1998, LIPID Study Group, 1998, Athyros, V.G. a spol., 2002). Napríklad v štúdií kolektívu Pedersena, ktorí sledovali populácie vyšetované v známej 4S štúdií ďalšie dva roky za účelom zistenia mortality a jej príčiny, sa zistilo, že mortalita spôsobená nádorovými ochoreniami bola v skupine liečenej simvastatínom významne nižšia (Pedersen, T.R. a spol., 2000). V rozsiahlych štúdiách prevedených na 500 000 amerických vojnových veteránov bolo preukázané, že užívanie statínov je spojené s 2 – 5 krát nižším výskytom karcinómu pľúc (Khurana, V. a spol., 2007), prsníka (Kochhar, R. a spol., 2005) a prostaty (Singal, R. a spol., 2005). Na základe iných metaanalýz sa statíny zdajú byť obzvlášť účinné v chemoprevencii kolorektálneho karcinómu (Graaf, M.R. a spol., 2004, Poynter, J.N. a spol., 2005).

Zatiaľ čo existuje celý rad *in vitro*, ako aj *in vivo* štúdií priamo zameraných a potvrdzujúcich výrazný efekt statínov na proliferáciu veľmi rozmanitých typov nádorov, ako sú napríklad hepatocelulárny karcinóm (Kawata, S. a spol., 1994), karcinóm pľúc (Hawk, M.A. a spol., 1996), kolorektálny karcinóm (Feleszko, W. a Jakobisiak, M., 2000) a iné, klinických štúdií primárne zameraných na efektívnosť statínov v liečbe nádorov je len niekoľko. Jedna z nich ukázala, že pacienti s hepatocelulárnym karcinómom preživali štatisticky významne dlhšie, ak im bol podávaný pravastatín (Kawata, S. a spol., 2001). Na druhej strane jednoznačne priaznivé účinky lovastatínu na prežívanie pacientov s multiformným glioblastómom alebo pokročilým adenokarcinómom žalúdka pozorované neboli (Kim, W.S. a spol., 2001, Larner, J. a spol., 1998). Závety metaanalýz naznačujú súvislosť medzi liečbou pravastatínom a rakovinou u starších pacientov (Bonovas, S. a Sitaras, N.M., 2007), ale nepodporujú potenciálnu úlohu statínov pri prevencii hematologických malignít (Bonovas, S. a spol., 2007), ani hypotézu, že statíny znižujú riziko rakoviny pankreasu (Bonovas, S. a spol., 2008).

2.1 VPLYV STATÍNOV NA PROLIFERÁCIU A APOPTÓZU

Statíny vykazujú antiproliferačné účinky zastavením, a teda synchronizáciou buniek v G1 fáze a predĺžením G2 fázy bunkového cyklu (Jakobisiak, M. a spol., 1991, Reed, S.I. a spol., 1994, Naderi, S. a spol., 1999). Iné štúdie ukázali, že statíny síce inhibujú rast buniek, ich bunkový cyklus však nebol zastavený v G1 fáze a nenastala ani synchronizácia buniek po odstránení statínov z kultivačného média (Cooper, S., 2002). Zastavenie bunkového cyklu statínmi je sprostredkované atenuáciou inhibítorov cyklíndependentných kináz (CDK) p21 (Lee, S.J. a spol., 1998) a p27 (Vidal, A. a spol., 2002). Zvýšenie p21/p27 je výsledkom inhibície RhoA, ktorá za normálnych podmienok potláča expresiu inhibítorov CDK (Adnane, J. a spol., 1998). Lovastatín potláča proliferáciu buniek prostredníctvom inhibície proteazómom sprostredkovanej degradácie p21 a p27 (Rao, S. a spol., 1999). Inhibičný účinok statínov na rast a metastatický potenciál nádorových buniek bol pozorovaný *in vitro* aj *in vivo* (Kusama, T. a spol., 2002, Sebt, S.M. a spol., 1991).

Často sa uvádza, že statíny indukujú apoptózu. Najprv sa predpokladalo, že apoptóza vyvolaná statínmi je špecifická pre nádorové bunky (Wong, W.W. a spol., 2001, Wong, W.W. a spol., 2002, Cafforio, P. a spol., 2005). Neskoršie proapoptotické účinky boli pozorované aj u primárnych endotelových buniek hlodavcov a ľudí (Buemi, M. a spol., 1999, Kaneta, S. a spol., 2003, Li, X. a spol., 2002). Indukcia apoptózy statínmi závisí od ich dávky a času pôsobenia, pričom dochádza k stimulácii mitochondriálnej dráhy apoptózy, ktorá je

charakterizovaná nerovnováhou hladín proteínov Bax a Bcl aktiváciou kaspázy 9 a kaspázy 3 (Cafforio, P. a spol., 2005).

2.2 STATÍNY A ADHEZIVITA, INVAZIVITA A ANGIOGENÉZA

Nádorové bunky v porovnaní s nenádorovými vykazujú komplexné zmeny v expresii génov, priľnavosti k sebe navzájom alebo k extracelulárnemu matrix, ako aj v pohyblivosti. Viaceré štúdie dokázali, že statíny interferujú s dejmi, ktoré podporujú vznik metastáz. *In vitro* aj *in vivo* štúdie preukázali, že statíny inhibujú invazívnosť nádorových buniek (Denoyelle, C. a spol., 2001, Gliemroth, J. a spol., 2003, Kort, W.J. a spol., 1989). Antiinvazívny účinok statínov je výsledkom koordinovanej inhibície bunkovej motility (Mehta, N. a spol., 1998), zmeny adhézie buniek (Nübel, T. a spol., 2004a, Nübel, T. a spol., 2004b) a zníženej expisie metaloproteináz matrixu (Wang, I.K. a spol., 2000).

Neovaskularizácia je ďalším dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje rast nádorov a vznik metastáz. Boli pozorované aj proangiogénne účinky statínov. Vplyv statínov na angiogenézu závisí od dávky. Vysoké, pričom stále fyziologicky relevantné, dávky statínov angiogenézu inhibujú, ďalej indukujú zastavenie bunkového cyklu a zmierňujú invazívnosť, zatiaľ čo nízke dávky majú opačný účinok a angiogenézu podporujú (Urbich, C. a spol., 2002, Weis, M. a spol., 2002). Preklinické údaje preto naznačujú, že statíny môžu byť použiteľné pri protinádorovej terapii ako inhibítory metastatických procesov.

2.3 NÁDORY PANKREASU A PRENYLÁCIA PROTEÍNOV RAS

Kanceroprotektívny účinok statínov je do značnej miery pripisovaný aj ich vplyvu na prenyláciu proteínov, z pomedzi ktorých GTP-viažuce Ras proteíny významne regulujú množstvo funkcií v bunke vrátane bunkovej proliferácie. V zdravých bunkách proteíny Ras na membránach cyklicky menia svoju konformáciu medzi neaktívnym GDP-viažucim stavom a aktívnym GTP-viažucim stavom (Boguski, M.S. a McCormick, F., 1993). Na rozdiel od aktivačných mechanizmov uplatňujúcich sa za fyziologických podmienok však môže v génoch *ras* v malígnych tkanivách dochádzať k aktivačným mutáciám (najčastejšie v *K-ras* géne) a expresiou v týchto zmutovaných génoch dochádza k produkcii Ras proteínov, ktoré sú v neustále aktivovanom stave a nepretržite rozbiehajú signálne kaskády súvisiace aj s proliferáciou buniek (obrázok 6). Výsledkom je následný neregulovaný rast bunkových populácií a rozvoj nádorového ochorenia. Zistilo sa, že u približne 30 % všetkých zhubných nádorov človeka sa vyskytujú aktivačné mutácie génov *ras* a napríklad u karcinómov pankreasu dosahuje toto číslo 90 % (Almoguera, C., a spol., 1988).

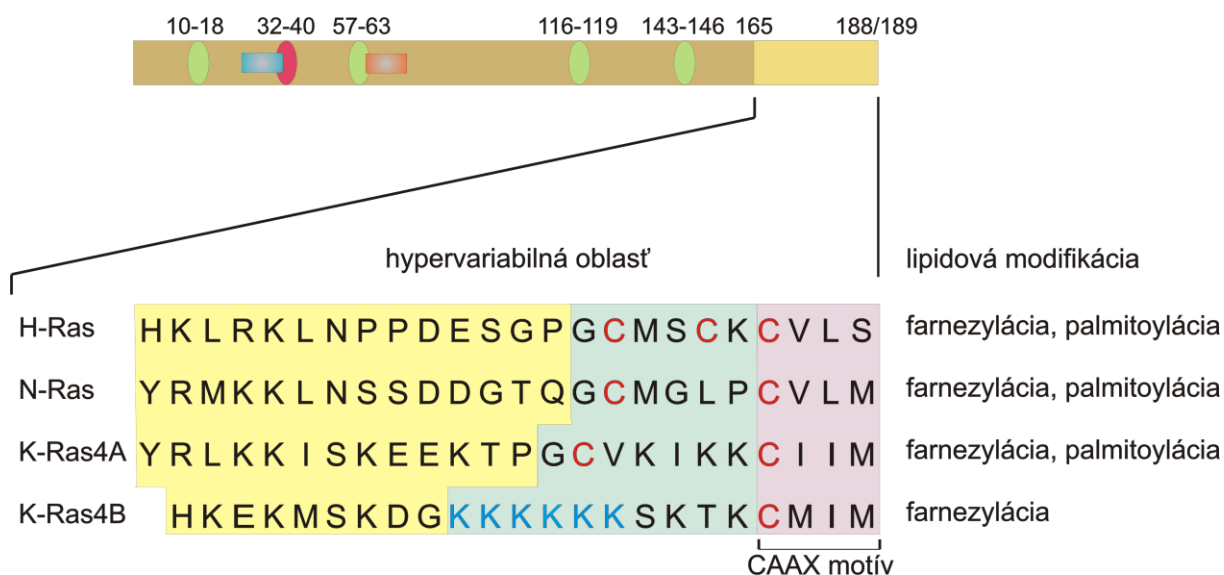
Antiproliferačný účinok statínov na nádory pankreasu bol opísaný vo viacerých štúdiách (Bocci, G. a spol., 2005, Kusama, T. a spol., 2001, 2002, Mikulski, S.M. a spol., 1992, Muller, C. a spol., 1998, Ura, H. a spol., 1994, Sumi, S. a spol., 1992, 1994, Yao, C.J. a spol., 2006). V roku 1992 bola publikovaná prvá štúdia opisujúca značný antiproliferačný účinok lovastatínu na málo i dobre diferencované bunkové línie odvodené od ľudského nádoru pankreasu v podmienkach *in vitro* ako aj *in vivo*. V *in vivo* štúdií však boli aplikované len extrémne vysoké dávky lovastatínu (60 mg / kg hmotnosti za deň) (Sumi, S. a spol., 1992). Podobný účinok lovastatínu na nádor pankreasu zaznamenal v tomto roku aj Mikulski a jeho kolektív (Mikulski, S.M. a spol., 1992). V ďalšej *in vitro* štúdií na piatich bunkových líniách nádoru pankreasu v roku 1994 Sumi a kolektív, ako aj neskôr v roku 1998 Muller a kolektív pozorovali inhibíciu nádorových buniek pankreasu lovastatínom a to aj v prípade ak v bunkách nebola prítomná aktivačná mutácia v géne *K-ras* (Sumi, S. a spol., 1994; Muller, C. a spol., 1998). Účinok statínov ako látok podporných pri chemoterapii na experimentálnom modeli nádoru pankreasu bol rovnako opísaný vo viacerých štúdiách, vrátane súčasného účinku fluvastatínu a gemcitabínu (Bocci, G. a spol., 2005), alebo lovastatínu a troglitazónu (Yao, C.J. a spol., 2006).

Nádory pankreasu predstavujú maligny typ nádoru, ktorý je invazívny, rýchlo postupujúci, vo všeobecnosti rezistentný k štandardnej chemoterapeutickej, radiačnej či chirurgickej liečbe. Liečba je len výnimočne účinná v skorých štádiách ochorenia. Prognóza závisí od vlastností nádoru v dobe diagnózy, no všeobecne je považovaná za nepriaznivú. Len menej ako 5 % diagnostikovaných prežije 5 rokov od diagnózy a k úplnému vyzdraveniu dochádza zriedkakedy. Okolo 95 % nádorov pankreasu predstavuje adenokarcinóm, zvyšných 5 % zahŕňa iné typy nádorov exokrinnej časti pankreasu, acinárnych ciev a neuroendokrinné nádory pankreasu. Tieto typy nádorov sa odlišujú diagnostickým aj terapeutickým profilom a vo všeobecnosti majú priaznivejšiu prognózu. Avšak v porovnaní s inými typmi nádorov sú nádory pankreasu významne menej zahrnuté ako do klinického, tak i do základného výskumu, nakoľko chýbajú nové metodické postupy pre liečbu nádorov pankreasu (Ghaneh, P. a spol., 2007). Statínmi sprostredkovaná inhibícia farnezylácie proteínu Ras sa zdá byť sľubným podporným prístupom k modifikácii bunkovej proliferácie v nádoroch pankreasu a v nádorových tkanivách vôbec (nakoľko farnezylácia je potrebná pre správnu posttranslačnú modifikáciu Ras proteínov). Je to jeden z dôvodov, prečo sa okrem primárneho použitia statínov intenzívne študuje aj protinádorová aktivita statínov, s čím je spojených aj niekoľko klinických štúdií (I. a II fáza) (Wong, W.W. a spol., 2002).

2.3.1 Štruktúra a posttranslačná modifikácia Ras

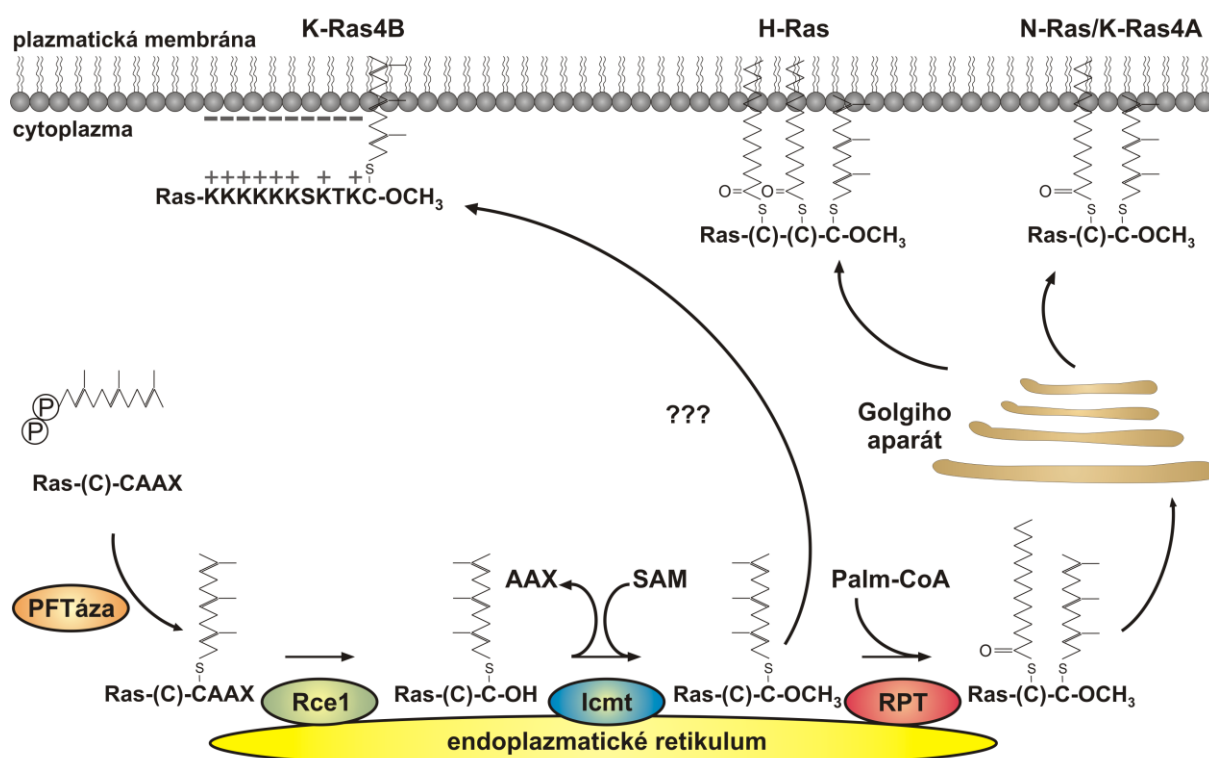
Tri gény *ras* kódujú 4 proteíny Ras: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A a K-Ras4B. K-Ras4B pozostáva zo 188 aminokyselín, zvyšné tri pozostávajú zo 189 aminokyselín (Lowy, D.R. a Willumsen, B.M., 1993). Jediná oblasť Ras izoforiem, ktorá vykazuje značné rozdiely v sekvenciách je tvorená 24 zvyškami v C-terminálnej oblasti, a preto je označovaná ako hypervariabilný región (HVR). HVR obsahuje dve signálne sekvencie ovplyvňujúce transport Ras proteínov na plazmatickú membránu. Prvou je motív CAAX (C-cysteín, A-alifatická aminokyselina, X-serín alebo metionín) na C-konci všetkých proteínov Ras (Hancock, J.F. a spol., 1989, Willumsen, B.M. a spol., 1984), pričom cysteín 186 je v procese posttranslačnej modifikácie farnezylovaný (nevratný dej). Druhou signálnou sekvenciou sa proteíny Ras líšia. Tá zahŕňa šesť lyzínových zvyškov v pozícii 175-180 v prípade K-Ras4B, alebo cysteín podstupujúci palmitoyláciu v pozícii 180 v prípade K-Ras4A, v pozícii 181 v prípade N-Ras, a cysteínov v pozícii 181 a 184 v prípade H-Ras (Hancock, J.F. a spol., 1991, Lowy, D.R. a Willumsen, B.M., 1993). Schematické znázornenie štruktúry Ras izoforiem a Ras hypervariabilnej oblasti, ako aj posttranslačných modifikácií Ras proteínov je na obrázkoch 4 a 5, pričom detailný opis uvedených skutočností, ako aj vnútrobunkového retrográdneho transportu Ras proteínov bol spracovaný do publikácie Gbelcová, H., Rimpelová, S., Knejzlík, Z., Repiská, V., Ruml, T., Böhmer, D.: Proteíny Ras: kľúčové regulátory bunkového cyklu. In: Chemické listy. - Roč. 109, č. 5 (2015), s. 364-370. - ISSN 0009-2770.

Napriek relatívnej jednoduchosti molekulárnej štruktúry a posttranslačnej modifikácie Ras proteínov sú ich signalizačné vlastnosti a vnútrobunkový transport oveľa komplikovanejšie (Ashery, U. a spol., 2006a, 2006b, Elad-Sfadia, G. a spol., 2002, 2004, Jura a spol., 2006, Philips, M.R., 2005) a dodnes nie úplne preskúmané. Ras proteíny spúšťajú viaceré signálne dráhy, a to, ktoré dráhy sú dominantne aktivované, závisí od typu aktívneho Ras proteínu, od typu efektorových molekúl dostupných počas stimulačnej periódy (Herrmann, 2003), a teda aj od ich vnútrobunkovej lokalizácie (Bivona, T.G. a spol., 2003, 2006, Chiu, V.K. a spol., 2002, Hancock, J.F., 2003, Kenworthy, A.K., 2005, Prior, I.A. a Hancock, J.F., 2001, Waldmann, H., 2005). GTPázy sú zároveň schopné podieľať sa na viacerých signálnych dráhach v jednom čase (Bar-Sagi, D., 2001). Okrem iného nie je dodnes známe, či HVR Ras proteínov je jedinou oblasťou zodpovednou za ich lokalizáciu v bunke alebo k tejto prispievajú aj iné domény Ras proteínov.



Obrázok 4 Štruktúra Ras izoforiem a Ras hypervariabilnej oblasti

— GEF interakčná oblasť, — efektor/GAP interakcia, — oblasť viažuca efektoary, — oblasť zodpovedná za väzbu s guaninnukleotidom, GEF – guaninnukleotid výmenný faktor (*guanine nucleotide-exchange factor*), GAP – guanozíntrifosfát aktivujúci proteín (*guanosinetriphosphatases-activating protein*), C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín

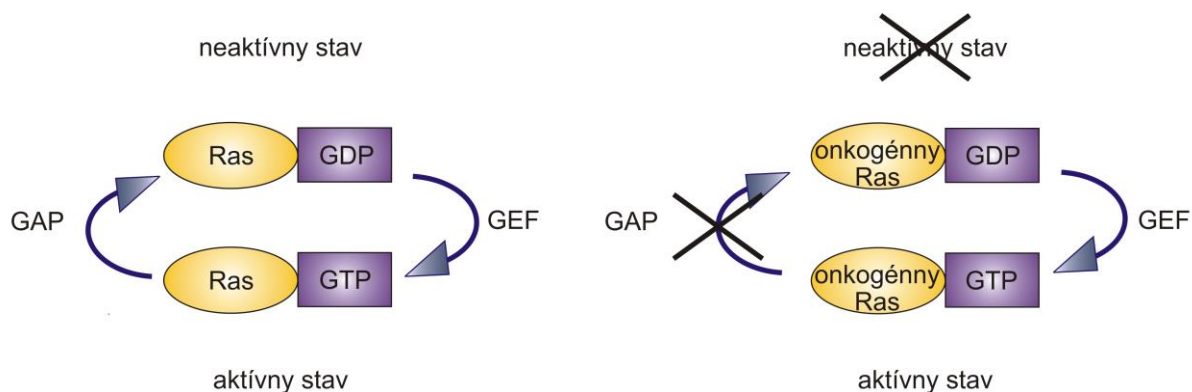


Obrázok 5 Posttranslačná modifikácia a konvenčný vnútrobunkový transport Ras proteínov

FTáza – farnezytransferáza, ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, Icmt – izoprenylcysteínkarboxylmetyltransferáza, Rce1 – Ras meniaci enzým, Palm-CoA – palmitoyl koenzým A, SAM – S-adenozylmetionín, RPT – ER-lokalizovaná palmitoyltransferáza, PM – plazmatická membrána (upravené podľa Prior, I.A. a Hancock, J.F., 2001, Midgley, R.S. a Kerr, D.J., 2002, Hancock, J.F., 2003)

2.3.2 Regulácia aktivity proteínov Ras

V nenádorových bunkách Ras proteíny cirkulujú medzi neaktívnym GDP - viazaným stavom a aktívnym GTP - viazaným stavom (Boguski, M.S. a McCormick, F., 1993). Pretože GTP je v bunkách prítomné za fyziologických podmienok vo vyššej koncentrácii ako GDP, Ras proteíny prednostne viažu GTP a tvoria aktívne Ras-GTP. Rýchlosť prirodzenej hydrolýzy viazaného GTP samotnými Ras proteínmi (majú GTPázovú aktivitu) je veľmi nízka. Ukončenie aktívneho stavu je za fyziologických podmienok urýchľované GTPázy aktivujúcim proteínom (GAP). Onkogénne Ras proteíny sú rezistentné k aktivite GAP, čoho výsledkom je ich nepretržitá aktivita. Aby mohli byť Ras proteíny opätovne aktivované guanín nukleotid výmenné faktory (GEFs – *guanine nucleotide-exchange factors*) viažu Ras-GDP, pričom spôsobujú disociáciu viazaného GDP. Ras proteíny sú tak zase prístupné väzbe s GTP a cyklus sa uzatvára (obrázok 6).



Obrázok 6 Regulácia aktivity proteínov Ras

GEF – guanín nukleotid výmenný faktor, GDP – guanozín difosfát, GTP – guanozín trifosfát, GAP – GTPázy aktivujúci proteín (upravené podľa Midgley, R.S. a Kerr, D.J., 2002, Vojtek, A.B. a Der, C.J., 1998)

2.4 MECHANIZMUS PROTINÁDOROVÉHO ÚČINKU STATÍNOV

2.4.1 Antiproliferačný vplyv statínov na nádorové bunky *in vitro* a *in vivo*

Sledovali sme vplyv všetkých, v tom období sedem (pitavastatín nebol dostupný v čistej forme), komerčne dostupných statínov, na tri ľudské bunkové línie adenokarcinómu pankreasu, MiaPaCa-2 (málo diferencované bunky s aktivačnou mutáciou G12C v géne kódujúcom proteín K-Ras), BxPC-3 (málo až stredne dobre diferencované bunky s divokým typom génu kódujúceho proteín K-Ras a zvýšenou expresiou cyklooxygenázy 2) a CAPAN-2 (dobro diferencované bunky s aktivačnou mutáciou G12C v géne kódujúcom proteín K-Ras). Množstvo buniek sme sledovali 24, 48 a 72 hodín po ovplyvnení statínmi priamym počítaním v Bürkerovej komôrke.

Preukázali sme, že statíny inhibujú rast pankreatických nádorových buniek a pre jednotlivé statíny sme stanovili hodnoty IC_{50} (tabuľka 1). Najmenej účinným inhibítorom bol pravastatín, naopak najvýznamnejšie antiproliferačné účinky preukázali cerivastatín a simvastatín. Bunky s aktivačnou mutáciou G12C v géne kódujúcom K-Ras boli k účinku statínov všeobecne citlivejšie v porovnaní s bunkami nesúcimi divoký typ génu pre proteín K-Ras.

Tabuľka 1 Vplyv statínov na rast buniek odvodených od adenokarcinómu pankreasu

	IC_{50} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)								
	CAPAN-2			MiaPaCa-2			BxPc-3		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Rosuvastatín	39	30	26	36	27	20	56	50	13
Pravastatín	27	>40	>40	29	>40	>40	39	48	>40
Atorvastatín	22	7	5	27	21	10	37	33	10
Fluvastatín	21	5	5	26	12	9	29	27	7
Lovastatín	16	5	4	13	11	3	33	31	7
Simvastatín	14	6	3	12	10	5	26	23	6
Cerivastatín	12	3	2	10	9	5	22	21	8

Získané výsledky korešpondovali s výsledkami experimentov realizovaných na athymických myšiach v spolupráci s prof. Vítkom (IV. Interná klinika 1 LF UK, Praha). U týchto myší bola umelo indukovaná tvorba nádoru xenotransplantáciou buniek CAPAN-2 a následne (po prihojení a iniciácii rastu nádoru, 7 – 10 dní po xenotransplantácii) im boli podávané jednotlivé statíny (všetky okrem pitavastatínu) v dennej dávke približne odpovedajúcej hypocholesterolemickkej dávke u človeka. Statíny boli podávané raz denne žalúdočnou sondou vo forme vodnej suspenzie. Primárnym parametrom bolo prežívanie myší, a zároveň bola analyzovaná progresia nádorov meraním ich veľkosti každý tretí deň. V tomto

experimente bol najmenej účinný pravastatín, doba prežívania myši s nádorom bola porovnateľná s dobou života neliečených myši. Myši liečené simvastatínom mali tretiu najvyššiu dobu prežitia. Najúčinnšie statíny pri liečbe myši boli rosuvastatín a cerivastatín.

2.4.2 Vplyv statínov na génovú expresiu

Pre celogenómovú analýzu (Illumina HumanWG-6_V3 chips, Illumina, USA) sme zvolili MiaPaCa-2 bunky. Sledovali sme vplyv statínov v dvoch koncentráciách, 6 a 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hodinách pôsobenia. Koncentrácia 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zodpovedá hodnote IC_{50} simvastatínu pre danú bunkovú líniu a čas pôsobenia. Zvolili sme ju, lebo simvastatín bol po cerivastatínu najúčinnjší statín *in vitro* (tabuľka 1), pričom v tej dobe bol cerivastatín stiahnutý z trhu pre nežiaduce účinky.

Celkový počet génov s významne zmenenou expresiou po ošetrení buniek MiaPaCa-2 statínmi je uvedený v tabuľke 2. Najúčinnšími statínmi v testovaných koncentráciách boli cerivastatín a pitavastatín, zatiaľ čo pravastatín a rosuvastatín vykazovali najnižší účinok na expresiu génov. Vo všeobecnosti došlo vplyvom statínov častejšie k zvýšeniu než k zníženiu génovej expresie. Vplyv statínov na expresiu génov klesal s ich klesajúcou lipofilitou. V tejto súvislosti sme sa v spolupráci s profesorkou Hajšlovou rozhodli stanoviť množstvo statínov, ktoré reálne prejde do buniek, použili sme kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou spektrometriou. Hydrofilné statíny (pravastatín a rosuvastatín) prechádzali do buniek v porovnaní s lipofilnými statínmi v štatisticky významne menšom množstve.

Tabuľka 2 Počet génov s významne zmenenou expresiou po účinku statínov

	IC_{50} ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Koncentrácia statínu						intracelulárna koncentrácia (nmol/100000 buniek)
		6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$		12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$				
		Gény so zvýšenou expresiou (počet)	Gény so zníženou expresiou (počet)	Gény so zmenenou expresiou (počet)	Gény so zvýšenou expresiou (počet)	Gény so zníženou expresiou (počet)	Gény so zmenenou expresiou (počet)	
Cerivastatín	10	235	100	335	397	268	665	146,3
Pitavastatín	20	187	138	325	344	320	664	92,6
Simvastatín	12	46	18	64	128	38	166	156,4
Fluvastatín	26	57	23	80	59	15	74	189,1
Atorvastatín	27	2	0	2	41	10	51	111,5
Lovastatín	13	8	1	9	33	5	38	301,1
Pravastatín	29	0	0	0	0	0	0	50,7
Rosuvastatín	36	0	0	0	0	0	0	26,6

Šípka znázorňuje klesanie lipofility statínov. Za významne ovplyvnené boli považované zmeny génovej expresie s $\text{FC} > 2,0$ alebo $< 0,5$ a $\text{FDR} < 0,05$ (FC – fold change, FDR – false discovery rate)

V prípade väčšiny statínov sme pozorovali štatisticky významnú koreláciu medzi intracelulárnym množstvom statínov a mierou zmien v génovej expresii, ako aj s ich antiproliferačným účinkom (tabuľka 2).

Vplyv jednotlivých statínov na expresiu génov koreloval s ich antiproliferačnými účinkami pozorovanými na rakovinových bunkách pankreasu v *in vitro* podmienkach. Výnimkou bol lovastatín, ktorý patrí k statínom s vyššou antiproliferačnou kapacitou, ale k statínom s menej významným účinkom na expresiu génov (tabuľka 2). Statíny vo vyššej testovanej koncentrácii ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$) ovplyvnili vyšší počet génov, výnimkou bol fluvastatín, ktorý ovplyvnil expresiu podobného počtu génov v oboch testovaných koncentráciách (tabuľka 2).

Interpretáciu získaných údajov mikročipovej analýzy sme zamerali na identifikáciu a porovnanie molekulárných mechanizmov a biologických dráh súvisiacich predovšetkým s antiproliferačnými a protinádorovými účinkami. Okrem najmenej účinných statínov *in vitro* (pravastatín a rosuvastatín) všetky testované statíny ovplyvnili expresiu významného počtu génov, ktorých produkty sú zahrnuté v replikácii DNA a regulácii bunkového cyklu.

A ako už bolo uvedené, v testovaných koncentráciách všetky statíny, okrem najmenej účinných (pravastatínu a rosuvastatínu), ovplyvnili mevalonátovú dráhu. Najúčinnjšie statíny (cerivastatín, pitavastatín a simvastatín) ovplyvnili aj Kennedyho dráhu, čiže syntézu fosfolipidov a glycerolipidov, a tým aj syntézu lipidových kvapôčok, ktoré sa podieľajú na mnohých biologických procesoch vrátane proliferácie, apoptózy alebo nekrózy (Hakumäki, J.M. a Kauppinen, R.A., 2000, Di Vito, M. a spol., 2001).

Veľmi zaujímavé bolo tiež štatisticky významné zvýšenie expresie génu *K-ras*, ktorý je v nádorových bunkách často mutovaný a jeho produkt posttranslačne modifikovaný farnesylpyrofosfátom, ktorého je vplyvom statínov v bunkách nedostatok.

2.4.3 Remodelácia bunkového cyklu a aktínového cytoskeletu statínmi

Na základe predchádzajúcich výsledkov svetelnej mikroskopie morfológie buniek ovplyvnených statínmi a mikročipovej analýzy sme sa rozhodli vyhodnotiť vplyv statínov na bunkový cyklus a aktínový cytoskelet. Ako bunkový model sme opäť zvolili tri bunkové línie odvodené z adenokarcinómu pankreasu. Vplyv statínov (6 a $12 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 24 , 48 , 72 hodín) na cytoskelet sme pozorovali pomocou fluorescenčného mikroskopu po farbení buniek faloidínom konjugovaným s TRITC (tetrametylrodaminizotiokyanát). Na sledovanie vplyvu statínov na bunkový cyklus sme použili prietokový cytometer.

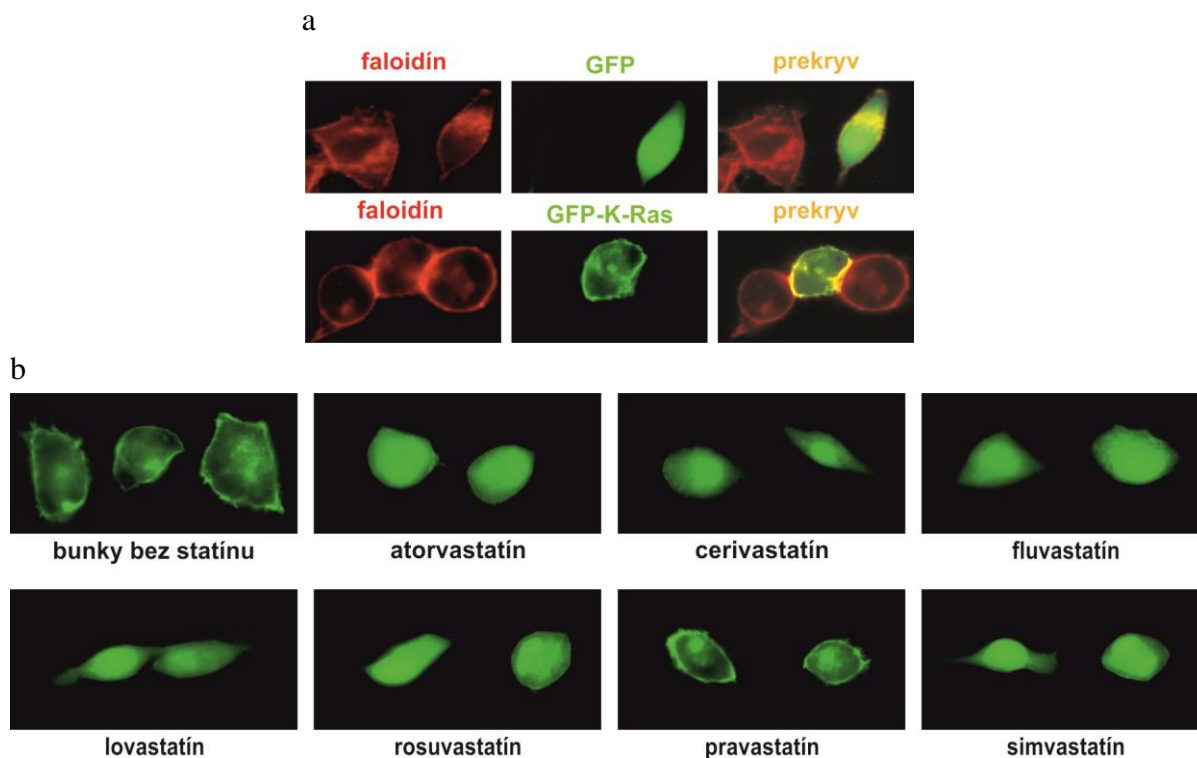
Všeobecne najmenší vplyv na morfológiu a konfluenciu buniek mali pravastatín a rosuvastatín, najväčší cerivastatín a pitavastatín. Tieto výsledky korelujú s údajmi hodnôt IC_{50} pre jednotlivé bunkové línie. K statínom, ktoré cytoskelet testovaných buniek ovplyvnili už po 24 hodinách pôsobenia patria cerivastatín a pitavastatín, po 72 hodinách spôsobili v testovanej koncentrácii uvoľnenie buniek z kultivačného povrchu. Naopak pravastatín v testovanej koncentrácii neovplyvnil aktínový cytoskelet buniek ani po 72 hodinách pôsobenia. Výsledky pozorovania vplyvu statínov na aktínový cytoskelet buniek korelujú s pozorovaniami morfológických zmien buniek po účinku statínov.

Všetky statíny, okrem pravastatínu viac alebo menej významne ovplyvnili bunkový cyklus, pričom významnosť vplyvu jednotlivých statínov sa líšila medzi jednotlivými bunkovými líniami. Nelíšila sa len významnosť vplyvu, ale aj spôsob, akým statíny ovplyvnili bunkový cyklus buniek rôznych typov nádorov pankreasu. So stúpajúcou mierou diferenciácie buniek sa významnosť účinku statínov na bunkový cyklus buniek všeobecne znížila. Zároveň, ak sme u viac diferencovaných bunkových línií efekt pozorovali, tak nešlo o nárast množstva buniek v G1/G0 fáze, ako v prípade málo diferencovaných MiaPaCa-2 buniek, ale vo fáze G2/M. Výsledky korelovali s údajmi získanými mikročipovou analýzou.

2.4.4 Vplyv statínov na vnútrobunkový transport proteínu K-Ras

K štúdiu vplyvu statínov na lokalizáciu proteínu K-ras v bunke nás viedli viaceré skutočnosti. Prvou bol fakt, že mnohé nádory nesú aktivačnú mutáciu génu kódujúceho proteín K-Ras, ktorý následne neustále signalizuje z plazmatickej membrány, čím spôsobuje nekontrolované delenie bunky a druhou, že statíny inhibujú syntézu farnezylypyrofosfátu, ktorý je nepostrádateľný pre správnu posttranslačnú modifikáciu proteínu K-Ras. V hypotéze, že statíny nejakým spôsobom ovplyvňujú proteíny K-Ras, nás utvrdili výsledky mikročipovej analýzy, ktoré preukázali štatisticky významné zvýšenie expresie génu *K-ras*.

Pripravili sme preto konštrukt, produktom ktorého je proteín K-Ras divokého typu fúzovaný so zeleným fluorescenčným proteínom (GFP). Po transfekcii buniek MiaPaCa-2 sme pozorovali lokalizáciu proteínov, produktov pripravených konštruktov, v bunkách po ovplyvnení statínmi (obrázok 7). Následne sme pripravili aj konštrukt nesúci informáciu pre produkciu proteínu K-Ras s aktivačnou mutáciou G12C, rovnako fúzovaného s proteínom GFP a po transfekcii sme pozorovali rovnaký výsledok ako v prípade proteínu GFP-K-Ras divokého typu.

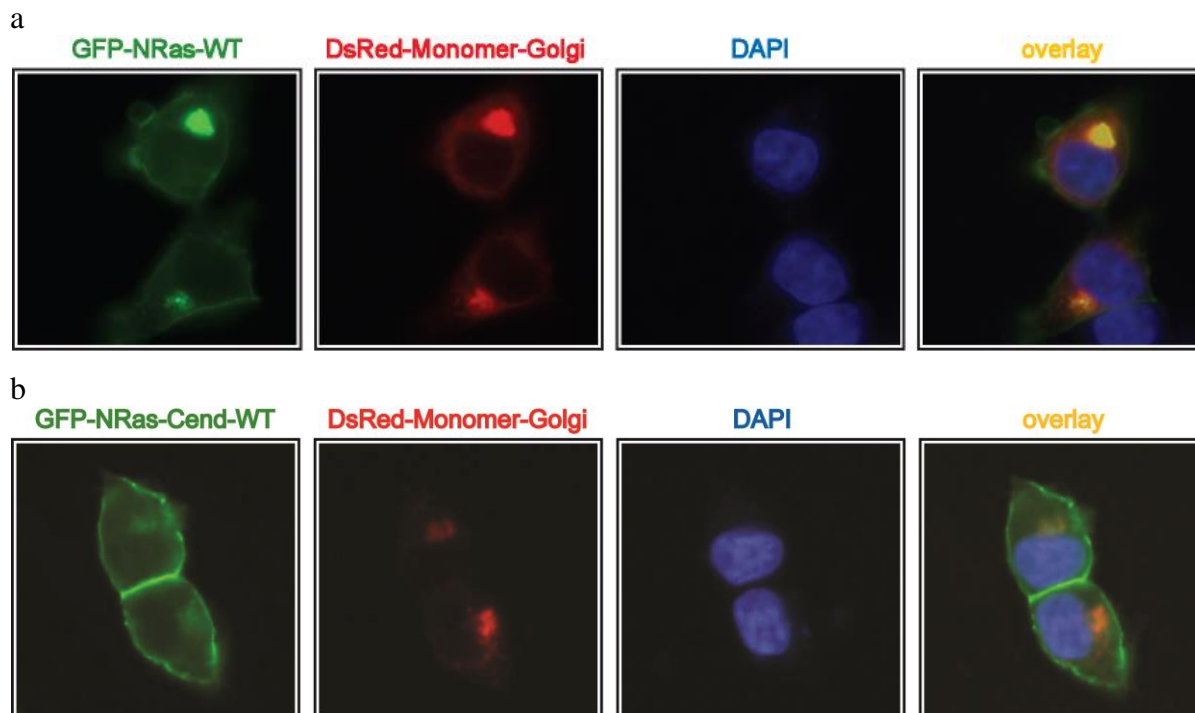


Obrázok 7 Lokalizácia GFP-K-Ras v MiaPaCa-2 bunkách

(a) Expresia GFP alebo GFP-K-Ras v bunkách bez prítomnosti statínu farbených faloidínom (TRITC konjugát) pre vizualizáciu F-aktínu, ktorý sa lokalizuje predovšetkým na plazmatickej membráne. (b) Vplyv statínov ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 24 hodín) na lokalizáciu GFP-K-Ras. GFP – zelený fluorescenčný proteín.

Všetky študované statíny okrem pravastatínu spôsobovali akumuláciu GFP-K-Ras proteínu v cytoplazme, zabráňovali ich dominantnej akumulácii na plazmatickej membráne. Preto by vplyv statínov na úplnú a správnu posttranslačnú modifikáciu najmä Ras proteínov s aktivačnou mutáciou, ktoré sú v neustále aktivovanom stave, mohol byť vysvetlením kancero-protéktívnych účinkov statínov. Pre takýto záver a následnú možnú aplikáciu statínov do liečebnej praxe v úlohe chemoadjuvantov je však potrebné poznať okrem presných mechanizmov účinku statínov, dnes už na úrovni jednotlivých signálnych dráh, aj vplyv nesprávnej posttranslačnej modifikácie na intracelulárny transport Ras proteínov, a tým aj na ich zapájanie sa do rôznych signálnych dráh (súvisiacich nie len s nádorovým rastom) v rôznej miere a rôznym spôsobom.

Pripravili sme preto konštrukty nesúce gény pre proteín N-Ras, resp. iba pre jeho C-koniec, v oboch prípadoch s mutáciami, ktoré simulovali inhibíciu farnezylácie, resp. palmitoylácie. Lokalizáciu produktov pripravených konštruktov sme sledovali v bunkách kotransfekovaných súčasne plazmidmi, ktorých produkty slúžia ako fluorescenčné markery Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula (obrázok 8).

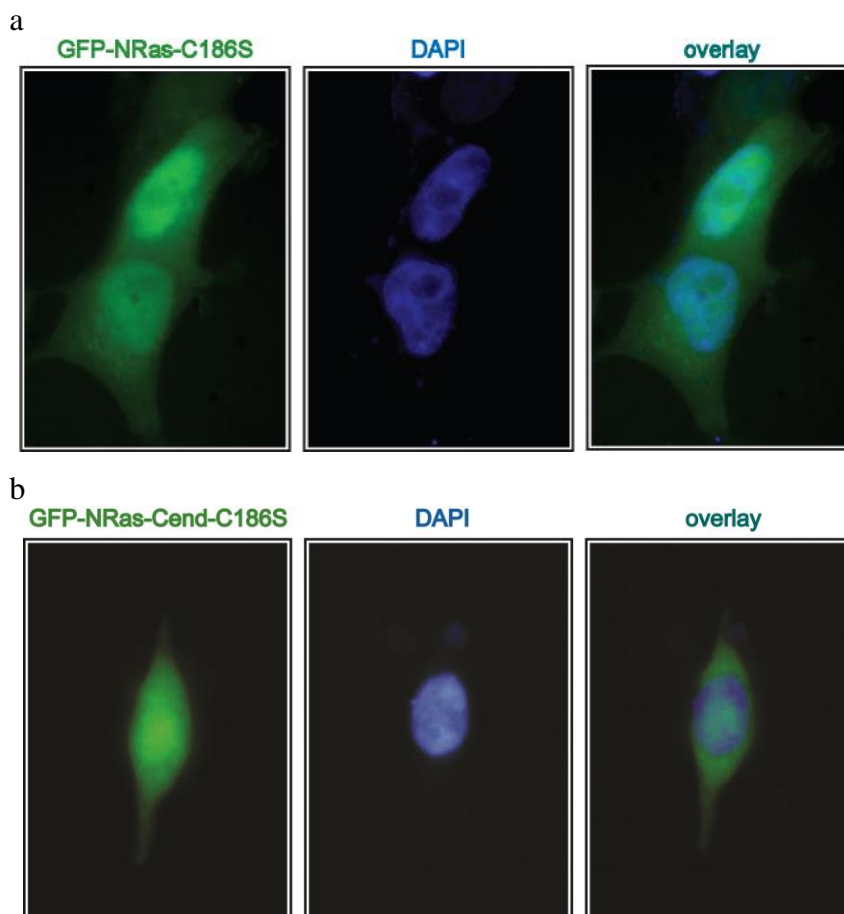


Obrázok 8 Lokalizácia GFP-N-Ras-WT proteínu a jeho C-konca v bunke

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasWT konštruktom a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (marker Golgiho aparátu), b) pEGFPNrasCendWT konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (Golgi marker). Jadrá sú farbené s DAPI.

Prítomnosť proteínu GFP-N-Ras-WT (obrázok 8a) na plazmatickej membráne je v súlade s ďalšími publikovanými údajmi (Choy, E. a spol., 1999), avšak Golgi je jediná intracelulárna membrána, kde bola akumulácia GFP-N-Ras-WT proteínu pozorovaná. V prípade GFP-N-Ras-Cend-WT proteínu (obrázok 8b), je nahromadených viac proteínov na plazmatickej membráne ako v Golgiho aparáte. To naznačuje, že hypervariabilná oblasť nie je jediná doména proteínu GFP-N-Ras, ktorá je zodpovedná za jeho intracelulárne cielenie, ale nie je jasné, či tento jav je výsledkom akumulácie GFP-N-Ras-Cend-WT na plazmatickej membráne alebo skôr výsledkom jeho uľahčeného uvoľnenia z Golgiho aparátu.

Z obrázkov 8 a 9 vyplýva, že farnezylácia je nevyhnutná pre cielenie na plazmatickú membránu alebo intracelulárne membrány proteínov GFP-N-Ras aj GFP-N-Ras-C-end. Okrem toho je lokalizácia oboch proteínov s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnezylácie (GFP-N-Ras-C186S a GFP-N-Ras-Cend-C186S) rovnaká, a je v súlade s lokalizáciou značeného proteínu GFP-K-Ras v bunkách ošetrovaných statínmi, ktoré inhibujú mevalonátovú dráhu, a teda aj syntézu farnezylopyrofosfátu potrebného pre farnezyláciu nie len Ras proteínov, t.j. v cytoplazme (obrázok 9).

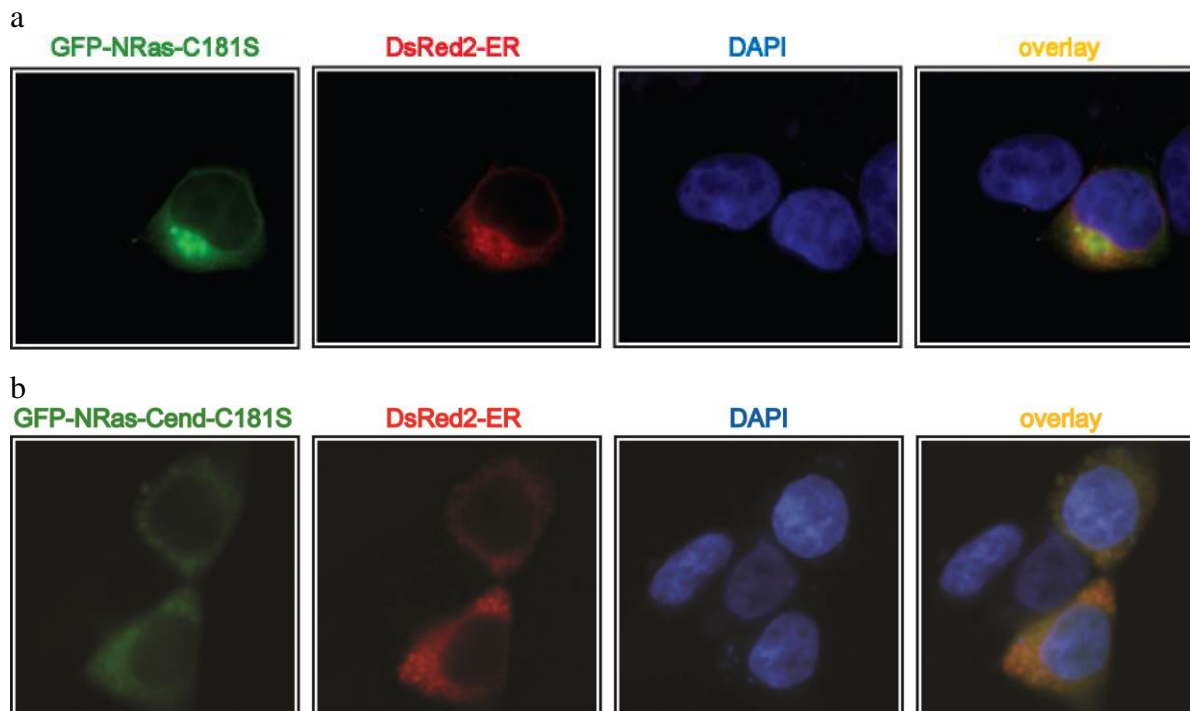


Obrázok 9 Lokalizácia GFP-N-Ras-C186S proteínu a jeho C-konca v bunke

HEK 293T bunky tranzientne transfekované a) pEGFPNrasC186S konštruktom (simulácia inhibície farnezylácie) b) pEGFPNrasCendC186S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnezylácie značená zeleným fluorescenčným proteínom). Jadrá sú farbené DAPI.

Obrázok 10 naznačuje, že palmitoylácia cysteínu v pozícii 181 je potrebná predovšetkým ako signál pre odchod proteínu GFP-N-Ras z endoplazmatického retikula. Lokalizácia proteínov GFP-N-Ras-C181S a GFP-N-Ras-Cend-C181S v bunke je rovnaká, nie sú lokalizované na plazmatickej membráne a hromadia sa na endoplazmatickom retikule.

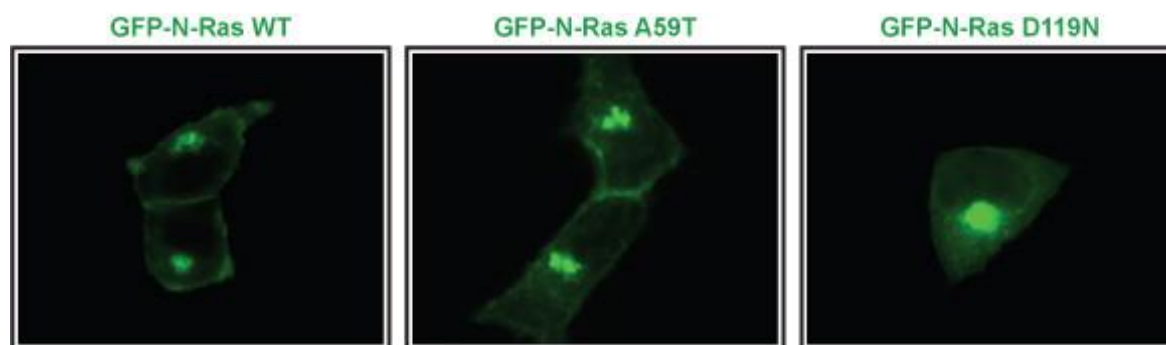
Pre potreby sledovania vplyvu aktivačnej mutácie na lokalizáciu Ras proteínov v bunke sme pripravili aj konštrukty nesúce gény pre GFP-N-Ras proteín s mutáciou simulujúcou neustále GTP resp. GDP viažuci stav.



Obrázok 10 Lokalizácia GFP-N-Ras-C181S proteínu a jeho C-konca v bunke

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasC181S konštruktom (simulácia inhibície palmitoylácie) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula), b) pEGFPNrasC181S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu palmitoylácie značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula). Jadrá sú farbené s DAPI.

Obrázok 11 demonštruje, že lokalizácia GTP-viažucej formy proteínu N-Ras (GFP-N-Ras A59T) je rovnaká ako lokalizácia divokého typu N-Ras proteínu (GFP-N-Ras WT), ktorý cirkuluje medzi GTP-viažucim a GDP-viažucim stavom. Mutácia simulujúca GDP-viažuci stav spôsobila úbytok proteínu na membráne a zvýšenú akumuláciu na Golgihom aparáte.



Obrázok 11 Vplyv GTP/GDP-viazaného stavu na lokalizáciu proteínu GFP-N-Ras

Bunky HEK 293T tranzientne transfekované s pEGFPNrasWT, pEGFPNrasA59T (GTP-viažuca forma proteínu N-Ras) alebo pEGFPNrasD119N (mutant neschopný viazať GTP).

2.4.5 Vplyv medziproduktov mevalonátovej dráhy na účinok statínov

Je všeobecne známe, že statíny majú hypolipidemický účinok, že cholesterol je nepostrádateľný pre normálne fungovanie bunky, a že jeho nedostatok môže mať pre bunku fatálne následky. Naše výsledky však navyše naznačovali, že protinádorové účinky statínov pozorované v mnohých štúdiách sú spôsobené nedostatkom medziproduktov mevalonátovej dráhy izoprénovej povahy, nakoľko ovplyvňujú expresiu génov, ktorých produkty sú zahrnuté v mnohých vnútrobunkových dejoch. Aby sme potvrdili, že protinádorový účinok statínov nesúvisí s nedostatkom cholesterolu, ale s nedostatkom izoprénových medziproduktov mevalonátovej dráhy, sledovali sme vplyv mevalonátu, farnezylypyrofosfátu a geranylgeranylpyrofosfátu podaných súčasne so statínmi, na bunkovú proliferáciu (tabuľka 3), lokalizáciu proteínu GFP-K-Ras v bunke (obrázok 12) a génovú expresiu (tabuľky 4 a 5).

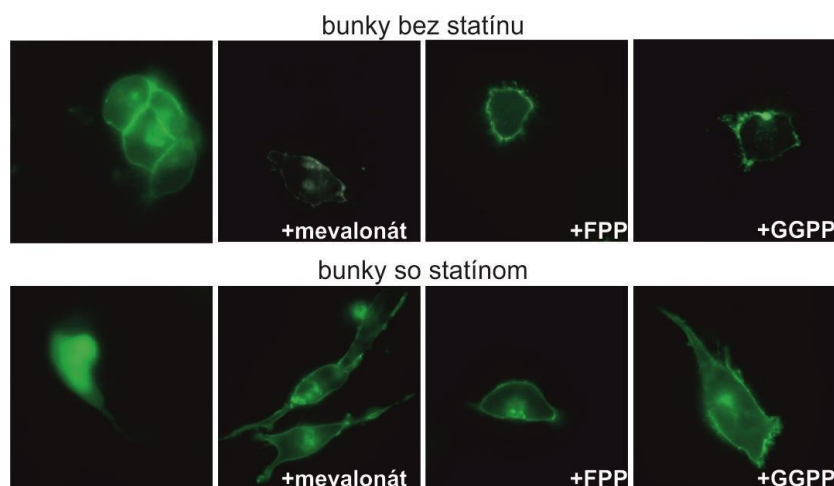
Tabuľka 3 Vplyv mevalonátu, FPP a GGPP na antiproliferačný efekt statínov

	% počtu kontrolných buniek		
	CAPAN-2	MiaPaCa-2	BxPc-3
Mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	76	-	-
Mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	98	92	81
FPP	103	-	-
GGPP	133	-	-
Pravastatín	88	91	88
Pravastatín + mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	91	-	-
Pravastatín + mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	98	112	87
Pravastatín + FPP	90	-	-
Pravastatín + GGPP	115	-	-
Atorvastatín	1	0	8
Atorvastatín + mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	23	-	-
Atorvastatín + mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	91	71	79
Atorvastatín + FPP	59	-	-
Atorvastatín + GGPP	76	-	-
Fluvastatín	3	0	6
Fluvastatín + mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	55	-	-
Fluvastatín + mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	105	99	67
Fluvastatín + FPP	41	-	-
Fluvastatín + GGPP	62	-	-
Lovastatín	6	2	9
Lovastatín + mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	32	-	-
Lovastatín + mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	86	93	90
Lovastatín + FPP	56	-	-
Lovastatín + GGPP	79	-	-
Simvastatín	0	0	5
Simvastatín + mevalonát 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	10	-	-
Simvastatín + mevalonát 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	78	84	85
Simvastatín + FPP	29	-	-
Simvastatín + GGPP	75	-	-

Bunky kultivované v prítomnosti testovaných látok 72 hodín, koncentrácia statínov – 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, FPP a GGPP 17 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, FPP – farnezylypyrofosfát, GGPP – geranylgeranylpyrofosfát.

Prídavok intermediátov mevalonátovej dráhy významne znížil antiproliferačný efekt všetkých testovaných statínov (tabuľka 3), čo podporilo našu hypotézu. V prípade mevalonátu bol antiproliferačný účinok statínov úplne eliminovaný, len ak bol mevalonát pridaný v koncentrácii 20-krát prevyšujúcej koncentráciu statínu (tabuľka 3). Ekvimolárne koncentrácie mevalonátu, FPP a GGPP efekt statínov len čiastočne zoslabili (tabuľka 3).

Všetky testované medziprodukty mevalonátovej dráhy významne eliminovali statínmi navodenú delokalizáciu proteínu GFP-K-Ras v cytoplazme. Mevalonát v koncentrácii $600 \mu\text{mol.l}^{-1}$ obnovil lokalizáciu proteínu na plazmatickej membráne úplne, zatiaľ čo FPP a GGPP v koncentrácii $17 \mu\text{mol.l}^{-1}$ len čiastočne (obrázok 12). Nepozorovali sme však rozdiel v efekte FPP a GGPP, hoci proteín K-Ras je posttranslačne upravovaný farnezyláciou. Z literatúry je však známe, že v prípade nedostatku FPP je proteín K-Ras alternatívne geranylgeranylovaný (Whyte, D.B. a spol., 1997).



Obrázok 12 Vplyv mevalonátu, FPP a GGPP na statínmi vyvolanú delokalizáciu GFP-K-Ras

Bunky MiaPaCa-2 tranzientne exprimujúce proteín GFP-K-Ras vystavené 24 hodín statínu ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) v kombinácii s mevalonátom ($600 \mu\text{mol.l}^{-1}$), FPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo GGPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kontrola sú bunky MiaPaCa-2 ošetrené len statínom.

Nakoniec sme sledovali vplyv FPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a GGPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$) na zmeny géovej expresie MiaPaCa-2 buniek vyvolaných účinkom simvastatínu ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Látky sme nechali pôsobiť 24 hodín. Pozorovania sú zhrnuté v tabuľkách 4 a 5.

Gény, ktorých expresia bola najvýraznejšie ovplyvnená vplyvom FPP, sú z veľkej časti totožné s génmi ovplyvnenými simvastatínom, ich počet bol však nižší a zmena expresie menej významná. Profil géovej expresie buniek ošetrených súčasným podaním simvastatínu a FPP sa podobal profilu géovej expresie kontrolných neovplyvnených buniek. GGPP sám géovú expresiu buniek MiaPaCa-2 neovplyvnil (tabuľka 4). Súčasné pridanie GGPP a simvastatínu eliminovalo takmer všetky zmeny expresie génov spôsobené výlučne

simvastatínom. Iba 3 gény zostali exprimované vo vyššej miere, avšak významnosť upregulácie sa znížila.

Tabuľka 4 Vplyv FPP a GGPP na zmeny génovej expresie vyvolanej simvastatínom

	Počet génov s expresiou		
	zvýšenou	zníženou	zmenenou
Simvastatín	127	74	201
Simvastatín + FPP	0	0	0
Simvastatín + GGPP	5	0	5
FPP	56	14	70
GGPP	0	0	0

Bunky MiaPaCa-2 vystavené simvastatínu ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$), FPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a GGPP ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Za významne ovplyvnené boli považované zmeny génovej expresie s $FC > 2.0$ alebo < 0.5 a $FDR < 0.05$ (FC – fold change, FDR – false discovery rate, FPP – farnesylpyrofosfát, GGPP – geranylgeranylpyrofosfát).

Zo všetkých metabolických dráh významne ovplyvnených simvastatínom bola účinkom FPP zmenená expresia veľkého počtu génov, ktorých produkty sa podieľajú na replikácii DNA, regulácii bunkového cyklu a oprave poškodení DNA (tabuľka 5). GGPP sám významne neovplyvnil žiadne metabolické dráhy. Pri simultánnom podaní simvastatínu a FPP alebo GGPP zostali významne ovplyvnené iba 3 metabolické dráhy, a to DNA replikácia, bunkový cyklus a oxidačná fosforylácia.

Tabuľka 5 Vplyv FPP a GGPP na zmeny génovej expresie v dejoch a dráhach vyvolané simvastatínom

Dej	FDR				
	simvastatín	FPP	simvastatín+FPP	GGPP	simvastatín+GGPP
Replikácia DNA	$< 10^{-38}$	$< 10^{-11}$	$< 10^{-13}$	-	$< 10^{-04}$
Bunkový cyklus	$< 10^{-23}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-09}$	-	$< 10^{-05}$
Ribozómy	$< 10^{-12}$	0	0	0	0
Korekcia párovania báz	$< 10^{-12}$	$< 10^{-04}$	-	-	-
Biosyntéza steroidov	$< 10^{-09}$	-	-	-	-
Homologická rekombinácia	$< 10^{-07}$	-	-	-	-
Signálna dráha MAPK	$< 10^{-06}$	-	-	-	-
Metabolizmus pyrimidínu	$< 10^{-05}$	-	-	-	-
Endocytóza	$< 10^{-04}$	-	-	-	-
Oxidačná fosforylácia	-	$< 10^{-06}$	$< 10^{-04}$	-	$< 10^{-07}$

Bunky MiaPaCa-2 vystavené simvastatínu ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$), FPP ($17 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a GGPP ($12 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Za významne ovplyvnené boli považované dráhy s $FDR < 0.001$ (FDR – false discovery rate, FPP – farnesylpyrofosfát, GGPP – geranylgeranylpyrofosfát, MAPK – kináza mitogénom aktivovaného proteínu).

Interpretácia získaných výsledkov a záver

Preukázali sme antiproliferačný účinok všetkých statínov *in vitro* na bunkových líniách odvodených od adenokarcinómu pankreasu (MiaPaCa-2, BxPc-3 a CAPAN-2), ktoré sa líšili stupňom diferenciácie a obsahom aktivačnej mutácie v géne pre proteín K-Ras. Práve bunky s aktivačnou mutáciou v géne *K-ras* boli k antiproliferačnému účinku citlivejšie. Najúčinnějšími statínmi boli cerivastatín a simvastatín. Vo všeobecnosti boli lipofilné statíny účinnejšie ako hydrofilné (rosuvastatín, pravastatín), čo súvisí s množstvom statínov, ktoré sa dostali do buniek. *In vitro* výsledky korelovali s výsledkami *in vivo*.

Výsledky celogenómovej analýzy buniek MiaPaCa-2 vystavených účinku jednotlivých statínov korelovali s antiproliferačnými účinkami jednotlivých statínov, ktoré sú následkom zásahu statínov do replikácie DNA, bunkového cyklu a aktínového cytoskeletu. Súčasne sme aj na úrovni DNA potvrdili významný vplyv statínov na mevalonátovú dráhu a Kennedyho dráhu, ktorá zohráva úlohu v syntéze lipidových kvapôčok. K najvýznamnejšie ovplyvneným génom patrili gén kódujúci proteín K-Ras, jeho expresia bola významne zvýšená.

Všetky statíny, okrem pravastatínu, spôsobovali akumuláciu tranzientne exprimovaného proteínu GFP-K-Ras v cytoplazme. Tento jav môže byť vysvetlením zvýšenej expresie génu *K-ras* pozorovanej mikročipovou analýzou. Ak sa vplyvom statínov K-Ras proteín akumuluje v cytoplazme, a nie na plazmatickej membráne a iných membránach, odkiaľ by mal signalizovať, situácia je vyhodnotená ako neprítomnosť proteínu K-Ras a následne dochádza k ďalšej expresii génu *K-ras*.

Súčasným ošetrením MiaPaCa-2 buniek statínmi a intermediátmi mevalonátovej dráhy (mevalonát, FPP a GGPP) sme dosiahli elimináciu vplyvu statínov na proliferáciu buniek, na zmeny v génovej expresii i na lokalizáciu proteínu GFP-K-Ras v bunkách. To znamená, že proliferácia nádorových buniek odvodených od adenokarcinómu pankreasu je inhibovaná predovšetkým nedostatkom medziproduktov mevalonátovej dráhy. V prípade posttranslačnej modifikácie proteínu K-Ras sme pozorovali, že môže byť v prípade nedostatku FPP nahradený GGPP.

Vďaka príprave konštruktov, ktorých produktami boli proteíny N-Ras fúzované s GFP simulujúce postupne inhibíciu farnezylácie a palmitoylácie, prípadne len ich s GFP fúzované C-konce, sme mohli sledovať vplyv nesprávnej posttranslačnej modifikácie na lokalizáciu proteínov v bunke. Okrem potvrdenia, že bez predchádzajúcej prenylácie sa proteín Ras v membráne neukotví, sme pozorovali aj to, že hypervariabilná oblasť proteínov Ras nie je jediná oblasť zodpovedná za ich lokalizáciu v bunke. Prípravou a použitím konštruktov,

ktorých produkty simulovali GFP-N-Ras proteín v neustále GTP-viažucom stave a proteín neschopný viazať GTP, sme pozorovali, že väzba s GTP je pre GFP-N-Ras proteín nevyhnutná pre väzbu a cytoplazmatickej membráne, zatiaľ čo pre väzbu s Golgiho aparátom nevyhnutná nie je. Objasnili sme tak vplyv nesprávnej posttranslačnej modifikácie Ras proteínov na ich vnútrobunkový transport a poukázali sme na to, že oblasť viažuca nukleotidfosfáty prispieva k intracelulárnej lokalizácii GFP-N-Ras proteínu podobne ako hypervariabilná oblasť. Preto sa statínmi sprostredkovaná inhibícia farnezylácie proteínu K-Ras s aktivačnou mutáciou sa zdá byť sľubným podporným prístupom k modifikácii bunkovej proliferácie v nádoroch pankreasu a v nádorových tkanivách vôbec.

Myšlienka ďalšieho zaujímavého prístupu vznikla na konferencii v talianskych Benátkach (Global Conference on Cancer Research and Therapy, 2018), kde profesor Hiroshi Kobayashi z Chiba Univerzity v Japonsku predniesol výsledky pozorovania vplyvu nielen statínov na proliferáciu rôznych typov buniek pri rôznom pH. Na základe toho rozdelil látky na tie, ktorých účinky od pH závisia a tie, ktorých účinky sú rovnaké bez ohľadu na hodnotu pH. Z komerčne dostupných statínov boli do štúdie zahrnuté simvastatín a lovastatín, ktorých hodnoty IC_{50} sa so znížením pH (z hodnoty 7,5 – 7,7 na 6,7 – 6,8) o rád znížili. V súvislosti s lokálne zníženým pH v tkanivách niektorých nádorov sa ukazuje ďalší dôvod využitia statínov v chemoadjuvantnej terapii v špecifických prípadoch nádorov.

Výsledky našich experimentov zameraných na štúdium protinádorových účinkov statínov boli prezentované na 31. kongrese FEBS v Istanbule v Turecku (2006), na XX. Biochemickom zjazde v Piešťanoch na Slovensku (2006), na konferencii Targeting the Kinome v Bazileji vo Švajčiarsku (2006), na konferencii Synthetic and Natural Compounds in Cancer Therapy and Prevention v Bratislave na Slovensku (2007), na konferencii Cancer Therapeutics: The Road Ahead na Capri v Taliansku (2007), na konferencii 2nd Annual International Conference on Health & Medical Sciences, v Aténach v Grécku (2014), na 4. kongrese EUSTM v Prahe v Českej republike (2016), na 297th International Conference on Recent Advances in Medical and Health Sciences v Prahe v Českej republike (2017), na Global Conference on Cancer Research & Therapy, v Benátkach v Taliansku (2018) a na 25. ISCOM sympóziu v Ľubláne v Slovinsku. Výsledky boli publikované:

Gbelcová, H., Leníček, M., Zelenka, J., Knejzlík, Z., Dvořáková, G., Zadinová, M., Poučková, P., Kudla, M., Balaž, P., Ruml, T., Vitek, L.: Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. In: International Journal of Cancer. - Vol. 122, No. 6 (2008), s. 1214-1221. - ISSN 0020-7136.

Gbelcová, H., Rimpelová, S., Ruml, T., Fenclová, M., Kosek, V., Hajšlová, J., Strnad, H., Kolář, M., Vítek, L.: Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer. In: Scientific Reports [elektronický zdroj]. - Vol. 7 (2017), Art. No. 44219 [11 s.] [online]. - ISSN 2045-2322.

Gbelcová, H., Rimpelová, S., Knejzlík, Z., Sachová, J., Kolář, M., Strnad, H., Repiská, V., D'Acunto, W.C., Ruml, T., Vítek, L.: Isoprenoids responsible for protein prenylation modulate the biological effects of statins on pancreatic cancer cells. In: Lipids in Health and Disease [elektronický zdroj]. - Vol. 16 (2017), Art. No. 250 [10 s.] [online]. - ISSN 1476-511X.

Gbelcová, H., Leníček, M., Zelenka, J., Krechler, T., Knejzlík, Z., Dvořáková, G., Zadinová, M., Poučková, P., Ruml, T., Vítek, L.: Protinádorové účinky statinů na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu = Anticancer effect of statins on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma, In: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie. - Roč. 61, č. 2 (2007), s. 75-81. - ISSN 1213-323X

Gbelcová, H., Rimpelová, S., Knejzlík, Z., Repiská, V., Ruml, T., Böhmer, D.: Proteíny Ras: klíčové regulátory bunkového cyklu. In: Chemické listy. - Roč. 109, č. 5 (2015), s. 364-370. - ISSN 0009-2770.

Gbelcová, H., Repiská, V., Böhmer, D., Ruml, T., Knejzlík, Z.: Úloha hypervariabilnej oblasti Ras proteínov v ich vnútrobunkovom transporte. In: Čerpajme z minulosti, ktorá nás navedie na budúcnosť. – Bratislava: Proprint, 2015. - S. 126-134. - ISBN 978-80-89747-06-1

Režňáková, S., Rimpelová, S., Priščáková, P., Koňariková, K., Repiská, V., Czakó, L., Gbelcová, H.: Vplyv statínov na aktínový cytoskelet a bunkový cyklus pankreatických nádorových buniek. In: Biologicko-genetické aspekty nádorovej regeneračnej medicíny. - Martin : JLF UK, 2016. - S. 12-16. - ISBN 978-80-8187-021-7

Časť výsledkov pod mojím vedením namerala a do diplomovej práce s názvom „Sledování heterogenity pleiotropních účinků jednotlivých statínů na molekulární úrovni“ spracovala Bc. Anna Zavadřáková.

3 STATÍNY A REGENERAČNÁ MEDICÍNA

V ostatnom čase sa hromadia informácie o schopnosti statínov indukovať, ako aj inhibovať diferenciáciu kmeňových buniek. Terapia prostredníctvom kmeňových buniek sa v súčasnosti stáva alternatívou riešenia degeneratívnych i nádorových ochorení, ktoré nie je možné uspokojivo riešiť štandardnými postupmi. Zároveň však prináša riziko neorganizovaného rastu a delenia buniek, čo môže viesť k formovaniu nádoru. Jednou z možností eliminácie rizika je súčasná aplikácia statínov.

K najnovšie študovaným pleiotropným vlastnostiam statínov patrí ich schopnosť modulovať biologické charakteristiky a funkcie kmeňových buniek, čo má potenciálne využitie v regeneračnej medicíne. Napríklad pri liečbe akútneho infarktu myokardu je limitáciou pre použitie autológnych kmeňových buniek pokles počtu i funkcie kmeňových buniek pacientov s ischemickou chorobou srdca, *diabetes mellitus* a srdcovým zlyhaním (Vasa, M. a spol., 2001). Ďalším problémom je zhoršené prežívanie podaných kmeňových buniek v prostredí myokardu poškodeného infarktom, ktorý uvoľňuje cytotoxické faktory. Pôsobenie statínov na rôzne charakteristiky kmeňových buniek by mohlo viesť k zefektívneniu liečby kmeňovými bunkami pri súčasnom podávaní statínov (Xu, H. a spol., 2013). Historický vývoj úlohy statínov od látok schopných znížiť hladinu cholesterolu k látkam s protinádorovými a diferenciačnými účinkami veľmi prehľadne zmapovali Clendening a Penn (Clendening, J.W. a Penn, L.Z., 2012).

3.1 VPLYV STATÍNOV NA SAMOOBNOVOVANIE A DIFERENCIÁCIU KMEŇOVÝCH BUNIEK

Pre správny priebeh organogenézy je kľúčová presná regulácia pomeru samoobnovovania a diferenciácie kmeňových buniek, tkanivovej homeostázy a regenerácie. Zvýšenie tohto pomeru v prospech samoobnovovania vedie k degenerácii tkanív, naopak nadmerná proliferácia na úkor diferenciácie indukuje kancerogézu (Liu, J. a spol., 2010). Statíny môžu zvyšovať ako počet kmeňových buniek, tak aj ich schopnosť diferenciácie. Efekt statínov závisí od druhu kmeňových buniek (Assmus, B. a spol., 2003, Suzuki, G. a spol., 2009).

Cirkulujúce endoteliálne progenitorové bunky (EPC) odvodené z kostnej drene sa podieľajú na reendotelizácii poškodených ciev a neovaskularizácii ischemických tkanív. Predstavujú dôležitý reparačný mechanizmus, ktorým organizmus zaisťuje integritu endotelu. U pacientov s ischemickou chorobou srdca, *diabetes mellitus* a metabolickým syndrómom je

významne znížené množstvo cirkulujúcich EPC (Park, A. a spol., 2016, Vasa, M. a spol., 2001). Statíny inhibujú starnutie EPC a podporujú ich proliferáciu (Assmus, B. a spol., 2003). Spomalenie starnutia EPC spôsobuje statínmi sprostredkovaná modulácia proteínov bunkového cyklu, konkrétne upregulácia cyklínov a downregulácia inhibítora bunkového cyklu p27Kip1. Tento proces závisí od prítomnosti izoprenoidov (FPP a GGPP) (Assmus, B. a spol., 2003). Statíny môžu oddiaľovať starnutie kmeňových buniek aj redukciou tvorby voľných kyslíkových radikálov (Haendeler, J. a spol., 2004). Statíny ďalej zvyšujú diferenciáciu EPC z ľudských periférnych mononukleárných buniek a CD34-pozitívnych hematopoetických kmeňových buniek *in vitro* a podporujú diferenciáciu EPC na kardiomyocyty (Rupp, S. a spol., 2004).

Obzvlášť pozitívny vplyv majú statíny na proliferáciu **embryonálnych kmeňových buniek (ESC)**. Ich krátkodobá expozícia statínom neinhibuje rast karyotypovo normálnych ľudských ESC. Naproti tomu liečba statínmi inhibuje rast nádorových ESC a ESC s abnormálnym karyotypom. Táto inhibičná aktivita je sprostredkovaná zvýšením expresie apoptických génov. Statíny teda nemajú len protinádorové účinky, ale supresiou rastu a proliferácie abnormálnych ESC zároveň podporujú rast normálnych ESC *in vitro* (Gauthaman, K. a spol., 2009).

Existujú *in vitro* a *in vivo* dôkazy, že statíny potláčajú proliferačný potenciál a zároveň indukujú diferenciačný potenciál **mezenchymálnych kmeňových buniek (MSC)** (Baek, K.H. a spol., 2005, Kupcsik, L. a spol., 2009). Simvastatín indukuje diferenciáciu MSC na osteoblasty a zároveň inhibuje diferenciáciu MSC na adipocyty (Li, X. a spol., 2011). Pôsobením statínov dochádza k zmene morfológie MSC, z vretenovitého tvaru sa menia na veľké sploštené bunky s rozšírenou cytoplazmatickou oblasťou. Statínmi sprostredkovaná redukcia potenciálu MSC diferencovať sa na makrofágy inhibuje zápalové procesy a zvyšuje stabilitu aterosklerotických plátov pacientov s kardiovaskulárnymi chorobami. Statíny pôsobia aj priamo na existujúce makrofágy potlačením ich proliferačnej aktivity, prípadne indukciou apoptózy existujúcich makrofágov (Izadpanah, R. a spol., 2015). Opísané vplyvy statínov na MSC závisia od použitého statínu, použitého typu MSC, doby expozície a ďalších faktorov.

Nádorové kmeňové bunky (CSC) a nenádorové kmeňové bunky majú mnoho spoločných vlastností, ku ktorým patria samoobnovovací potenciál, vysoká proliferačná kapacita, vysoká telomerázová aktivita, vysoký pomer objemu jadra k objemu cytoplazmy, možnosť aktivácie rovnakých signálnych dráh. ESC a niektoré ľudské nádorové bunky využívajú rovnaké vzory génovej expresie, ktoré sú v nenádorových somatických bunkách

potlačené (Budaj, M. a spol., 2012, Ilmer, M. a spol., 2014). Statíny inhibujú proliferáciu ESC supresiou ich génov kmeňovosti (Gauthaman, K. a spol., 2009), rovnako môžu suprimovať podobné gény kmeňovosti v CSC, a tým ovplyvňovať rast a metastázovanie nádorových buniek (Xu, H. a spol., 2013).

3.2 VPLYV STATÍNOV NA MOBILIZÁCIU KMEŇOVÝCH BUNIEK

Statíny majú vplyv na mobilizáciu EPC a uľahčujú ich transport do miest cievneho poškodenia, ich diferenciáciu na epitelové bunky, a tak zlepšujú reendotelizáciu a neovaskularizáciu (Walter, D.H. a spol., 2002, Schroeter, M.R. a spol., 2009). Vplyv statínov na mobilizáciu EPC bol potvrdený aj v klinických štúdiách. Liečba statínmi zvyšuje mobilizáciu buniek CD34+ po akútnom infarkte myokardu (Leone, A.M. a spol., 2008), zlepšuje opravu endoteliálneho poškodenia a obmedzuje progresiu aterosklerotických zmien rizikových pacientov. Zaujímavé výsledky priniesla randomizovaná štúdia, počas ktorej porovnávali efekt intenzívnej a štandardnej dávky statínov na mobilizáciu EPC pacientov po úspešnej perkutánnej koronárnej intervencii. Počet EPC pri prijatí a pri prepustení pacienta bol v oboch skupinách podobný, ale v intenzívne liečenej skupine pacientov bol počet EPC významne vyšší v priebehu sledovania po liečbe. Intenzívna statínová liečba v porovnaní so štandardnou terapiou mobilizuje EPC účinnejšie (Leone, A.M. a spol., 2008). V prípade pacientov s chronickým kardiálnym zlyhávaním viedla liečba rosuvastatínom v dávke 40 mg denne k zvýšeniu hladín cirkulujúceho vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora, zvýšeniu počtu kmeňových buniek v periférnej krvi a zvýšenej schopnosti kmeňových buniek integrovať sa do endoteliálnych štruktúr *in vitro*, spojenej s vyššou vaskularizáciou v biopsiách kostrových svalov (Erbs, S. a spol., 2011).

3.3 VYUŽITIE STATÍNOV V REGENERAČNEJ MEDICÍNE

3.3.1 Statíny a pacienti po akútnom infarkte myokardu

Kombinovaná liečba statínmi a MSCs významne znižuje apoptózu kardiomyocytov, redukuje oxidačný stres a potláča expresiu génov kódujúcich zápalové cytokíny v myokarde po akútnom infarkte. To vedie k zvýšenému prežívaniu MSCs, výraznejšiemu funkčnému zlepšeniu myokardu a zvýšenej kardiovaskulárnej diferenciácii transplantovaných kmeňových buniek. Podávanie statínov preukázateľne vedie k vytvoreniu lepšieho prostredia pre prežívanie a diferenciáciu implantovaných kmeňových buniek (Yang, Y.J. a spol., 2009).

3.3.2 Vplyv statínov na osteogenézu a odontogenézu

Dospelé mezenchymálne kmeňové bunky boli okrem množstva iných tkanív identifikované aj vo viacerých tkanivách ústnej dutiny a v maxilofaciálnych tkanivách ako sú orofaciálna kosť, zubná dreň, periodontálne väzivo, zubné folikuly, slinné žľazy a iné (Egusa, H. a spol., 2012). Resorpcia kostí v oblasti chýbajúceho zubu vo veľkej miere sťažuje jeho nahradenie dentálnymi implantátmi (Darby, I. a spol., 2008), preto kmeňové bunky a tkanivové inžinierstvo predstavujú nové možnosti v regenerácii defektov alveolárnych kostí, periodontálnych a zubných tkanív (Izumi, Y. a spol., 2011, Oshima a spol., 2011, Ikeda, E. a spol., 2009). V odbornej literatúre je podrobnejšie opísaná najmä izolácia kmeňových buniek zo zubnej drene, ako aj ich charakteristika (Suchanek, J. a spol., 2013, Gioventu, S. a spol., 2012, Kawashima, N., 2012, Sloan, A.J. a Waddington, R.J., 2009, Gronthos, S. a spol., 2002), ovplyvnenie diferenciácie a možnosti ich využitia v regeneratívnej medicíne (Wang, X. a spol., 2012, Suzuki, T. a spol., 2011, Zhang, W. a spol., 2006). Regeneráciou mandibulárnej kosti u pacientov pomocou kmeňových buniek kostnej drene bola dokázaná ich schopnosť obnoviť tkanivá a orgány (d'Aquino, R. a spol., 2009).

Pomerne dobre dostupný zdroj kmeňových buniek predstavujú kmeňové bunky zubných folikulov (Huang, G.T. a spol., 2009). Dentálny folikul je vak, ktorý obsahuje vyvíjajúci sa zub. Kmeňové bunky dentálneho folikulu exprimujú množstvo markerov (CD44, CD73, CD90 a CD105) typických pre kmeňové bunky a majú schopnosť diferencovať sa na rozličné typy buniek mezenchymálnych tkanív (Mori, G. a spol., 2012). V literatúre je opísaná najmä ich schopnosť regenerovať periodontálne tkanivá (Park, B.W. a spol., 2012, Yao, S. a spol., 2008) a ich účasť na obnove dentínu (Guo, W. a spol., 2009). Kmeňové bunky dentálnych folikulov sú taktiež schopné diferenciácie na adipocyty, neuróny (Robin, N.C. a spol., 2013, Yao, S. a spol., 2008) a osteoblasty (Rezai Rad, M. a spol., 2015, Yao, S. a spol., 2013, Mori, G. a spol., 2012).

V tejto súvislosti mnohé práce opisujú pôsobenie statínov na osteogénnu a chondrogénnu diferenciáciu mezenchymálnych kmeňových buniek, u ktorých môžu spúšťať senescenciu a apoptózu. Po ich pôsobení bola zaznamenaná zvýšená regulácia génov *p16*, *p53*, *kaspáz -3*, *-8* a *-9*, naopak znížená hladina DNA reparačných génov *XRCC4*, *XRCC6* a *Apex1* (Izadpanah, R. a spol., 2015). Ďalšie práce potvrdzujú indukciu osteogenézy pôsobením simvastatínu na mezenchymálne kmeňové bunky zvýšením organizácie aktínových filamentov a bunkovej rigidity (Tai, I.C. a spol., 2015) a stimulovanie regenerácie kostného tkaniva (Huang, X. a spol., 2014). Kmeňové bunky dentálnych folikulov exprimujú

vo zvýšenej miere DMP1 (angl. *dentin matrix protein 1*), ktorý zohráva významnú úlohu v ich osteogénnej diferenciacii, je esenciálny pre maturáciu osteoblastov a mineralizáciu pevných tkanív. Zablokovaním jeho expresie sa výrazne zníži osteogenéza a osteogénna expresia génov kmeňových buniek zubných folikulov (Rezai Rad, M. a spol., 2015, Suzuki, S. a spol., 2012).

V súvislosti s využitím statínov v regeneračnej medicíne sa začal riešiť problém systémového podávania statínov, ktorý je obmedzený kvôli ich metabolizmu v pečeni a klírensu v zažívacom systéme. Aby sa predišlo nízkej účinnosti a častým vedľajším účinkom liečby vysokými dávkami statínov, začali sa objavovať štúdie zamerané na odbúrateľné nosiče statínov, resp. podávanie statínov systémom nanočastíc (Kim, T.H. a spol., 2018, Soares, D.G. a spol., 2018, Zijah, V. a spol., 2017).

3.4 VPLYV STATÍNOV NA KMEŇOVÉ BUNKY

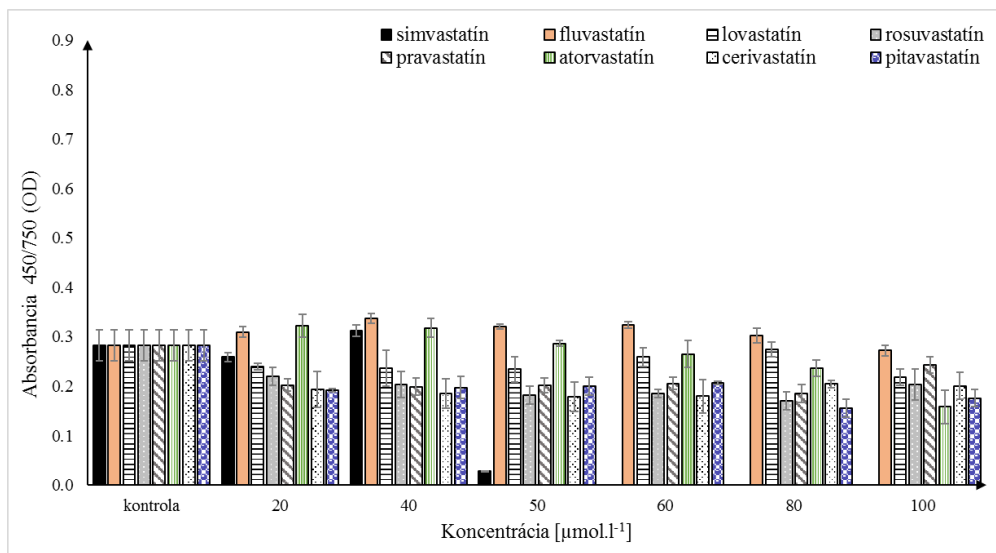
Ďalším typom buniek, ktoré sú vhodné pre regeneračnú terapiu najmä vďaka ľahkému prístupu ku tkanivu a jednoduchému izolačnému postupu (Valorani, M.G. a spol., 2012) sú mezenchýmové kmeňové bunky izolované z podkožného tukového tkaniva. Spoznanie mechanizmov transformácie kmeňových buniek na nádorové, ako aj mechanizmov inhibície bunkovej proliferácie prispieje k presnejšej regulácii riadenej diferenciácie čo, umožní zásahy vedúce k eliminácii prípadnej transformácie. Otázka účinku statínov na kmeňové bunky tukového tkaniva je viac než aktuálna aj z toho dôvodu, že veľa ľudí, ktorí statíny užívajú počas liečby hypercholesterolémie, trpí obezitou.

3.4.1 Vplyv statínov na rast kmeňových buniek tukového tkaniva

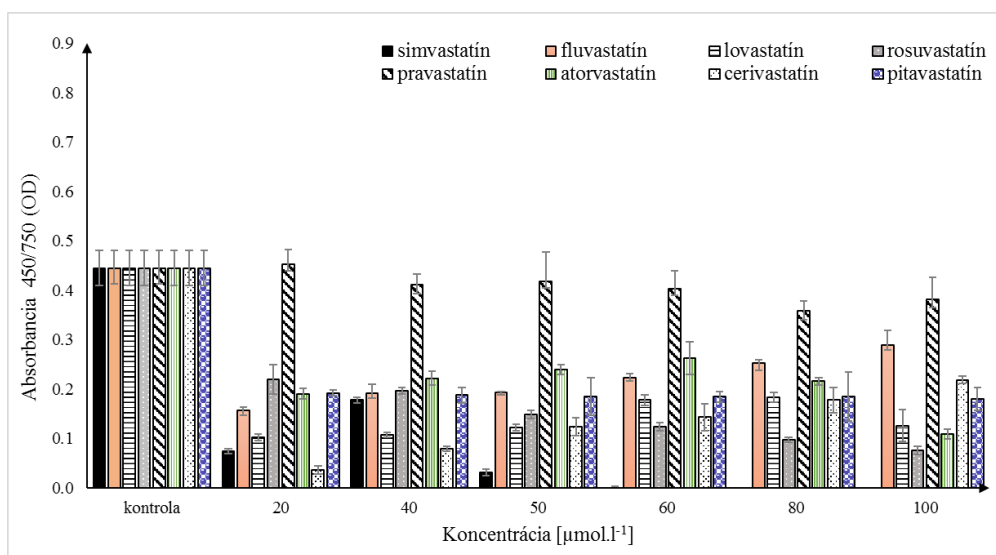
Od tukového tkaniva odvodené mezenchymálne kmeňové bunky (ATCC - PCS-500-011, ADMSC) sme kultivovali so všetkými komerčne dostupnými statínmi v konečnej koncentrácii 20, 40, 50, 60, 80 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. s metanolom (rozpúšťadlo), ktorý slúžil ako kontrola. Po 24, 48 a 72 hodinách kultivácie sme využitím komerčnej súpravy WST-1 stanovili množstvo buniek.

Výsledky pozorovania sú graficky spracované na obrázku 13. Žiadny zo statínov, okrem simvastatínu, po 24 hodinách pôsobenia významne neovplyvnil proliferáciu mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od tukového tkaniva. Hodnotu IC_{50} nebolo možné ani odhadnúť, nakoľko je vyššia ako 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, čo bola najvyššia testovaná koncentrácia. Simvastatín v koncentrácii 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ spôsobil po 24 hodinách zníženie množstva buniek viac ako o polovicu, čiže za hodnotu IC_{50} je možné považovať hodnotu nižšiu ako 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Vo vyšších testovaných koncentráciách s ohľadom na chybu merania spôsobil simvastatín smrť takmer všetkých buniek. Fluvastatín a atorvastatín mali do koncentrácie 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ mierne proliferáciu-indukujúci účinok. V prípade všetkých statínov, okrem pravastatínu, bol efekt statínov štatisticky významnejší po 48 a 72 hodinách. Efekt statínov s časom pôsobenia priamoúmerne stúpal. Zaujímavý je efekt pitavastatínu a čiastočne i atorvastatínu po 72 hodinách pôsobenia, kedy so vzrastajúcou koncentráciou vzrastá i metabolická aktivita buniek, čo naznačuje vznik rezistencie buniek.

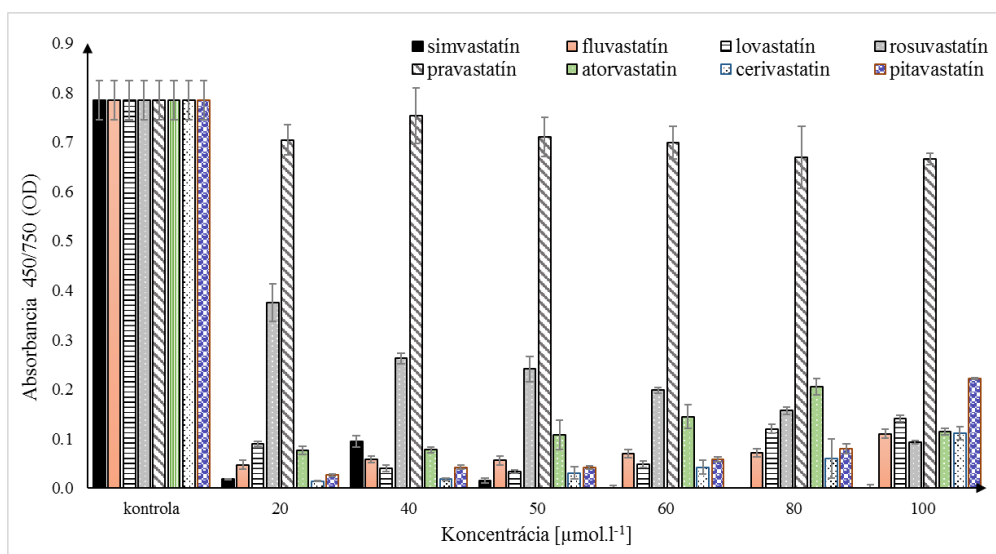
24 hodín



48 hodín



72 hodín



Obrázok 13 Vplyv statínov na proliferáciu mezenchymálnych kmeňových buniek odvedených z tukového tkaniva (pasáž 8) po 24, 48, 72 hodinách

3.4.2 Statíny a génová expresia kmeňových buniek tukového tkaniva

Keďže z nameraných údajov nebolo možné určiť hodnoty IC_{50} , a zároveň aby bola intenzita účinkov jednotlivých statínov na nádorové bunky pankreasu a kmeňové bunky porovnateľná, rozhodli sme sa na ďalšie experimenty použiť koncentráciu $12 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Vplyv statínov na expresiu génov po 24 hodinách pôsobenia na ADMSC sme sledovali pomocou transkripčnej mikročipovej komerčnej súpravy AFFIMETRIX – Clariom™ S Assay (20000 génov, viac ako 50000 transkriptov). Bioštatistická analýza bola realizovaná pod vedením RNDr. Michala Kolára v rámci spolupráce s Ústavom molekulárnej genetiky AK ČR. Na detekciu odlišne exprimovaných transkriptov bol použitý t-test. Za indikátory významnej zmeny transkripcie génu bola považovaná hodnota *q-value* menšia ako 0,05 a minimálne dvojnásobná zmena v expresii. GSEA (*Gene set enrichment analysis*) bola realizovaná použitím Fisherovho exaktného testu aplikovaného na skupiny génov definovaných KEGG dráhami (KEGG) a Gene Ontology (GO). Iba tie KEGG dráhy (resp. GO termy) s hodnotou GSEA *p-value* < 0,001 boli vyhodnotené ako štatisticky významné.

Metanol, ako rozpúšťadlo, nemal v danom množstve vplyv na transkripciu, transkripčný profil bol rovnaký ako u kontroly. Podobne aj pravastatín vykazoval rovnaký transkripčný profil ako kontrola, bol neúčinný. Ostatné statíny významne menili transkripčný profil, z nich významne odlišný (slabší) efekt mal len rosuvastatín. Počet transkriptov so štatisticky významne zmenenou mierou transkripcie je v tabuľke 6, statínmi štatisticky najvýznamnejšie ovplyvnené bunkové deje (podľa KEGG) sú v tabuľke 7.

Tabuľka 6 Počet transkriptov so štatisticky významne zmenenou transkripciou vplyvom statínov

	Koncentrácia statínov $12 \mu\text{mol.l}^{-1}$		
	Transkripty so zvýšenou expresiou (počet)	Transkripty so zníženou expresiou (počet)	Transkripty so zmenenou expresiou (počet)
Simvastatín	478	1440	1918
Fluvastatín	504	1267	1771
Cerivastatín	449	1270	1719
Pitavastatín	468	1238	1706
Lovastatín	480	1090	1570
Atorvastatín	412	1141	1553
Rosuvastatín	230	955	1185
Pravastatín	0	0	0

Za štatisticky významné zmeny expresie boli považované zmeny s $|\log\text{FC}| > 1$ a $q < 0,05$ (FC – *fold change*)

Tabuľka 7 Statínmi najvýznamnejšie ovplyvnené bunkové deje

Dej	Simva-	Fluva-	Ceriva-	Pitava-	Lova-	Atorva-	Rosuva-
	p-value						
Bunkový cyklus	$< 10^{-17}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-17}$	$< 10^{-15}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-17}$	$< 10^{-19}$
Replikácia DNA	$< 10^{-14}$	$< 10^{-17}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-18}$	$< 10^{-18}$	$< 10^{-18}$
Korekcia párovania báz	$< 10^{-08}$	$< 10^{-16}$	$< 10^{-08}$	$< 10^{-08}$	$< 10^{-08}$	$< 10^{-07}$	$< 10^{-07}$
Homológna rekombinácia	$< 10^{-08}$	$< 10^{-11}$	$< 10^{-08}$	$< 10^{-08}$	$< 10^{-10}$	$< 10^{-10}$	$< 10^{-08}$
Nukleotidová excízna oprava	$< 10^{-05}$	$< 10^{-05}$	-	-	$< 10^{-05}$	$< 10^{-06}$	$< 10^{-05}$

Za štatisticky významne ovplyvnené boli považované KEGG dráhy s *odds ratio* > 5 , $p < 0,001$. Rozdiely vo výsledkoch vychádzajúcich z KEGG a z GO terms boli len v miere ovplyvnenia príslušných biologických dejov.

Zarážajúce bolo pozorovanie, že žiadny zo statínov významne neovplyvnil gény mevalonátovej dráhy. Interpretácia typu bunkovej smrti vyvolanej statínmi sa líšila s ohľadom na typ použitej databázy. Zatiaľ čo podľa KEGG databázy statíny indukujú nekroptózu, podľa GO databázy vnútornú apoptickú dráhu. Pozorované boli aj zmeny expresie niektorých transkriptov súvisiacich s diferenciáciou osteoklastov, ale ich diferenciácia ako taká statínmi v danej koncentrácii a čase pôsobenia významne ovplyvnená nebola.

Interpretácia získaných výsledkov a záver

Vplyv statínov na proliferáciu kmeňových buniek odvodených od tukového tkaniva bol významne nižší ako na proliferáciu nádorových buniek pankreasu, čo je žiadúci jav. Zaujímavá je však skutočnosť, že hoci sme v ADMSC v testovanej koncentrácii pozorovali významné zmeny v expresii transkriptov, ktorých produkty zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovom cykle a replikácii DNA, významný zásah do mevalonátovej dráhy sme nepozorovali. Budeme preto sledovať koncentračnú a časovú závislosť statínov na expresiu génu pre HMG-CoA reduktázu (primárny cieľ statínov) v ADMSC.

Ďalej nás zaujímalo, či sa efekt jednotlivých statínov na proliferáciu ADMSC (účinkom sme pozorovali až v koncentráciách o rád vyšších ako v prípade nádorových buniek pankreasu) znížením pH zvýši. ADMSC však zníženie pH na úroveň 6,8 dosiahnuté prídavkom kyseliny mliečnej do média neboli schopné prežiť.

V tejto oblasti sme zatiaľ publikovali prehľadové články a len niektoré výsledky:

Režňáková, S., Priščáková, P., Repiská, V., Gbelcová, H.: Vplyv statínov na diferenciáciu a prežívanie kmeňových buniek = The effect of statins on differentiation and surviving of the stem cells. In: Lekársky obzor. - Roč. 67, č. 3 (2018), s. 115-119. - ISSN (print) 0457-4214

Režňáková, S., Priščáková, P., Búran, P., Repiská, V., Gbelcová, H.: Odolnosť mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od adipocytov k antiproliferačným účinkom statínov. In: Z laboratória do klinickej praxe 1. - Turany : P + M, 2018. - S. 160-163. - ISBN 978-80-89694-41-9

Režňáková, S., Gašparová, I., Priščáková, P., Repiská, V., Gbelcová, H.: Vplyv statínov na samoobnovovanie a diferenciáciu kmeňových buniek. In: Biologicko-genetické aspekty nádorovej regeneračnej medicíny. - Martin : JLF UK, 2016. - S. 42-48. - ISBN 978-80-8187-021-7

V danej problematike pod mojím vedením spracovávajú aj tému vplyvu statínov na kmeňové bunky svoje kvalifikačné práce:

Bc. David Végħ – diplomová práca s názvom Charakterizácia pleiotropných účinkov vybraných statínov za účelom uplatnenia v chemoadjuvantnej terapii zhubných nádorov.

MUDr. Soňa Režňáková – dizertačná práca s názvom Vplyv statínov na diferenciáciu a prežívanie kmeňových buniek.

Štúdium možností využitia statínov v regeneračnej medicíne ako aj napísanie tejto práce bolo možné vďaka grantovej podpore APVV-15-0217.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADMSC	z tukového tkaniva odvodené mezenchymálne kmeňové bunky
apo	apolipoproteín
CDK	kináza závislá od cyklínu
CE	estery cholesterolu
CoA	koenzým A
CSC	nádorové kmeňové bunky
CYP	cytochróm P450
EPC	cirkulujúce endoteliálne progenitorové bunky
ER	endoplazmatické retikulum
ESC	embryonálne kmeňové bunky
FBS	fetálne bovinné sérum
FPP	farnezylyl difosfát (farnezylyl pyrofosfát)
FTáza	farnezylyltransferáza
GA	Golgiho aparát
GAP	proteín aktivujúci guanozíntrifosfát
GDP	guanozín difosfát
GEF	guanín nukleotid výmenný faktor
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GGPP	geranylgeranyl difosfát
GTP	guanozín trifosfát
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A
HMGCS	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A syntáza
HMGCR	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A reduktáza
HVR	hypervariabilná oblasť
Icmt	izoprenylcysteínkarboxylmetyl transferáza
IDL	lipoproteíny so strednou hustotou
LD	lipidové kvapôčky
LDL	lipoproteíny s nízkou hustotou
MAPK	kináza mitogénom aktivovaného proteínu
MSC	mezenchymálne kmeňové bunky
MVD	fosfomevalonát dekarboxyláza
PBS	fosfátový tlmivý roztok
VLDL	lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abe-Dohmae, S., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K., Ueda, K., Yokoyama, S. 2004. Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J. Biol Chem*, **279**(1):604-611
- Adnane, J., Bizouarn, F.A., Qian, Y., Hamilton, A.D., Sebti, S.M. 1998. p21 (WAF1/CIP1) is upregulated by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a transforming growth factor beta- and Sp1-responsive element: involvement of the small GTPase rhoA. *Mol Cell Biol*, **18**: 6962-7690.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. 1998. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, **53**:549-54.
- Arai, M., Serizawa, N., Terhara, A., Tsujita, Y., Tanaka, M., Masuda, H., Ishikawa, S. 1988. Pravastatin sodium (CS-514), a novel cholesterol lowering agent which inhibits HMG-CoA reductase. *Sankyo Kenkyusho Nempo*, **40**:1-38.
- Ashery, U., Yizhar, O., Rotblat, B., Elad-Sfadia, G., Barkan, B., Haklai, R., Kloog, Y. 2006a. Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasosomes and the galectin switch. *Cell Mol Neurobiol*, **26**: 471-495.
- Ashery, U., Yizhar, O., Rotblat, B., Kloog, Y. 2006b. Nonconventional trafficking of Ras associated with Ras signal organization. *Traffic*, **7**: 1119-1126.
- Assmus, B., Urbich, C., Aicher, A., Hofmann, W.K., Haendeler, J., Rössig, L. 2003. HMG-CoA Reductase Inhibitors Reduce Senescence and Increase Proliferation of Endothelial Progenitor Cells via Regulation of Cell Cycle Regulatory Genes. *Circ Res*, **9**: 1049-1055.
- Athyros, V.G., Papageorgiou, A.A., Mercouris, B.R., Athyrou, V.V., Symeonidis, A.N., Basayannis, E.O., Dimitriadis, D.S., Kontopoulos, A.G. 2002. Treatment with atorvastatin to the National Cholesterol Educational Program goal versus 'usual' care in secondary coronary heart disease prevention. The Greek Atorvastatin and Coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) study. *Curr Med Res Opin*, **18**: 220-228.
- Baek, K.H., Lee, W.Y., Oh, K.W., Tae, H.J., Lee, J.M., Lee, E.J. a spol. 2005. The Effect of Simvastatin on the Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *J Korean Med Sci*, **14**: 438-444.
- Barter, P.J., Brandrup-Wognsen, G., Palmer, M.K., Nicholls, S.J. 2010. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *J Lipid Res*, **51**: 1546-53.
- Bar-Sagi, D. 2001. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*, **21**: 1441-1443.
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, et al. 2000 Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* **32**: 164-76.
- Bellosta, S., Paoletti, R., Corsini, A. 2004. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation*, **109**: III50-III57.
- Bivona, T.G., Philips, M.R. 2003. Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol*, **15**: 136-142.
- Bivona, T.G., Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J. et al. 2006. PKC regulates a farnesyl – electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell*, **21**: 481-493.
- Blum, C.B. 1994. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol*, **73**: 3D-11D.
- Blumenthal, R.S. 2000. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. *Am Heart J*, **139**: 577-583.
- Bocci, G., Fioravanti, A., Orlandi, P., Bernardini, N., Collecchi, P., De Tacca, M., Danesi, R. 2005. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells. *Br J Cancer*, **93**: 319-330.
- Boguski, M.S., McCormick, F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**: 643-654.
- Bonovas, S., Filioussi, K., Sitaras, N.M. 2008. Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol*, **103**: 2646-3651.
- Bonovas, S., Filioussi, K., Tsantes, A., Sitaras, N.M. 2007. Use of statins and risk of haematological malignancies: a meta-analysis of six randomized clinical trials and eight observational studies. *Br J Clin Pharmacol*, **64**: 255-262.
- Bonovas, S., Sitaras, N.M. 2007. Does pravastatin promote cancer in elderly patients? A metaanalysis. *CMAJ*, **176**: 649-654.
- Brown, A.G., Smale, T.C., King, T.J., Hasenkamp, R., Thompson, R.H. 1976. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *J.C.S. Perkin*, **1**: 1165-1170.
- Budaj, M., Poljak, Z., Hulín, I., Mladosičová, B. 2012. Nádorové kmeňové bunky. *Lek Obzor (Med Horizon)*, **9**: 320-324.

- Buemi, M., Allegra, A., Senatore, M., Marino, D., Medici, M.A., Aloisi, C., Di Pasquale, G., Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A., Silvestris, F. 2005. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis*, **26**: 883-891.
- Clendening, J.W., Penn, L.Z. 2012. Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene*, **31(48)**: 4967-78.
- Corica, F. 1999. Pro-apoptotic effect of fluvastatin on human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **370**: 201-203.
- Corsini, A., Maggi, F.M., Catapano, A.L. 1995. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res*, **31**: 9-27.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L. 2nd, Cox, A.D., Philips, M.R. 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol*, **4**: 343-350.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., Philips, M.R. 1999. Endomembrane trafficking of Ras: CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*, **98**: 69-80.
- Cooper, S. 2002. Reappraisal of G1-phase arrest and synchronization by lovastatin. *Cell Biol Int*, **26**: 715-727.
- Dalen, J.E., Dalton, W.S. 1996. Does lowering cholesterol cause cancer? *JAMA*, **275**: 67-69.
- Darby, I., Chen, S., De Poi, R. 2008. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J*, **53(1)**: 11-21.
- d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., Papaccio, G. 2009. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*, **18**: 75-83.
- Denoyelle, C., Vasse, M., Körner, M., Mishal, Z., Ganné, F., Vannier, J.P., Soria, J., Soria, C. 2001. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an *in vitro* study. *Carcinogenesis*, **22**: 1139-1148.
- Di Vito, M., Lenti, L., Knijn, A., Iorio, E., D'Agostino, F., Molinari, A., Calcabrini, A., Stringaro, A., Meschini, S., Arancia, G., Bozzi, A., Strom, R., Podo, F. 2001. ¹H NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Biochim Biophys Acta*, **1530**: 47-66.
- Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., Gotto, A.M. Jr. 1998. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*, **279**: 1615-1622.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H.J., Kloog, Y. 2002. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signaling to Raf-1 at the expense of Phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, **277**: 37169-37175.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Kloog, Y. 2004. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not Phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem*, **279**: 34922-34930.
- Endo A, Kuroda M, Tanzawa Y. 1976a. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*, **72**: 323-326.
- Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. 1976b. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot*, **29**: 1346-1348.
- Erbs, S., Beck, E.B., Linke, A., Adams, V., Gielen, S., Kränkel, N. a spol. 2011. High-dose rosuvastatin in chronic heart failure promotes vasculogenesis, corrects endothelial function, and improves cardiac remodeling — Results from a randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Int J Cardiol*, **1**: 56-63.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., Akiyama, K. 2012. Stem cells in dentistry – part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*, **56(3)**: 151-165.
- Everett, D.W., Chando, T.J., Didonato, G.C., Singhvi, S.M., Pan, H.Y., Weinstein, S.H. 1991. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos*, **19**: 740-748.
- Farmer, J.A., Torre-Amione, G. 2000. Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Saf*, **23**: 197-213.
- Feleszko, W., Jakobisiak, M. 2000. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, **6**: 1198-9.
- Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., Yamamoto, T.T. 2001. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem*, **276(14)**: 11420-11426.
- Gbelcová, H., Leníček, M., Zelenka, J., Knejzlík, Z., Dvořáková, G., Zadinová, M., Poučková, P., Kudla, M., Baláž, P., Ruml, T., Vítek, L. 2008. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **122**: 1214-1221.
- Ghaneh, P., Costello, E., Neoptolemos, J.P. 2007. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, **56**: 1134-1152.
- Gauthaman, K., Manasi, N., Bongso, A. 2009. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells *in vitro* but not normal human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol*, **6**: 962-973.

- Ginsberg, H.N., Le, N.A., Short, M.P., Ramakrishnan, R., Desnick, R.J. 1987. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest*, **80**: 1692-1697.
- Gioventù, S., Andriolo, G., Bonino, F., Frasca, S., Lazzari, L., Montelatici, E., Santoro, F., Rebullà, P. 2012. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfus Apher Sci*. **47**(2): 199-206.
- Gliemroth, J., Feyerabend, T., Gerlach, C., Arnold, H., Terzis, A.J. 2003. Proliferation, migration, and invasion of human glioma cells exposed to fractionated radiotherapy *in vitro*, *Neurosurg Rev*, **26**: 198-205.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **343**: 425-430.
- Graaf, M.R., Beiderbeck, A.B., Egberts, A.C., Richel, D.J., Guchelaar, H.J. 2004. The risk of cancer in users of statins. *Am J Clin Oncol*, **22**: 2388-2394.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, **81**(8):531-5.
- Guillot, F., Misslin, P., Lemaire, M. 1993. Comparison of fluvastatin and lovastatin blood-brain barrier transfer using *in vitro* and *in vivo* methods. *J Cardiovasc Pharmacol*, **21**: 339-346.
- Guo, W., He, Y., Zhang, X., Lu, W., Wang, C., Yu, H., Liu, Y., Li, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Zhang, M., Deng, Z., Jin, Y. 2009. The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomaterials*, **30**(35): 6708-6723.
- Haendeler, J., Hoffman, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M. a spol. 2004. Antioxidants Inhibit Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase and Delay Replicative Senescence of Endothelial Cells. *Circ Res*, **6**: 768-775.
- Hakumäki, J.M., Kauppinen, R.A. 2000. ¹H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci*, **25**: 357-362.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J. 1989. All Ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**:1167-1177.
- Hancock, J.F., Cadwallader, K., Paterson, H., Marshall, C.J. 1991b. A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J*, **10**: 4033-4039.
- Hancock, J.F. 2003. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**: 373-384.
- Hanefeld, M., Deslypere, J.P., Ose, L., Durrington, P.N., Farnier, M., Schmage, N. 1999. Efficacy and safety of 300 micrograms and 400 micrograms cerivastatin once daily in patients with primary hypercholesterolemia: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Int Med Res*, **27**:115-129.
- Hawk, M.A., Cesen, K.T., Siglin, J.C., Stoner, G.D., Ruch, R.J. 1996. Inhibition of lung tumor cell growth *in vitro* and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett*, **109**:217-22.
- Herrmann, C. 2003. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol*, **13**: 122-129.
- Jura, N., Scotto-Lavino, E., Sobczyk, A., Bar-Sagi, D. 2006. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Molecular cell*, **21**: 679-687.
- Hoffmann, W.F., Alberts, A.W., Cragoe, E.J., Deanna, A.A., Evans, B.E., Gilfillan, J.L., Gould, N.P., Huff, J.W., Novello, F.C., Prugh, J.D., Rittle, K.E., Smith, R.L., Stokker, G.E., Willard, A.K. 1986. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 2. Structural modifications of 7-(substituted aryl)-3, 5-dihydroxy -6-heptenoic acids and their lactone derivatives. *J Med Chem*, **29**: 159-169.
- Huang, G.T., Gronthos, S., Shi, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, **88**(9): 792-806.
- Huang, X., Huang, Z., Li, W. 2014. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. *Mol Med Rep*, **9**(6): 2152-2158.
- Ilmer, M., Vykoukal, J., Recio Boiles, A., Coleman, M. a spol. 2014. Two sides of the same coin: stem cells in cancer and regenerative medicine. *FASEB J*, **7**: 2748-2761.
- Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Takano-Yamamoto, T., Ogawa, M., Mizuno, M., Kasugai, S., Tsuji, T. 2009. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(32): 13475-1380.
- Istvan, E. 2003. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl*, **4**: 3-8.
- Istvan, E.S., Deisenhofer, J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, **292**: 1160-1164.
- Izadpanah, R., Schächtele, D.J., Pfnür, A.B., Lin, D., Slakey, D.P., Kadowitz, P.J. a spol. 2015. The impact of statins on biological characteristics of stem cells provides a novel explanation for their pleiotropic beneficial and adverse clinical effects. *Am J Physiol Physiol*, **8**: C522-C531.
- Izumi, Y., Aoki, A., Yamada, Y., Kobayashi, H., Iwata, T., Akizuki, T., Suda, T., Nakamura, S., Wara-Aswapati, N., Ueda, M., Ishikawa, I. 2011. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontol 2000*, **56**(1): 166-187.
- Jakóbsiak, M., Bruno, S., Skierski, J.S., Darzynkiewicz, Z. 1991. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 3628-3632.

- Kajinami, K., Mabuchi, H., Saito, Y.** 2000. NK-104: a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs*, **9**: 2653-2661.
- Kaneta, S., Satoh, K., Kano, S., Kanda, M., Ichihara, K.** 2003. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis*, **170**: 237-243.
- Kathawala, F.G.** 1991. HMG-CoA reductase inhibitors: an exciting development in the treatment of hyperlipoproteinemia. *Med Res Rev*, **11**: 121-46.
- Kawashima, N.** 2012. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*, **57**(11): 1439-1458.
- Kawata, S., Nagase, T., Yamasaki, E., Ishiguro, H., Matsuzawa, Y.** 1994. Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and dlimonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J cancer*, **69**:1015-20.
- Kawata, S., Yamasaki, E., Nagase, T., Inui, Y., Ito, N., Matsuda, Y., Inada, M., Tamura, S., Noda, S., Imai, Y., Matsuzawa, Y.** 2001. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer*, **84**: 886-891.
- Kenworthy, A.K.** 2005. Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol*, **170**: 261-272.
- Khurana, V., Bejjanki, H.R., Caldito, G., Owens, M.W.** 2007. Statins reduce the risk of lung cancer in humans: A large case-control study of US Veterans. *Chest*, **131** (5): 1282-1288.
- Kim, T.H., Yun, Y.P., Shim, K.S., Kim, H.J., Kim, S.E. a spol.** 2018. *In Vitro* Anti-Inflammation and Chondrogenic Differentiation Effects of Inclusion Nanocomplexes of Hyaluronic Acid-Beta Cyclodextrin and Simvastatin. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **15**(3): 263-274.
- Kim, W.S., Kim, M.M., Choi, H.J., Yoon, S.S., Lee, M.H., Park, K., Park, C.H., Kang, W.K.** 2001. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced Bystric adenocarcinoma. *Incest New Drugs*, **19**: 81-83.
- Kochhar, R., Khurana, V., Bejjanki, H., Caldito, G., Fort, C.** 2005. Statins reduce breast cancer risk: a case control study in US female veterans. *J Clin Oncol*, **23**:514.
- Kort, W.J., Hülsmann, W.C., Stehman, T.E.** 1989. Modulation of metastatic ability by inhibition of cholesterol synthesis. *Clin Exp Metastasis*, **7**: 517-523.
- Kupcsik, L., Meurya, T., Flury, M., Stoddart, M., Alini, M. a spol.** 2009. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *J Cell Mol Med*, **11-12**: 4465-4473.
- Kusama, T., Mukai, M., Iwasaki, T., Tatsuta, M., Matsumoto, Y., Alexo, H., Nakanuta, H.** 2001. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res*, **61**: 4885-4891
- Kusama, T., Mukai, M., Iwasaki, T., Tatsuta, M., Matsumoto, Y., Akedo, H., Inoue, M., Nakamura, H.** 2002. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology*, **122**: 308-318.
- Lacerda L, Reddy JP, Liu D, Larson R, et al.** 2014. Simvastatin radiosensitizes differentiated and stem-like breast cancer cell lines and is associated with improved local control in inflammatory breast cancer patients treated with pastmastectomy radiation. *Stem Cells Translational Medicine*, **3**: 849-856.
- Larner, J., Jane, J., Laws, E., Packer, R., Myers, C., Shaffrey, M.** 1998. A phase I-II trial of lovastatin for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol*, **21**: 579-583
- Lee, S.J., Ha, M.J., Lee, J., Nguyen, P., Choi, Y.H., Pirnia, F., Kang, W.K., Wang, X.F., Kim, S.J., Trepel, J.B.** 1998. Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of p21 (WAF1/CIP1) in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem*, **273**: 10618-10623.
- Leone, A.M., Rutella, S., Giannico, M.B., Perfetti, M., Zaccone, V., Brugaletta, S., a spol.** 2008. Effect of intensive vs standard statin therapy on endothelial progenitor cells and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: Statins for regeneration after acute myocardial infarction and PCI (STRAP) trial. *Int J Cardiol*, **3**: 457-462.
- Leung, D.W.** 2001. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci*, **6**: D944-953.
- Lewis, S.J., Sacks, F.M., Mitchell, J.S., East, C., Glasser, S., Kell, S., Letterer, R., Limacher, M., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Pfeffer, M.A., Braunwald, E.** 1998. Effect of pravastatin on cardiovascular events in women after myocardial infarction: the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. *J Am Coll Cardiol*, **32**: 40-46.
- Li, X., Liu, L., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Sebti, S.M., Hamilton, A.D., Harlan, J.M.** 2002. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**: 15309-15316.
- Li, X., Song, Q.S., Wang, J.Y., Leng, H., Chen, Z.Q., Liu, Z.J. a spol.** 2011. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, **4**: 396-403.

- Lindahl, A., Sandström, R., Ungelt, A.L., Abrahamsson, B., Knutson, T.W., Knutson, L., Lennernäs, H. 1996. Jejunal permeability and hepatic extraction of fluvastatin in humans. *Clin Pharmacol Ther*, **60**: 493-503.
- LIPID Study Group. 1998. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med*, **339**: 1349-1357.
- Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., Wagers, A. 2010. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Curr Top Dev Biol*, **92**: 367-409.
- Lowy, D.R., Willumsen, B.M. 1993. Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem*, **62**: 851-891.
- Midgley, R.S., Kerr, D.J. 2002. Ras as a target in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, **44**: 109-120.
- Masters, B.A., Palmoski, M.J., Flint, O.P., Gregg, R.E., Wang-Iverson, D., Durham, S.K. 1995. *In vitro* myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **131**: 163-174.
- McTaggart, F., Buckett, L., Davison, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., Warwick, M. 2001. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol*, **87**: 28B-32B.
- McTavish, D., Sorkin, E.M. 1991. Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs*, **42**: 65-89.
- Mehta, N., Hordines, J., Sykes, D., Doerr, R.J., Cohen, S.A. 1998. Low density lipoproteins and Lovastatin modulate the organ-specific transendothelial migration of primary and metastatic human colon adenocarcinoma cell lines *in vitro*. *Clin Exp Metastasis*, **16**: 587-594.
- Mikulski, S.M., Viera, A., Darzynkiewicz, Z., Shogen, K. 1992. Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, **66**: 304-310.
- Moghadasian, M.H. 1999. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci*, **65**: 1329-1337.
- Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., Di Benedetto, A., Rapone, B., Cantore, S., Di Comite, M., Colucci, S., Grano, M., Grassi, F.R. 2012. Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *Int J Med Sci*, **9**(6): 480-487.
- Muller, C., Bockhorn, A.G., Klusmeier, S., Kiehl, M., Roeder, C., Kalthoff, H., Koch, O.M. 1998. Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol*, **12**:717-23.
- Murphy, D.J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*, **40**: 325-438.
- Naderi, S., Blomhoff, R., Myklebust, J., Smeland, E.B., Erikstein, B., Norum, K.R., Blomhoff, H.K. 1999. Lovastatin inhibits G1/S transition of normal human B-lymphocytes independent of apoptosis. *Exp Cell Res*, **252**: 144-153.
- Newman, T.B., Hulley, S.B. 1996. Carcinogenicity of lipid-lowering drugs. *JAMA*, **275**: 55-60.
- Nübel, T., Dippold, W., Kaina, B., Fritz, G. 2004a. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis*, **25**: 1335-1344.
- Nübel, T., Dippold, W., Kleinert, H., Kaina, B., Fritz, G. 2004b. Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNF α and attenuates tumor cell adhesion. *FASEB J*, **18**: 140-142.
- Oshima, M., Mizuno, M., Imamura, A., Ogawa, M., Yasukawa, M., a spol. 2011. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One*, **6**(7): e21531. doi: 10.1371/journal.pone.0021531.
- Park, A., Barrera-Ramirez, J., Ranasinge, I., Pilon, S., Sy, R., Fergusson, D. a spol. 2016. Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Reports*, **3**: 327-339.
- Park, B.W., Kang, E.J., Byun, J.H., Son, M.G., Kim, H.J., Hah, Y.S., Kim, T.H., Mohana Kumar, B., Ock, S.A., Rho, G.J. 2012. *In vitro* and *in vivo* osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation*, **83**(5): 249-259.
- Pedersen, T.R., Wilhelmsen, L., Faergeman, O., Strandberg, T.E., Thorgeirsson, G., Troedsson, L., Kristianson, J., Berg, K., Cook, T.J., Haghfelt, T., Kjekshus, J., Miettinen, T. 2000. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol*, **86**: 257-62.
- Philips, M.R. 2005. Compartmentalized signaling of Ras. *Biochem Soc Trans*, **33**: 657-661.
- Phillips, P.S., Haas, R.H., Bannykh, S., Hathaway, S., Gray, N.L., Kimura, B.J., Vladutiu, G.D., England, J.D.; Scripps Mercy Clinical Research Center. 2002. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Ann Intern Med*, **137**: 581-585.
- Piepho, R.W. 2000. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of agents proven to raise high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*, **86**: 35L-40L.

- Poynter, J.N., Gruber, S.B., Higgins, P.D., Almog, R., Bonner, J.D., Rennert, H.S., Low, M., Greenon, J.K., Rennert, G. 2005. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*, **352**: 2184-2192.
- Prior, I.A., Hancock, J.F. 2001. Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci*, **114**: 1603-1608.
- Rao, S., Porter, D.C., Chen, X., Herliczek, T., Lowe, M., Keyomarsi, K. 1999. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 7797-7802.
- Reed, S.I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., Slingerland, J. 1994. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl*, **18**: 69-73.
- Rezai Rad, M., Liu, D., He, H., Brooks, H., Xiao, M., Wise, G.E., Yao, S. 2015. The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs). *Arch Oral Biol*, **60**(4): 546-556.
- Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M.A., Sacks, F.M., Moye, L.A., Goldman, S., Flaker, G.C., Braunwald, E. 1998. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*, **98**: 839-844.
- Robin, N.C., Agoston, Z., Biechele, T.L., James, R.G., Berndt, J.D., Moon, R.T. 2003. Simvastatin promotes adult hippocampal neurogenesis by enhancing Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cell Reports*, **2**(1): 9-17.
- Rupp, S., Badorff, C., Koyanagi, M., Urbich, C., Fichtlscherer, S., Aicher, A. a spol. 2004. Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells. *Basic Res Cardiol*, **1**: 61-68.
- Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., Davis, B.R., Braunwald, E. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*, **335**: 1001-1009.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. 1994. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, **344**: 1383-1389.
- Schroeter, M.R., Humboldt, T., Schäfer, K., Konstantinides, S. 2009. Rosuvastatin reduces atherosclerotic lesions and promotes progenitor cell mobilisation and recruitment in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*, **1**: 63-73.
- Sebti, S.M., Tkalcovic, G.T., Jani, J.P. 1991. Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Commun*, **3**: 141-147.
- Sehayek, E., Butbul, E., Avner, R., Levkovitz, H., Eisenberg, S. 1994. Enhanced cellular metabolism of very low density lipoprotein by simvastatin. A novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Invest*, **24**: 173-178.
- Serajuddin, A.T., Ranadive, S.A., Mahoney, E.M. 1991. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J. Pharm. Sci.*, **80**: 830-834.
- Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J.H., Packard, C.J., for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, **333**: 1301-1307.
- Singal, R., Khurana, V., Caldito, G., Fort, C. 2005. Statins and prostate cancer risk. *J Clin Oncol*, **23**: 1004.
- Singhvi, S.M., Pan, H.Y., Morrison, R.A., Willard, D.A. 1990. Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, **29**: 239-43.
- Sloan, A.J., Waddington, R.J. 2009. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent*. **19**(1): 61-70.
- Soares, D.G., Zhang, Z., Mohamed, F., Eyster, T.W., DE Souza Costa, a spol. 2018. Simvastatin and nanofibrous poly (l-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment. *Acta Biomater*, **68**: 190-203.
- Sorrentino, S., Landmesser, U. 2005. Nonlipid-lowering effects of statins. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, **6**: 459-466.
- Suchánek, J., Kleplová, T.S., Kapitán, M., Soukup, T. 2013. The effect of fetal calf serum on human dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, **56**(4): 142-149.
- Sumi, S., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M. Jr, Pour, P.M., Ishizuka, J., Thompson, J.C. 1994. Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas*, **9**: 657-661.
- Sumi, S., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M., Uchida, T., Murakami, M., Rajaraman, S., Ishizuka, J., Thompson, J.C. 1992. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology*, **103**: 982-989.
- Suzuki, G., Iyer, V., Cimato, T., Canty, J.M. Jr. 2009. Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD¹³³⁺ and cKit⁺ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle. *Circ Res*, **2**: 255-264.

- Suzuki, S., Haruyama, N., Nishimura, F., Kulkarni, A.B. 2012. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*, **57**(9): 1165-75.
- Suzuki, T., Lee, C.H., Chen, M., Zhao, W., Fu, S.Y., Qi, J.J., Chotkowski, G., Eisig, S.B., Tai, I.C., Wang, Y.H., Chen, C.H., Chuang, S.C., Chang, J.K., Ho, M.L. 2015. Simvastatin enhances Rho/actin/cell rigidity pathway contributing to mesenchymal stem cells' osteogenic differentiation. *Int J Nanomedicine*, **10**: 5881-5894.
- Svoboda, M., Vyskočil, J., Nováková, J. 2005. Statiny v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie*, **19**: 155-159.
- Tavintharan, S., Ong, C., Jeyaseelan, K., Sivakumar, M., Lim, S., Sum, C. 2007. Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: A possible role in statin-induced hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol*, **2**: 173-179.
- Ucar, M., Mjörndal, T., Dahlqvist, R. 2000. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. *Drug Saf*, **22**: 441-457.
- Ura, H., Obara, T., Nishino, N., Tanno, S., Okanuta, K., Namiki, M. 1994. Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. *Jpn J Cancer Res*, **85**: 633-638.
- Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. 2002. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res.*, **90**: 737-744.
- Valorani, M.G., Montelatici, E., Germani, A., Biddle, A., D'Alessandro, D., Strollo, R., Patrizi, M.P., Lazzari, L., Nye, E., Otto, W.R., Pozzilli, P., Alison, M.R. 2012. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *In Cell Prolif*, **45**(3): 225-238.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H. a spol. 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, **1**: E1-E7.
- Vidal, A., Millard, S.S., Miller, J.P., Koff, A. 2002. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem*, **277**: 16433-16440.
- Vojtek, A.B., Der, C.J. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*, **273**: 19925-19928.
- Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I. 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, **307**: 1746-1752.
- Walter, D.H., Ritting, K., Bahlmann, F.H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T. a spol. 2002. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, **25**: 3017-3024.
- Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. 2000. Suppression of invasion and MMP-9 expression in NIH 3T3 and v-H-Ras 3T3 fibroblasts by lovastatin through inhibition of ras isoprenylation. *Oncology*, **59**: 245-254.
- Wang, X., Sha, X.J., Li, G.H., Yang, F.S., Ji, K., Wen, L.Y., Liu, S.Y., Chen, L., Ding, Y., Xuan, K. 2012. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*, **57**(9): 1231-1240.
- Weis, M., Heeschen, C., Glassford, A.J., Cooke, J.P. 2002. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*, **105**: 739-745.
- Whyte, D.B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T.N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J.J., Bishop, W.R., Pai, J.K. 1997. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem*, **272**: 14459-14464.
- Wierzbicki, A.S., Lumb, P.J., Chik, G., Crook, M.A. 2000. High-density lipoprotein cholesterol and triglyceride response with simvastatin versus atorvastatin in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*, **86**: 547-549.
- Willumsen, B.M., Christensen, A., Hubert, N.L., Papageorge, A.G., Lowy, D. 1984. The p21 ras C terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**: 583-586.
- Wong, A., Mao, J.J. 2011. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res*, **90**(8): 1013-1008.
- Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., Penn, L.Z. 2002. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*, **16**: 508-519.
- Wong, W.W., Tan, M.M., Xia, Z., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., Penn, L.Z. 2001. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res*, **7**: 2067-2075.
- Xu, H., Yang, Y.J., Yang, T., Qian, H.Y. 2013. Statins and stem cell modulation. *Ageing Res Rev*, **1**: 1-7.
- Yang, Y.J., Qian, H.Y., Huang, J., Li, J.J., Gao, R.L., Dou, K.F. a spol. 2009. Combined Therapy With Simvastatin and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Increases Benefits in Infarcted Swine Hearts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **12**: 2076-2082.
- Yao, C.J., Lai, G.M., Chan, C.F., Cheby, A.L., Yang, Y.Y. 2006. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. *Int J Cancer*, **118**:773-779.

- Yao, S., Pan, F., Prpic, V., Wise, G.E.** 2008. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*, **87(8)**: 767-771.
- Yao, S., He, H., Gutierrez, D.L., Rad, M.R., Liu, D., Li, C., Flanagan, M., Wise, G.E.** 2013. Expression of bone morphogenetic protein-6 in dental follicle stem cells and its effect on osteogenic differentiation. *Cells Tissues Organs*, **198(6)**: 438-447.
- Zhang, W., Walboomers, X.F., van Kuppevelt, T.H., Daamen, W.F., Bian, Z., Jansen, J.A.** 2006. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, **27(33)**: 5658-5668.
- Zijah, V., Salehi, R., Aghazadeh, M., Samiei, M., Alizadeh, E. a spol.** 2017. Towards optimization of odonto/osteogenic bioengineering: in vitro comparison of simvastatin, sodium fluoride, melanocyte-stimulating hormone. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **53(6)**: 502–512.

PRÍLOHY

1. **Gbelcová, H.**, Švéda, M., Laubertová, L., Varga, I., Vítek, L., Kolář, M., Strnad, H., Zelenka, J., Böhmer, D., Ruml, T.: The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. In: Lipids in Health and Disease [elektronický zdroj]. - Vol. 12, No. 1 (2013), Art. No. 126 [9 s.] [online]. - ISSN 1476-511X, IF (JCR) 2013=2,310, ohlasy - 13

2. **Gbelcová, H.**, Leníček, M., Zelenka, J., Krechler, T., Knejzlík, Z., Dvořáková, G., Zadinová, M., Poučková, P., Ruml, T., Vítek, L.: Protinádorové účinky statinů na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu = Anticancer effect of statins on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma, In: Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie. - Roč. 61, č. 2 (2007), s. 75-81. - ISSN 1213-323X, ohlas - 1

3. **Gbelcová, H.**, Leníček, M., Zelenka, J., Knejzlík, Z., Dvořáková, G., Zadinová, M., Poučková, P., Kudla, M., Balaž, P., Ruml, T., Vítek, L.: Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. In: International Journal of Cancer. - Vol. 122, No. 6 (2008), s. 1214-1221. - ISSN 0020-7136, IF (JCR) 2008=4,734, ohlasy – 59.

4. **Gbelcová, H.**, Rimpelová, S., Knejzlík, Z., Repiská, V., Ruml, T., Böhmer, D.: Proteíny Ras: klíčové regulátory bunkového cyklu. In: Chemické listy. - Roč. 109, č. 5 (2015), s. 364-370. - ISSN 0009-2770, IF (JCR) 2015=0,279

5. **Gbelcová, H.**, Repiská, V., Böhmer, D., Ruml, T., Knejzlík, Z.: Úloha hypervariabilnej oblasti Ras proteínov v ich vnútrobunkovom transporte. In: Čerpajme z minulosti, ktorá nás navedie na budúcnosť. – Bratislava: Proprint, 2015. - S. 126-134. - ISBN 978-80-89747-06-1

6. **Gbelcová, H.**, Rimpelová, S, Ruml, T., Fenclová, M., Kosek, V., Hajšlová, J., Strnad, H., Kolář, M., Vítek, L.: Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer. In: Scientific Reports [elektronický zdroj]. - Vol. 7 (2017), Art. No. 44219 [11 s.] [online]. - ISSN 2045-2322, IF (JCR) 2017=4,122, ohlasy - 9

7. **Gbelcová, H.**, Rimpelová, S., Knejzlík, Z., Sachová, J., Kolář, M., Strnad, H., Repiská, V., D'Acunto, W.C., Ruml, T., Vitek, L.: Isoprenoids responsible for protein prenylation modulate the biological effects of statins on pancreatic cancer cells. In: *Lipids in Health and Disease* [elektronický zdroj]. - Vol. 16 (2017), Art. No. 250 [10 s.] [online]. - ISSN 1476-511X, IF (JCR) 2017=2,663, ohlasy - 2
8. Režňáková, S., Rimpelová, S., Priščáková, P., Koňariková, K., Repiská, V., Czakó, L., **Gbelcová, H.**: Vplyv statínov na aktínový cytoskelet a bunkový cyklus pankreatických nádorových buniek. In: *Biologicko-genetické aspekty nádorovej regeneračnej medicíny*. - Martin : JLF UK, 2016. - S. 12-16. - ISBN 978-80-8187-021-7
9. Režňáková, S., Priščáková, P., Repiská, V., **Gbelcová, H.**: Vplyv statínov na diferenciaciu a prežívanie kmeňových buniek = The effect of statins on differentiation and surviving of the stem cells. In: *Lekársky obzor*. - Roč. 67, č. 3 (2018), s. 115-119. - ISSN (print) 0457-4214
10. Režňáková, S., Priščáková, P., Búran, P., Repiská, V., **Gbelcová, H.**: Odolnosť mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od adipocytov k antiproliferačným účinkom statínov. In: *Z laboratória do klinickej praxe 1*. - Turany : P + M, 2018. - S. 160-163. - ISBN 978-80-89694-41-9

RESEARCH

Open Access

The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells

Helena Gbelcová^{1,2*}, Martin Švéda^{2†}, Lucia Laubertová^{3†}, Ivan Varga^{4†}, Libor Vitek^{5†}, Michal Kolář^{6†}, Hynek Strnad^{6†}, Jaroslav Zelenka^{7,8†}, Daniel Böhmer^{1†} and Tomáš Ruml^{2†}

Abstract

Background: Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) represent a major class of compounds for the treatment of hypercholesterolemia due to their ability to inhibit *de novo* cholesterol synthesis. In addition to their hypolipidemic effects, chemoprotective properties have been attributed to statins as well. These effects involve multiple mechanisms, which, however, are not known in detail. The aim of our study was to assess in non-malignant as well as cancer cells the impact of simvastatin on the amount of cytosolic lipid droplets (LDs) implicated in many biological processes including proliferation, inflammation, carcinogenesis, apoptosis, necrosis or growth arrest.

Methods: Human embryonic kidney cells HEK-293T and human pancreatic cancer cells MiaPaCa-2 were treated with simvastatin (6 and 12 μ M) for 24 and 48 hours respectively. Neutral lipid probe Nile Red was used for detection of LDs by fluorescence microscopy. Cellular cholesterol content was determined by HPLC. Changes in expression of genes related to lipid metabolism in simvastatin-treated MiaPaCa-2 cells were examined by DNA microarray analysis. Validation of gene expression changes was performed using quantitative RT-PCR.

Results: The treatment of the cells with simvastatin increased their intracellular content of LDs in both non-malignant as well as cancer cells, partially due to the uptake of cholesterol and triacylglyceroles from medium; but in particular, due to enhanced synthesis of triacylglyceroles as proved by significant overexpression of genes related to *de novo* synthesis of triacylglyceroles and phospholipids. In addition, simvastatin also markedly influenced expression of genes directly affecting cell proliferation and signaling.

Conclusions: Simvastatin treatment led to accumulation of cytosolic LDs within the examined cells, a phenomenon which might contribute to the antiproliferative effects of statins.

Keywords: Simvastatin, Lipid droplets, DNA microarray, Nile red, Pancreatic cancer

Background

Statins represent a major class of drugs for treatment of hypercholesterolemia due to their ability to inhibit *de novo* cholesterol synthesis, namely the rate-limiting step of mevalonate pathway catalyzed by HMG-CoA reductase.

The first statin was discovered in 1976, and since 1980 they have been introduced into clinical practice [1].

In addition to their hypolipidemic effects, statins exert also numerous additional biological activities mediated by various products of the mevalonate pathway, such as anti-inflammatory and immunomodulatory activities, effects on endothelial function, anti-oxidative effects, or effects on cell proliferation and apoptosis, etc. [2,3].

Chemoprotective effects of statins have been attributed to their impact on protein prenylation. Among prenylated proteins, the low molecular weight GTP-

* Correspondence: helena.gbelcova@fmed.uniba.sk

†Equal contributors

¹Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia

²Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

binding Ras proteins constitute central regulators of numerous cellular functions including cell proliferation. In normal, untransformed cells, the Ras proteins cycle between an inactive GDP-bound state and active GTP-bound state at the plasma membrane (PM) [4]. Unlike activation mechanisms under physiological conditions, activating mutations of *ras* genes (mostly in *K-ras* gene) occur frequently in malignant tissues.

These mutations result in a loss of GTPase activity, which leads to permanent K-Ras protein activation and continuous initiation of downstream signal cascades related to cell proliferation. This results in deregulated growth of cell populations and development of cancer. It was found that approximately 30% of all human cancers harbor activating mutations of *ras* genes. In pancreatic cancer, these mutations of the *K-ras* oncogene are present in up to 90% of cases [5,6]. Statin-mediated inhibition of Ras protein farnesylation thus seems to be a promising adjuvant approach for the treatment of pancreatic cancer and cancer in general, and this is why the possible anticancer potential of statins is being intensively studied [7-9].

The molecular mechanisms of the anticancer effects of statins are complex and depend on many factors affecting their pharmacokinetics and pharmacodynamics [9,10]. Apart from common cellular processes affected by statins, their impact on metabolism of cytosolic lipid droplets (LDs) has not been studied in detail. Cytosolic LDs, previously considered to be passive fat deposits within the cells, are being currently regarded as dynamic, regulated organelles with multiple biological functions [11]. The mechanisms of LDs biogenesis and turnover are not currently understood and several hypotheses have been suggested [12,13]. LDs exist virtually in any kind of cell, ranging from bacteria to yeasts, plants, and higher mammals. In mammalian cells and in most cultured cell lines, LDs consist of a core of neutral lipids, predominantly triacylglyceroles (TG) or cholesteryl esters (CE), that are surrounded by a monolayer of phospholipids, free cholesterol and associated proteins. The neutral lipids that are stored in LDs are used for metabolism, membrane synthesis (phospholipids and cholesterol) and steroid synthesis [14]. In addition, LDs have a crucial role as a deposit of cholesterol in the form of cholesteryl esters, as part of complex homeostatic mechanisms that are involved in regulation of the intracellular free cholesterol levels [14]. Di Vito and co-workers reported a highly dynamic role of intracellular LDs in many important developmental processes including proliferation, inflammation, apoptosis, growth arrest and necrosis [15,16]. Based on these data, the effect of statins on pancreatic cancer cell proliferation might be caused by the changes in intracellular LDs amount.

The aim of the present study was thus to assess the effect of simvastatin on intracellular LDs in human healthy and pancreatic cancer cells, and to relate these effects to antiproliferative activities of statins.

Results

Analysis of intracellular LDs content

a) HEK 293T cells

Occasional presence of LDs was observed in HEK 293T cells cultured in the medium supplement with FBS (Figure 1a), which increased markedly in the cells exposed to simvastatin (12 μ M) (Figure 1b). To eliminate the effect of possible cholesterol uptake from the medium, the cells were cultured in the FBS free medium. The absence of FBS resulted in disappearance of LDs from the cells not exposed to simvastatin (Figure 1c). However, compared to simvastatin-untreated cells (Figure 1c), the LDs content in the cells cultured in presence of 12 μ M simvastatin in FBS free medium increased again (Figure 1d) and was comparable to the control cells (Figure 1a).

b) MiaPaCa-2 cells

Content of the LDs in the MiaPaCa-2 cells was in general higher as compared to that in HEK-293T cells (Figure 2a vs. Figure 1a). Due to very high LDs concentration in MiaPaCa-2 cells there were not detectable changes in LDs amounts after 24 hours of treatment. Therefore, the MiaPaCa-2 cells were cultured in the FBS free medium supplemented with 12 μ M simvastatin for 48 hours. Even after this prolonged exposure to simvastatin, the changes in the LDs amount in MiaPaCa-2 cells (Figure 2b) were not as evident as in HEK cells. Similarly, the amount of LDs was decreased in the MiaPaCa-2 cells cultured in the FBS free medium compared to those containing FBS (Figure 2c vs. Figure 2a). The LDs content in the MiaPaCa-2 cells treated with simvastatin in the FBS free medium was again slightly higher to that in the cells cultured in the same medium in absence of simvastatin (Figure 2d vs. Figure 2c) and substantially lower compared to that in the control cells (in the FBS supplemented medium) (Figure 2a).

Analysis of intracellular cholesterol content

To study the composition of accumulated LDs, MiaPaCa-2 cells were exposed to 12 μ M simvastatin for 48 hours. The cells were then harvested and cellular cholesterol content was quantified and compared to that in the cells cultured in the absence of simvastatin. Only free cholesterol was detected in the analyzed samples, but no significant differences between cholesterol content in the control cells and those treated with simvastatin were detectable (Table 1).

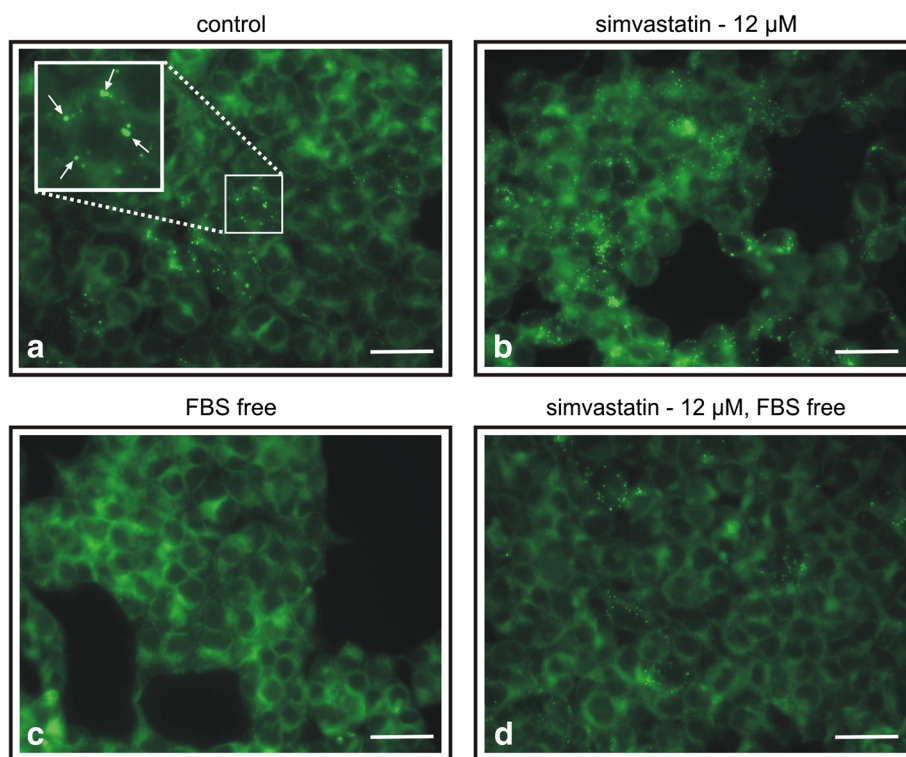


Figure 1 Intracellular lipid droplets in HEK-293T cells staining by Nile Red (10 ng/ml), a) control cells, b) simvastatin treated cells, c) cells cultivated in FBS free medium, d) cells treated with simvastatin in FBS free medium. Simvastatin used in concentration 12 μ M, 24 hrs exposure. FBS, fetal bovine serum. Scale bar represents 10 μ m. Arrows indicate lipid droplets.

Gene expression analysis

a) The effect of simvastatin on expression of genes related to lipid metabolism

Gene expression microarray analysis revealed that 6 μ M concentration of simvastatin was sufficient for up-regulation of three genes related to the enzymes of the mevalonate pathway; this effect was pronounced by higher concentration of simvastatin (12 μ M) (Table 2).

The most upregulated gene of mevalonate pathway was *HMGCS1* (Table 2) coding for an enzyme catalyzing condensation of acetyl-CoA with acetoacetyl-CoA to form HMG-CoA. The other up-regulated gene, *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase) is responsible for conversion of the HMG-CoA to mevalonic acid and it is target of statins. The MVD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase), whose gene transcription was doubled upon treatment with simvastatin, catalyzes conversion of mevalonate pyrophosphate into isopentenyl pyrophosphate [17].

Treatment of simvastatin also lead to significant up-regulation of two genes coding for enzymes catalyzing *de novo* synthesis of phospholipids and glycerolipids, in particular 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta (*AGPAT2*) and lipid phosphate phosphohydrolase 1 (*PPAP2A*) (Table 2). *AGPAT2* converts lysophosphatidic

acid to phosphatidic acid, the second step in *de novo* phospholipid biosynthesis [18]. *PPAP2A* is a member of the phosphatidic acid phosphatase (PAP) family. PAPs convert phosphatidic acid to diacylglycerol, and function in *de novo* synthesis of glycerolipids as well as in receptor-activated signal transduction mediated by phospholipase D. This protein plays an active role in hydrolysis and uptake of lipids from extracellular space and represents a key enzyme in the regulation of lipid synthesis in general [19].

In addition, *ACSS2* coding for acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (the member of Acyl-CoA synthetases (thiokinases)) was also significantly upregulated by simvastatin (Table 2). It catalyzes activation of long chain fatty acids and esterifies them to coenzyme A, before they undergo oxidative degradation to be utilized for synthesis of complex lipids (e.g., TG or membrane lipids), or be attached to proteins as lipid anchors [20].

The last significantly up-regulated gene related to cholesterol and lipid homeostasis was *ABCA7* gene (Table 2). The protein encoded by this gene is a member of the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters, that transport a wide variety of substrates across extra- and intracellular membranes, including metabolic products, lipids and sterols, and drugs [21].

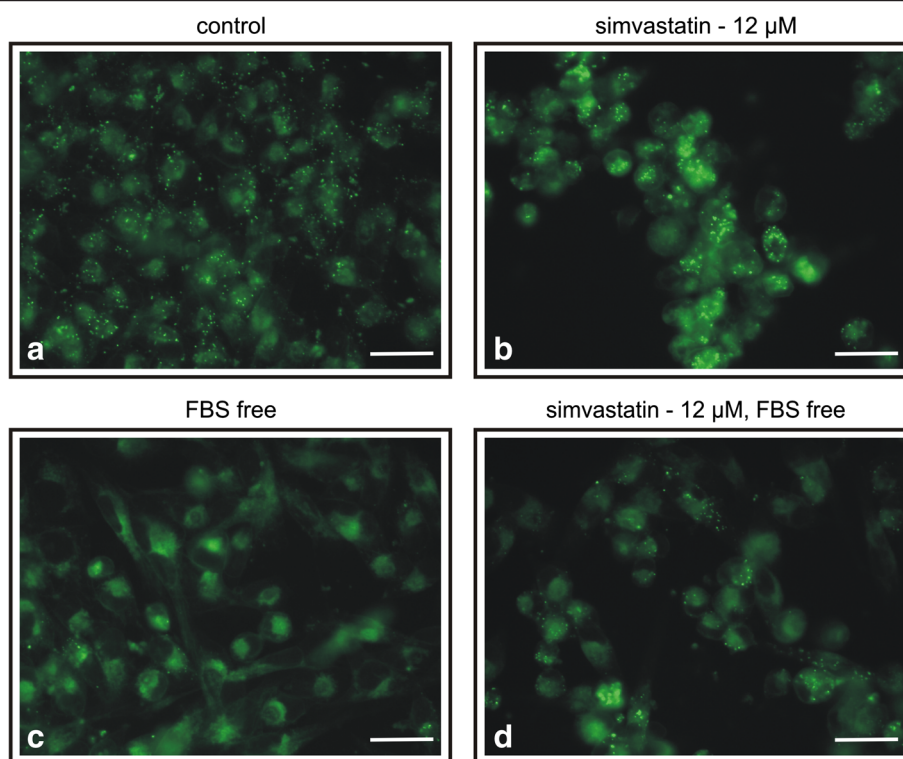


Figure 2 Intracellular lipid droplets in MiaPaCa-2 cells staining by Nile Red (10 ng/ml), a) control cells, b) simvastatin treated cells, c) cells cultivated in FBS free medium, d) cells treated with simvastatin in FBS free medium. Simvastatin used in concentration 12 μ M, 48 hrs exposure. FBS, fetal bovine serum. Scale bar represents 10 μ m.

b) The effect of simvastatin on expression of genes involved in cell proliferation

Besides genes involved in lipid metabolism, and consistent with reported antiproliferative effects of statins, simvastatin treatment affected expression of a large number of genes implicated in cell cycle regulation, DNA replication or cell signaling, including MAP kinase signaling pathway. Simultaneously, the genes involved in apoptosis and autophagy have been found to be differentially expressed (see Table 3, for detailed list of genes, see ArrayExpress database, accession number E-MTAB-1501).

Validation of gene expression changes was performed using quantitative RT-PCR (see results in Additional file 1).

Discussion

Present study demonstrates that the exposure of human embryonic kidney cells HEK-293T as well as pancreatic

cancer cells MiaPaCa-2 to simvastatin, a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, results in increased accumulation of intracellular LDs. As LDs play role in many important developmental processes including proliferation, apoptosis, growth arrest and necrosis, our data seems to be in line with the effect of statins on lipid metabolism and cancer development [14].

It was previously described that LDs contain predominantly TG and CE [14]. Based on this data, a decrease of intracellular LDs after inhibition of mevalonate pathway by simvastatin was expected. However, the intracellular amount of LDs in both noncancerous HEK 293T as well as malignant pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells increased after the exposure to simvastatin.

To account for this phenomenon, we quantified the cholesterol content in studied cells. Surprisingly, the intracellular cholesterol did not differ between statin-exposed

Table 1 Cholesterol content in MiaPaCa-2 exposed to simvastatin

	Control	Simvastatin-treated	% Control	P-value
Total cholesterol [nmol]	97 ± 7	91 ± 6	94%	NS
Free cholesterol [nmol]	98 ± 8	93 ± 7	95%	NS
P-value	NS	NS	-	-

Cells were exposed to simvastatin (12 μ M) for 48 hrs. Data represent the mean of triplicate determinations \pm SD; NS, not significant.

Table 2 The effect of simvastatin on expression of genes involved in lipid metabolism in MiaPaCa-2 cells

Gene symbol	Product name and related functional pathway	RefSeq ID	Fold change after simvastatin		FDR
			6 μ M	12 μ M	
<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase (EC 2.3.3.10) Mevalonate pathway (cholesterol synthesis)	NM_002130.6	3.48	3.63	3.3×10^{-8}
<i>HMGCR</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (EC 1.1.1.34) Mevalonate pathway (cholesterol synthesis)	NM_000859.1	2.58	3.11	2.1×10^{-6}
<i>MVD</i>	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase (EC 4.1.1.33) Mevalonate pathway (cholesterol synthesis)	NM_002461.1	2.31	2.39	3.4×10^{-7}
<i>PPAP2A</i>	Phosphatidic acid phosphatase 2a (EC 3.1.3.4) Kennedy pathway (triaclylglycerol synthesis)	NM_003711.2	1.79	2.25	3.3×10^{-5}
<i>AGPAT2</i>	1-acyl-glycerol-phosphate acyltransferase 2 (EC 2.3.1.51) Kennedy pathway (phospholipids and glycerolipids synthesis)	NM_006412.3	1.71	2.01	5.0×10^{-5}
<i>ACSS2</i>	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (EC 6.2.1.1) Activation of long chain fatty acids	NM_018677.2	2.16	2.22	1.7×10^{-6}
<i>ABCA7</i>	ABC transporter sub-family A member 7 Transporter involved in cholesterol and lipid homeostasis	NM_019112.3	1.67	2.03	2.3×10^{-5}

Simvastatin used in concentration 6 and 12 μ M, 24 hrs exposure. Presented are only transcripts with FC > 2.0 or < 0.5 and FDR < 0.05. For full list of differentially regulated transcripts see the ArrayExpress database, accession number E-MTAB-1501.

compared to untreated cells indicating that accumulation of other lipids must be responsible for our observation.

In fact, the expression analysis revealed up-regulation of multiple genes involved in lipid metabolism. The up-regulated *ABCA7* gene coding for transporter involved in cholesterol and lipid homeostasis is likely to enhance the cholesterol uptake from medium in the cholesterol-depleted cells. This is consistent with the observation that in most cell lines the numbers of LDs are largely determined by the composition of the culture medium [22]. This correlates with the fact that all nucleated cells tightly regulate their intracellular free cholesterol concentrations not only through the endogenous cholesterol synthesis,

but also through LDL-receptor and ABC transporters-mediated cholesterol transport [23,24]. Similarly, Iwamoto et al. concluded that cholesterol depletion induced the up-regulation of *ABCA7* gene expression [25].

However, the amount of intracellular LDs increased also in the cells treated with simvastatin in FBS free medium suggesting that *de novo* lipid synthesis must be responsible for this phenomenon in the cells cultured in cholesterol-depleted cultivation medium. Our observations correlate with the conclusion of Williams et al., who observed an accumulation of LDs in keratinocytes cultivated in serum free medium supplemented with lovastatin [26].

As noted before, the second major component of intracellular LDs are TGs. Enhanced TGs synthesis might thus account for the increase of intracellular LDs in the simvastatin-treated cells in an effort to balance constant amount of soluble cytoplasmic fatty compounds while keeping a constant level of cholesterol.

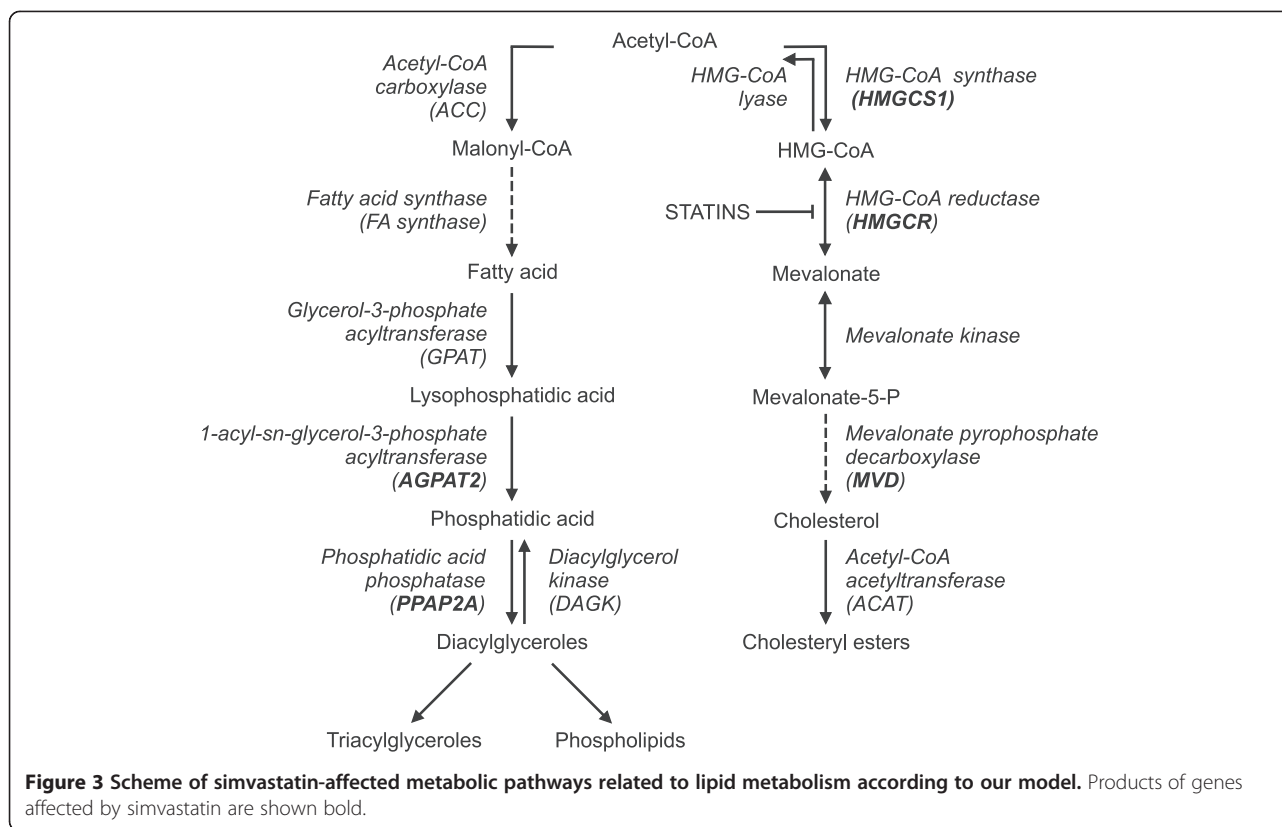
Indeed, apart from up-regulation of *ABCA7* lipid transporter gene, simvastatin substantially induced also genes involved in TG and phospholipid *de novo* biosynthesis (Figure 3); which is in accord with the explanation suggested above for the accumulation of LDs in the simvastatin-treated cells.

HMG-CoA synthase, which catalyzes condensation of acetyl-CoA with acetoacetyl-CoA to form HMG-CoA, is up-regulated (Figure 3). The reduction of HMG-CoA to mevalonate by HMGCR is inhibited by the simvastatin; in turn, molecules of HMG-CoA accumulate in the cell and inhibit HMG-CoA synthase by a feedback product inhibition (Figure 3). Consequently, the acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA accumulate in the cells providing a high

Table 3 The effect of simvastatin on metabolic pathways of human pancreatic cancer cells MiaPaCa-2

Path ID	Path name	FDR
hsa00100	Biosynthesis of steroids	1.1×10^{-12}
hsa04110	Cell cycle	1.4×10^{-9}
hsa01430	Cell communication	1.1×10^{-6}
hsa03030	DNA replication	1.2×10^{-6}
hsa04010	MAPK signaling pathway	2.0×10^{-4}
hsa00230	Purine metabolism	8.0×10^{-4}
hsa03430	Mismatch repair	1.0×10^{-3}
hsa00190	Oxidative phosphorylation	1.0×10^{-3}
hsa03440	Homologous recombination	1.0×10^{-3}

Simvastatin used in concentration 6 and 12 μ M, 24 hrs exposure. FDR < 0.001 was used as a cut-off value. Data based on KEGG pathway analysis, FDR- false discovery rate. For detailed list of genes, see the ArrayExpress database, accession number E-MTAB-1501.



pool of acetyl-CoA that could serve as a basic building component of TG (Figure 3).

We have not observed changes in expression of genes encoding two key enzymes involved in cytosolic fatty acid biosynthesis; namely acetyl-CoA carboxylase (ACC), which converts acetyl CoA to malonyl CoA and fatty acid synthase (FA synthase) (Figure 3) (data not shown). However other genes, namely *PAP2a* and *AGPAT2*, required for *de novo* TG and phospholipids synthesis were upregulated after cells treatment by higher doses of simvastatin (Table 2). These two enzymes catalyze reactions downstream to the rate limiting step of the mentioned routes (Figure 3). The simvastatin induced increase of TGs and phospholipids synthesis may also explain the aforementioned up-regulation of *ABCA7* gene, because *ABCA7* modulates not only cholesterol levels but also phospholipid release by apolipoproteins in cell cultures [27-29].

Recently, Boren and Brindle observed that induction of apoptosis resulted in rapid accumulation of cytoplasmic LDs and was accompanied by an increase of *de novo* neutral lipid synthesis, most likely due to the inhibition of mitochondrial fatty acid β -oxidation. They showed that the formation of cytoplasmic LDs was caused by an apoptosis-induced mitochondrial dysfunction [30], a phenomenon affected by simvastatin also in our studies.

Simultaneously, simvastatin was able to modulate expression of a wide array of genes implicated in cell cycle

regulation and signaling. It remains to be answered whether these effects are independent or are functionally associated with the accumulation of LDs. As LDs are supposed to be derived from the ER membrane [12,14] that serves as a pool of many enzymes required for lipid metabolism as well as the programmed cell death [30,31], accumulated intracellular LDs in statin-treated cells might be rather effectors of some pleiotropic effects of statins than only by-standing phenomenon with no biological relevance.

In conclusion, simvastatin treatment led to accumulation of cytosolic LDs within both non-cancerous as well as malignant cells, a phenomenon which might contribute to their antiproliferative effects.

Methods

Cell cultures and simvastatin treatment

Human embryonic kidney (HEK-293T) and pancreatic cancer cells (MiaPaCa-2, both cell lines from ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained and grown in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell viability was assessed by 0.4% trypan blue staining. Simvastatin was added at concentrations equal to its IC₅₀ value for MiaPaCa-2 (12 μ M) as reported previously [10] 24 hrs post-inoculation of the cells. For DNA microarray analyses also 6 μ M concentrations of simvastatin were

used. For all studies, pure form of simvastatin was used (Enzo Life Sciences, NY).

Lipid droplets staining

Two neutral lipid dyes, Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) and BODIPY[®] 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3 α ,4 α -diazas-indacene) were used for lipid staining. The stock solutions (1.0 mg/ml) in methanol were stored frozen (-20°C) in dark. Staining was carried out in fixed cells (4% formaldehyde, 20 minutes). The dye was added directly to the fixed cells to a final concentration of 10 ng/ml and incubated for 10 minutes. The dye was carefully washed out using PBS prior to microscopy. LDs were then visualized by fluorescence microscopy using QuickPHOTO CAMERA 2.1 processing software (Olympus, Tokyo, Japan).

Quantification of cellular cholesterol content in MiaPaCa-2 cells exposed to simvastatin

The cellular cholesterol content in MiaPaCa-2 cells exposed to simvastatin (12 μM) [10] 24 hrs post-inoculation of MiaPaCa-2 cells were quantified using isotope dilution-gas chromatography–mass spectrometry (ID-GC-MS). The amounts of the total (free cholesterol and cholesterol ester) and free cholesterol were analyzed after additional 48 hrs of incubation (in triplicate) to determine the amount and form of cholesterol present in the cells exposed to simvastatin. The cell pellet was mixed with D6-cholesterol (internal standard, 50 mg/l) (Medical Isotopes, Inc, Pelham, AL, USA), resuspended in ethanol with 9 M KOH and incubated at 37°C for 3 hrs for complete hydrolysis of cholesterol esters. The samples were then diluted with water and extracted into hexane. The organic phase was evaporated at 60°C under a stream of nitrogen. Dried samples were reconstituted in N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (TMA) (Merck) and silylated 30 minutes at room temperature. Relative concentrations of resulting cholesterol trimethylsilylethers were determined using gas chromatography (Agilent 6890, Agilent, USA) coupled with a quadrupole mass detector (Agilent 5973, Agilent, USA). Analytical conditions were: splitless injection, inlet temperature 300°C , column HP 5MS, temperature gradient from 200°C to 300°C - $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, column flow 1 ml/min, electron impact ionization at 70 mV, single ion monitoring at 458.4 and 464.4. Absolute intracellular cholesterol levels were calculated from calibration curves using purified cholesterol standard (Sigma-Aldrich, USA). The cholesterol content of simvastatin treated MiaPaCa-2 cells was normalized to the cell number in the sample.

Cholesterol content is expressed as mean \pm SD. The differences between values acquired were evaluated by Student's t-test. Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05.

DNA microarray analysis

The effect of 6 and 12 μM concentrations of simvastatin on MiaPaCa-2 pancreatic cancer cell gene expression was investigated 24 h post-inoculation. Cells from two parallel cultivations (10 cm^2 cultivate dish) were lysed in the stage of subconfluency using the RLT lysis buffer supplied in RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Total RNA was isolated by RNeasy Micro Kit (QIAGEN, USA) according to the procedure for animal cells. Quantity of the RNA was measured on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies LLC, USA). Quality of the RNA was analyzed on Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, USA). The RNA samples had RIN (RNA integrity number) above 9.

Illumina Human-6 v2 Expression BeadChip (Illumina, USA) was used for the microarray analysis following the standard protocol. Total RNA (150 ng) was amplified using Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, USA) and 15 microgram of amplified RNA was hybridized on the chip according to the manufacturer's protocol. All subsequent analyses were done on two biological replicates.

The raw data (TIFF image files) was analyzed with *beadarray* package [32] of the *BioConductor* within the *R* environment [33]. All hybridizations passed quality control. The data was background corrected and normalized with the probe level quantile method. Before detection of differential expression, the probes with intensity level lower than 95-percentile of negative controls of the BeadChip in all samples were disregarded from the analysis. Probes with low variation across samples estimated by the inter-quartile range irrespective of the sample group were disregarded as well. Differential expression was detected using the moderated t-test of the *limma* package [34] on intensities that were variance-stabilized by logarithmic transformation. Annotation of the transcripts differentially expressed between simvastatin treated and the control cultures was done using the manifest file provided by the manufacturer (HumanWG-6_V2_0_R2_11223189_A.bgx; Illumina, USA). The transcripts with false discovery rate (FDR) [35] smaller than 0.05 and fold change smaller than 0.5 or higher than 2 were reported and used in the downstream analysis. The results were deposited to the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-1501. Further, we performed the gene set enrichment analysis (GSEA) on KEGG pathways [36] using the Fisher's exact test and the approach of Tian [37].

Quantitative real-time PCR

Reverse transcription was performed by QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., USA). The qRT-PCR was performed on LightCycler 2.0 System using LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany) and results were analyzed

by LightCycler software. Crossing point values were further determined using the R environment [33]. Detailed description of the analysis and the list of amplicons/primers of target and housekeeping genes are provided in ArrayExpress database, accession number E-MTAB-1501.

Additional file

Additional file 1: Validation of gene expression changes performed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: HG, LV, TR, MŠ. Performed microscope experiments: MŠ, IV, LL, HG. Performed HPLC: JZ. Performed gene expression analysis: HS, MK. Analyzed, interpreted the data and drafted manuscripts: HG, TR, LV, DB. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, for the project CZ.1.07/2.3.00/30.0060 supported by the European Social Fund, to the Czech Ministry of Health for the grant No. NT 13112-4/2012 and to the Ministry of Education, Science, Research and Sport of Slovak Republic for the grant No. VEGA 1/0407/13.

Author details

¹Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. ²Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic. ³Institute of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Martin, Slovakia. ⁴Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. ⁵Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ⁶Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic. ⁷Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. ⁸Current affiliation: Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

Received: 25 June 2013 Accepted: 11 August 2013

Published: 21 August 2013

References

- Endo A, Kuroda M, Tanzawa Y: Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 1976, **72**:323–326.
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A: Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000, **32**:164–176.
- Vitek L, Leniček M: Cytoprotective and antiproliferative effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Cur Enz Inhib* 2006, **2**:261–280.
- Boguski MS, McCormick F: Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993, **366**:643–654.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. *Cell* 1998, **53**:549–554.
- Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP: Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 2007, **56**:1134–1152.
- Bonovas S, Filioussi K, Tsantes A, Sitaras NM: Use of statins and risk of haematological malignancies: a meta-analysis of six randomized clinical trials and eight observational studies. *Br J Clin Pharmacol* 2007, **64**:255–262.
- Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM: Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol* 2008, **103**:2646–3651.
- Vitek L: Statins and pancreatic cancer: are all statins the same? *Am J Gastroenterol* 2009, **104**:525.
- Gbelcová H, Leniček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Kudla M, Balaž P, Ruml T, Vitek L: Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2008, **122**:1214–1221.
- Martin S, Parton R: Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:373–378.
- Ploegh HL: A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 2007, **448**:435–438.
- Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ: Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* 2006, **119**:4215–4224.
- Murphy DJ: The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001, **40**:325–438.
- Di Vito M, Lenti L, Knijn A, Iorio E, D'Agostino F, Molinari A, Calcabrini A, Stringaro A, Meschini S, Arancia G, Bozzi A, Strom R, Podo F: 1H NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Biochim Biophys Acta* 2001, **1530**:47–66.
- Hakumäki JM, Kauppinen RA: 1H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci* 2000, **25**:357–362.
- Goldstein JL, Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990, **343**:425–430.
- Leung DW: The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci* 2001, **6**:D944–D953.
- Carman GM, Han GS: Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem* 2009, **284**(5):2593–2597.
- Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT: Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 2001, **276**(14):11420–11426.
- Abe-Dohmae S, Ikeda Y, Matsuo M, Hayashi M, Okuhira K, Ueda K, Yokoyama S: Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004, **279**(1):604–611.
- Spector AA, Mathur SN, Kaduce TL, Hyman BT: Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. *Prog Lipid Res* 1980, **19**:155–186.
- Grundy SM: Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu Rev Nutr* 1983, **3**:371–396.
- Kiechl S, Willeit J: The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:1484–1490.
- Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Sato R, Yokoyama S: ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. *J Lipid Res* 2006, **47**:1915–1927.
- Williams ML, Menon GK, Hanley KP: HMG-CoA reductase inhibitors perturb fatty acid metabolism and induce peroxisomes in keratinocytes. *J Lipid Res* 1992, **33**(2):193–208.
- Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Munehira Y, Aoki R, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Amachi T, Kioka N, Matsuo M: Posttranscriptional regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I-dependent lipid release. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**:313–318.
- Hayashi M, Abe-Dohmae S, Okazaki M, Ueda K, Yokoyama S: Heterogeneity of high density lipoprotein generated by ABCA1 and ABCA7. *J Lipid Res* 2005, **46**:1703–1711.
- Abe-Dohmae S, Kato KH, Kumon Y, Hu W, Ishigami H, Iwamoto N, Okazaki M, Wu C, Tsujita M, Ueda K, et al: Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner. *J Lipid Res* 2006, **47**:1542–1550.
- Boren J, Brindle KM: Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ* 2012, **19**:1561–70.
- Singh R, Cuervo AM: Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012, **2012**. Article ID 282041, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/282041>.
- Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, Tavaré S: Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* 2007, **23**:2183–2184.
- R Development Core Team (2007) R: A Language and environment for statistical Computing R foundation for statistical computing. Vienna, Austria; 2007. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.r-project.org>.

34. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: **Use of within-array replicates spots for assessing differential expression in microarray experiments.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2067–2075.
35. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995, **57**(1):289–300.
36. Kanehisa M, Goto S: **KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:27–30.
37. Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ: **Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:13544–13549.

doi:10.1186/1476-511X-12-126

Cite this article as: Gbelcová *et al.*: The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. *Lipids in Health and Disease* 2013 **12**:126.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Protinádorové účinky statinů na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu

Anticancer effect of statins on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma

Helena Gbelcová¹, Martin Leníček², Jaroslav Zelenka², Tomáš Krechler³, Zdeněk Knejzlík¹, Gabriela Dvořáková¹, Marie Zadinová⁴, Pavla Poučková⁴, Tomáš Ruml¹, Libor Vítek^{2,3}

¹Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

²Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK, Praha

³IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

⁴Ústav lékařské biofyziky 1. LF UK, Praha

SOUHRN

Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Krechler T, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Ruml T, Vítek L. Protinádorové účinky statinů na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu

Cíl studie: Inhibitory HMG-CoA reductázy (statiny) se běžně používají pro léčbu hypercholesterolemie. Jejich inhibiční účinek na HMG-CoA reductázu však vede také k depleci biosyntetických meziproduktů uplatňujících se v buněčné proliferaci. Cílem této studie bylo analyzovat potenciální antiproliferační účinky jednotlivých statinů na experimentální karcinom pankreatu.

Materiál a metodika: V *in vitro* experimentech na třech buněčných liniích lidského adenokarcinomu pankreatu byly studovány účinky sedmi statinů. *In vivo* studie byly provedeny na athymických myších xenotransplantovaných buňkami lidského karcinomu pankreatu CAPAN-2. Zvířata byla léčena jednotlivými statiny v denní dávce odpovídající hypocholesterolemické dávce u člověka. Sledován byl účinek statinů na přežívání zvířat a progresi nádorů.

Výsledky: V *in vitro* i *in vivo* studiích byly zjištěny výrazné protinádorové účinky téměř všech statinů. Nejúčinnějším statinem v *in vitro* experimentech byl simvastatin a cerivastatin, a tyto účinky byly potvrzeny i v *in vivo* studiích dle Kaplanovy-Meierovy analýzy přežívání ($p = 0,0006$ pro oba statiny). Podobně silné antiproliferační účinky byly pozorovány *in vivo* také pro rosuvastatin ($p = 0,0006$) a fluvastatin ($p = 0,0008$).

SUMMARY

Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Krechler T, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Ruml T, Vítek L. Anticancer effect of statins on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma

The aim of the study: HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are widely used for treatment of hypercholesterolemia. However, their inhibitory action on HMG-CoA reductase results also in depletion of intermediates contributing importantly to the cell proliferation. The aim of the present study was to compare the effects of individual statins on experimental pancreatic cancer.

Material and methods: The effects of seven individual statins on proliferation of three human pancreatic cancer cell lines were evaluated *in vitro*. The *in vivo* studies were performed on nude mice xenotransplanted with CAPAN-2 human pancreatic cancer cells. The mice received oral treatment either with placebo, or statins mentioned above in a daily dose corresponding to hypocholesterolemic dose in humans. The primary endpoints were a survival rate and tumor size.

Results: Substantial antiproliferative effects of all statins were detected both *in vitro* and *in vivo*. Simvastatin and cerivastatin were the most efficient compounds *in vitro* and these effects were also paralleled *in vivo* as confirmed by Kaplan-Meier survival analysis ($p=0.0006$ for both statins). Similarly potent *in vivo* antiproliferative effects were observed also for rosuvastatin ($p = 0.0006$) and fluvastatin ($p = 0.0008$).

Závěr: Studie poukazuje na významné inhibiční účinky různých statinů na progresi experimentálního adenokarcinomu pankreatu. Získané výsledky naznačují velký potenciál statinů pro chemo-adjuvantní léčbu zhoubných nádorů pankreatu.

Klíčová slova: farnesylace – HMG-CoA reduktáza – cholesterol – K-ras onkogen – karcinom pankreatu – mevalonát – proliferace – statiny.

Conclusion: This study demonstrates substantial inhibitory effects of various statins on progression of experimental pancreatic adenocarcinoma. These results support great potential of statins for chemo-adjuvant treatment of pancreatic cancer.

Key words: farnesylation – HMG-CoA reductase – cholesterol – K-ras oncogene – pancreatic cancer – mevalonate – proliferation – statins.

ÚVOD

Inhibitory hydroxymethylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktázy (statiny) se běžně používají pro léčbu hypercholesterolemie. Účinky statinů na lidský organismus jsou však pleiotropní a zahrnují inhibiční působení na tvorbu aterogenního plátu, agregaci krevních destiček, nebo zlepšení funkce endotelu a fibrinolytické aktivity, či dokonce přímé protektivní účinky statinů na mortalitu u akutního infarktu myokardu^(1,2). Inhibice HMG-CoA reduktázy vede navíc k depleci několika důležitých meziproduktů, jako jsou farnesylpyrofosfát (FPP) a geranylgeranylpyrofosfát (GGPP), které modifikují některé intracelulární proteiny⁽³⁾ uplatňující se v mnoha mitogenních signálně transdukčních drahách⁽⁴⁾. Z těchto důvodů se jeví inhibice farnesylation/geranylgeranylation jako možný přístup pro léčbu některých nádorových onemocnění. Antiproliferační účinky statinů byly v posledních letech popsány v řadě *in vitro* i *in vivo* studií s buněčnými liniemi hepatocelulárního karcinomu⁽⁵⁾, karcinomu plic⁽⁶⁾, kolorektálního⁽⁷⁾ nebo pankreatického karcinomu⁽⁸⁻¹³⁾. Z tohoto pohledu je karcinom pankreatu obzvláště zajímavý, protože více než 90 % těchto nádorů nese aktivační mutace v K-ras protoonkogenu⁽¹⁴⁾, ústící v nekontrolovanou fosforylaci mitogenních intracelulárních proteinů. Pro funkci produktu K-ras protoonkogenu je nezbytná farnesylation, což je posttranslační modifikace ukotvující tento protein v buněčné membráně. Inhibice farnesylation, například statiny, se tedy jeví jako možný terapeutický přístup pro tyto nádory.

Protinádorové účinky statinů byly prokázány i v humánních studiích zaměřených primárně na posouzení potenciálních antiproliferačních účinků statinů^(15,16), stejně tak jako v několika dalších epidemiologických studiích primárně zaměřených na prevenci kardiovaskulárních chorob a jejich komplikací⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Antiproliferační účinky byly popsány pro všechny statiny, nicméně některé práce naznačují, že jednotlivé statiny mají odlišný protinádorový potenciál. Wong et al.⁽²⁰⁾ popsali ve studii s buňkami akutní myeloidní leukémie významně vyšší inhibiční účinn

ky cerivastatinu ve srovnání s lovastatinem, atorvastatinem a fluvastatinem. V jiné *in vitro* studii na leukemických buněčných liniích byl simvastatin nejúčinnějším statinem, zatímco pravastatin měl účinek nejslabší⁽²¹⁾. Podobné výsledky byly demonstrovány také u osteosarkomových buněčných linií léčených simvastatinem nebo pravastatinem⁽²²⁾. Odlišné antiproliferační účinky statinů mohou být způsobeny rozdíly v jejich struktuře, farmakokinetice i stupni biotransformace⁽²³⁾.

Přestože statiny byly intenzivně studovány jako možná chemoterapeutika, komplexní data týkající se rozdílů v jejich protinádorových účincích neexistují. Cílem naší studie proto bylo na *in vitro* a *in vivo* experimentálních modelech porovnat účinky různých statinů na růst a proliferaci karcinomu pankreatu.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál

Pro *in vitro* studie byly použity chemicky čisté formy následujících statinů: pravastatin, atorvastatin, lovastatin, fluvastatin, rosuvastatin, cerivastatin (Alexis, USA) a simvastatin (MSD, USA). Mevalonát, FPP, a GGPP byly získány od společnosti Sigma (USA). Pro *in vivo* studie byly použity komerčně dostupné terapeutické preparáty těchto statinů: pravastatin (0,5 mg/kg/d, Lipostat, Bristol-Myers Squibb, USA), atorvastatin (0,5 mg/kg/d, Sortis, Pfizer, USA), lovastatin (1 mg/kg/d, Mevacor, MSD, USA), simvastatin (0,5 mg/kg/d, Zocor, MSD, USA), cerivastatin (0,25 mg/kg/d, Cholstat, Laboratories Fournier, Francie) a fluvastatin (0,5 mg/kg/d, Lescol, Novartis, Švýcarsko).

Tkáňové kultury

Pro *in vitro* studie byly použity následující buněčné kultury lidského adenokarcinomu pankreatu: CAPAN-2 (dobře diferencovaný adenokarcinom, ATCC, USA), Mia PaCa-2 (špatně diferencovaný adenokarcinom, ATCC), obě linie s aktivačními mutacemi v kodónu 12 K-ras protoonkogenu⁽¹⁰⁾,

a BxPC-3 (středně diferencovaný adenokarcinom bez aktivační mutace v *K-ras* protoonkogenu, ATCC)⁽²⁴⁾. Buněčné linie byly kultivovány v humidifikované atmosféře obsahující 5% CO₂ při teplotě 37 °C v následujících médiích suplementovaných 10% fetálním hovězím sérem: MiaPaCa-2 v DMEM, BxPC-3 v RPMI 1640 médiu a CAPAN-2 v McCoy's 5A médiu s L-glutaminem (1,5 mM) a bikarbonátem sodným (1,5 g/l).

Pro inokulaci byla použita suspenze zhruba 3x10⁴ buněk ve 2 ml média. O 24 hodin později byly přidány statiny ze zásobních roztoků v metanolu (20 µl na jamku) ve finálních koncentracích 0,5; 1; 5; 20 a 50 mg/l. Pro negativní kontroly bylo použito 20 µl metanolu. Destičky byly inkubovány po dobu 3 dnů. Po 24, 48 a 72 hodinách inkubace se statiny byly buňky promyty PBS, uvolněny 0,25% trypsinem, sklizeny a posléze resuspendovány. Růst buněk a jejich viabilita byly posuzovány počítáním buněk exkludujících 0,4% trypanovou modř. Všechny experimenty byly provedeny v tripletu.

Animální studie

In vivo studie byly provedeny na athymických myších (n = 6 v každé léčebné skupině) (kmen CD-1, Charles River WIGA, Německo) xenotransplantovaných subkutánně buňkami lidského adenokarcinomu pankreatu CAPAN-2 (10⁷ buněk). Po přihojení a iniciaci nádorového růstu (7–10 dnů po xenotransplanci, velikost nádoru na začátku léčby 0,27±0,04 cm³) byla zahájena léčba placebem (fyziologický roztok), nebo statiny používanými v humánní medicíně uvedenými výše v denní dávce přibližně odpovídající hypocholesterolemické dávce u člověka. Statiny byly podávány jedenkrát denně žaludeční sondou ve formě vodné suspenze. Primárním parametrem byla doba přežívání zvířat, současně byla analyzována progresa nádorů měřením jejich velikosti ve dvou největších, na sebe kolmých průměrech každý třetí den⁽²⁵⁾.

Studie na zvířatech byly schváleny Komisí pro práci se zvířaty 1. LF UK v Praze.

Statistická analýza

Data jsou prezentována jako medián a 25–75% rozmezí. Účinek statinů na přežívání zvířat byl hodnocen standardní neparametrickou analýzou (Mann-Whitney Rank Sum test) i Kaplanovou-Meierovou analýzou přežívání s Holm-Sidak post-hoc testováním. Rozdíly v průměrné velikosti nádorů byly hodnoceny variační analýzou s opakovanými měřeními (RM ANOVA) s Holm-Sidak post-hoc testováním. V případě potřeby (požadavek na normalitu a stejnou variaci dat) byla pro srovnání provedena logaritmická transformace dat. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při p < 0,05.

VÝSLEDKY

Inhibiční účinky jednotlivých statinů na růst buněčných linií adenokarcinomu pankreatu

Protinádorové účinky jednotlivých statinů byly analyzovány v *in vitro* experimentech na třech buněčných liniích lidského adenokarcinomu pankreatu. Nejsilnější inhibiční účinky byly prokázány pro cerivastatin a simvastatin, zatímco nejslabší účinky byly pozorovány pro pravastatin a rosuvastatin (tab. 1 a 2). Přítomnost mevalonátu, stejně tak jako FPP či GGPP významně oslabila protinádorový účinek všech statinů (tab. 2). Po přidání mevalonátu v koncentraci daleko přesahující koncentrace statinů byl jejich antiproliferační účinek zcela eliminován, zatímco ekvimolární koncentrace mevalonátu měly efekt pouze částečný (tab. 2).

Tab. 1. Účinek jednotlivých statinů na růst buněčných linií lidského adenokarcinomu pankreatu

Table 1. The effect of each statin on the growth of cell lines of human pancreatic adenocarcinoma

	CAPAN-2 IC50 (µmol/l)	MiaPaca-2 IC50 (µmol/l)	BxPc-3 IC50 (µmol/l)
rosuvastatin	39	36	56
pravastatin	27	29	39
atorvastatin	22	27	37
fluvastatin	21	26	29
lovastatin	16	13	33
simvastatin	14	12	26
cerivastatin	12	10	22

Buňky byly kultivovány 24 hodin v přítomnosti jednotlivých statinů.

Účinky jednotlivých statinů na růst a proliferaci buněk lidského adenokarcinomu CAPAN-2 xenotransplantovaných atymických myších

Všechny použité statiny signifikantně prodloužily přežívání myši s xenotransplantovaným lidským karcinomem pankreatu. Zatímco medián přežívání zvířat léčených placebem byl 31,5 (25–75%; 29–32) dnů, myši léčené pravastatinem přežily 39,5 (36–42) dnů (p = 0,01) ve srovnání s 39 (36–45) (p = 0,04) a 42 (39–44) dny (p = 0,002) ve skupinách léčených atorvastatinem a simvastatinem. Nejdelší přežívání bylo pozorováno u myši léčených cerivastatinem (106,5 (47–122) dnů, p = 0,002) a rosuvastatinem (104,5 (65–122) dnů, p = 0,002). Významné protinádorové účinky byly zaznamenány také u skupiny léčené fluvastatinem (56 (42–246) dnů, p = 0,009), kde ve dvou případech došlo dokonce ke kompletní remisi nádorového onemocnění. Parciální regrese nádorů byly pozorovány také u několika myši léčených cerivastatinem a rosuvastatinem.

Tab 2. Efekt mevalonátu, FPP, a GGPP na antiproliferační účinky**Table 2.** The effect of mevalonate, FPP and GGPP on anti-proliferative function

	CAPAN-2 (% z počtu kontrolních buněk)	MiaPaca-2 (% z počtu kontrolních buněk)	BxPc-3 (% z počtu kontrolních buněk)
mevalonát 17 μ M	76	–	–
mevalonát 600 μ M	98	92	81
FPP	103	–	–
GGPP	133	–	–
pravastatin	88	91	88
pravastatin + mevalonát 17 μ M	91	–	–
pravastatin + mevalonát 600 μ M	98	112	87
prava + FPP	90	–	–
prava + GGPP	115	–	–
lovastatin	6	2	9
lovastatin + mevalonát 17 μ M	32	–	–
lovastatin + mevalonát 600 μ M	86	93	90
lovastatin + FPP	56	–	–
lovastatin + GGPP	79	–	–
atorvastatin	1	0	8
atorvastatin + mevalonát 17 μ M	23	–	–
atorvastatin + mevalonát 600 μ M	91	71	79
atorvastatin + FPP	59	–	–
atorvastatin + GGPP	76	–	–
simvastatin	0	0	5
simvastatin + mevalonát 17 μ M	10	–	–
simvastatin + mevalonát 600 μ M	78	84	85
simvastatin + FPP	29	–	–
simvastatin + GGPP	75	–	–
fluvastatin	3	0	6
fluvastatin + mevalonát 17 μ M	55	–	–
fluvastatin + mevalonát 600 μ M	105	99	67
fluvastatin + FPP	41	–	–
fluvastatin + GGPP	62	–	–

Buňky byly kultivovány 72 hodin v přítomnosti výše uvedených látek (koncentrace statinů = 30 μ M, FPP, GGPP = 17 μ M).

tatinem. Také Kaplanova–Meierova analýza přežívání prokázala nejdelší přežívání u zvířat léčených rosuvastatinem, cerivastatinem, fluvastatinem a simvastatinem (obr. 1). I mezi těmito nejúčinnějšími statiny byly pozorovány značné rozdíly v přežívání.

Stupeň přežívání velmi dobře koreloval s progresí nádorů během prvních 31 dnů po zahájení léčby, která byla zřetelně snížena u statiny léčených zvířat (obr. 2). Detailní analýza velikosti nádorů prokázala, podobně jako u výsledků přežívání, signifikantní rozdíly mezi jednotlivými statiny s nejlepšími výsledky ve skupinách léčených fluvastatinem a ceri-

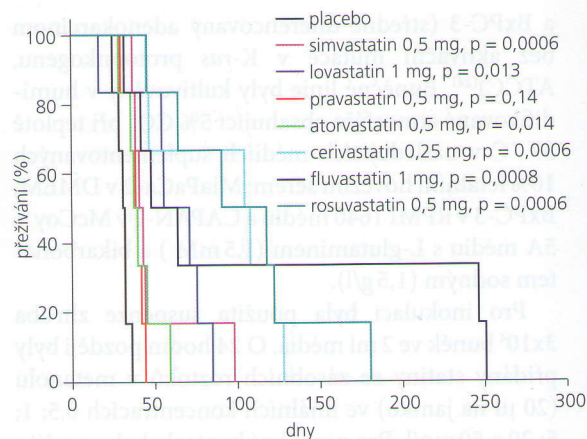
**Obr. 1.** Účinek statinů na přežívání athymických myši s xenotransplantovaným lidským karcinomem pankreatu (buněčná linie CAPAN-2) – dávka na kg tělesné váhy

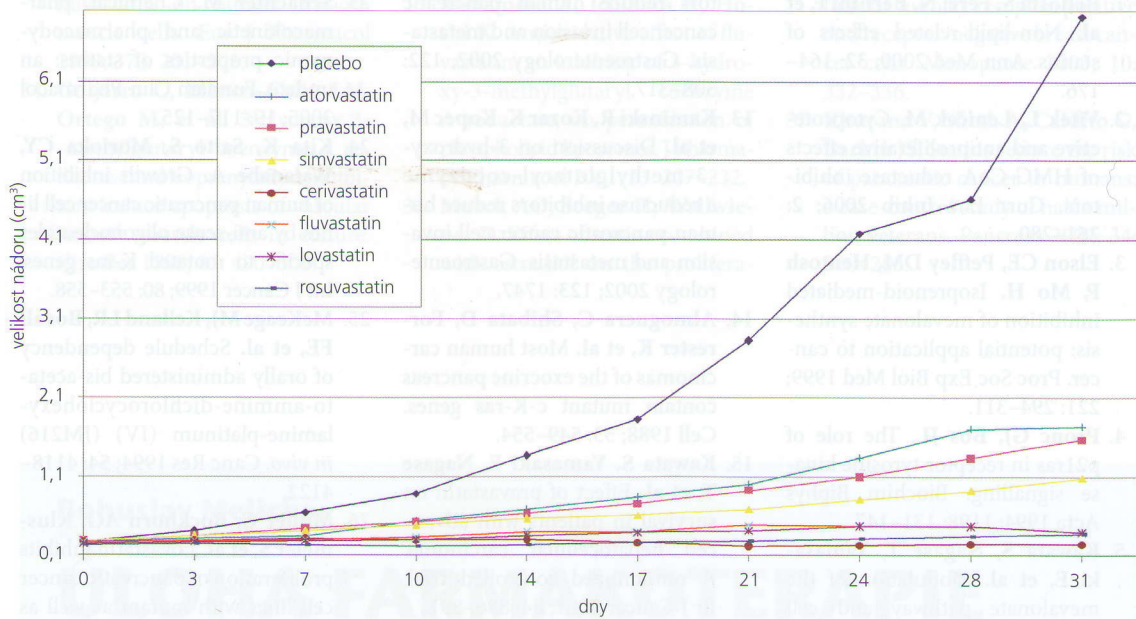
Fig. 1. The influence of statins to the survival of athymic mouse with xenotransplanted human pancreatic carcinoma (cell line CAPAN-2) – the dose for 1 kg of body weight

vastatinem (obr. 2). Léčba cerivastatinem, rosuvastatinem a fluvastatinem zastavila progresi nádoru, zatímco ve všech dalších léčených skupinách byla progresse nádorů pouze zpomalena.

DISKUZE

Statiny jsou intenzivně studovanými léky, zejména pro jejich hypocholesterolemické účinky. Jejich působení je však pleiotropní a zahrnuje potenciálně vysoké a klinicky relevantní protinádorové účinky. Antiproliferační účinky statinů byly skutečně popsány u celé řady experimentálních nádorů včetně karcinomu pankreatu^(8–13,26–29). První studie týkající se účinku statinů na karcinom pankreatu byla publikována již v roce 1992 japonskými autory⁽⁸⁾, kteří popsali významné antiproliferační účinky lovastatinu na špatně i dobře diferencované buněčné linie karcinomu pankreatu za podmínek *in vitro* i *in vivo*. V animální studii však byly použity extrémně vysoké koncentrace lovastatinu (60 mg/kg tělesné váhy)⁽⁸⁾. Podobné účinky lovastatinu na karcinom pankreatu byly popsány také ve studii Mikulského a kolegů⁽⁹⁾ a také v dalších dvou *in vitro* studiích, kde bylo prokázáno, že lovastatin inhibuje proliferaci karcinomu pankreatu dokonce i při absenci aktivačních mutací v *K-ras* protoonkogenu^(10,11).

Popisovaná studie je první studií srovnávající rozdíly v účincích jednotlivých komerčně dostupných statinů na růst a proliferaci lidského karcinomu pankreatu za podmínek *in vitro* i *in vivo*. Všechny použité statiny významně inhibovaly růst všech třech buněčných linií karcinomu pankreatu *in vitro*. Jejich účinnost však byla jednoznačně závislá na typu použitého statinu se značnými rozdíly mezi jednotlivými léky. Tyto inhibiční účinky byly částečně eliminovány současným podáváním mevalo-



Obr. 2. Velikost nádorů po léčbě jednotlivými statiny
Fig. 2. The tumor size after treatment by individual statins

nátu, FPP a GGPP, což potvrzuje přímou souvislost vlivu statinů s proliferací karcinomu pankreatu v důsledku inhibice farnesylace onkogenů. Nejúčinnějšími statiny za podmínek *in vitro* byly cerivastatin a simvastatin. Za podmínek *in vivo* byly podobně silné antiproliferační účinky zjištěny také pro fluvastatin a rosuvastatin (obr. 1). Tento výsledek je velmi zajímavý, jelikož fluvastatin je považován za statin s nejnižším hypocholesterolemickým účinkem⁽³⁰⁾. Značné rozdíly v antiproliferačním účinku mezi jednotlivými statiny mohou být způsobeny mnoha faktory, jako jsou například odchylky v chemické struktuře vedoucí ke změnám v farmakokinetice a farmakodynamice těchto sloučenin⁽²³⁾. Všechny statiny s výjimkou pravastatinu a rosuvastatinu jsou kupříkladu lipofilními látkami, což samozřejmě výrazně ovlivňuje jejich biodostupnost. Není bez zajímavosti, že oba hydrofilní statiny uvedené výše měly za podmínek *in vitro* nejhorší antiproliferační účinky. Dále je známo, že lipofilní statiny lovastatin a simvastatin inhibují HMG-CoA reduktázu také v periferních buňkách, zatímco hydrofilní pravastatin vykazuje tento účinek pouze v hepatocytech⁽³¹⁾. Oproti tomu rosuvastatin, druhý hydrofilní statin, je schopen inhibovat HMG-CoA reduktázu v nehepatálních buňkách s o dva řády vyšší účinností⁽³²⁾, což může mimo jiné vysvětlovat velmi dobré antiproliferační účinky tohoto statinu za podmínek *in vivo*. Navíc je také známo, že lipofilní atorvastatin, fluvastatin, lovastatin a simvastatin mají přímé pro-apoptotické účinky^(33,34), zatímco pravastatin tyto účinky postrádá⁽³⁴⁾. Rozdíly v biologickém chování statinů jsou dále podporovány skutečností, že pravastatin má o dva řády nižší antioxidační účinky než například fluvastatin⁽³⁵⁾. Mezi další faktory, které se mohou podílet

na pozorovaných rozdílech v účinnosti jednotlivých statinů, patří jistě i rozdíly ve vazbě na plazmatické bílkoviny, stejně tak jako v biologickém poločasu⁽²³⁾. Naše výsledky jsou také podporovány *in vitro* studií na buňkách karcinomu prsu, kde byly také popsány rozdíly v antiproliferačních účincích různých statinů. Zajímavé je, že i v této studii byly nejúčinnějšími statiny fluvastatin a simvastatin, zatímco pravastatin neměl inhibiční účinek až do koncentrace 50 μM (36).

ZÁVĚR

Na základě našich výsledků stejně jako dosud publikovaných dat jiných autorů se inhibitory HMG-CoA reduktázy jeví jako potenciální látky pro chemo-adjuvantní léčbu karcinomu pankreatu. Tyto závěry jsou podporovány také velmi slibnými výsledky rozsáhlé, dosud nepublikované studie vlivu statinů na výskyt karcinomu pankreatu na populaci téměř půl milionu amerických válečných veteránů⁽³⁷⁾.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR GIGH 0471-00-3-846.

Došlo: 3. 12. 2006.

Přijato: 15. 1. 2007.

Kontaktní adresa

doc. MUDr. Libor Vitek, PhD, MBA
IV. interní klinika a Ústav klinické biochemie
a laboratorní diagnostiky 1. LF UK A VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2
e-mail: vitek@cesnet.cz

LITERATURA

1. **Bellosta S, Ferri N, Bernini F, et al.** Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000; 32: 164–176.
2. **Vítek L, Leníček M.** Cytoprotective and antiproliferative effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr Enz Inhib* 2006; 2: 261–280.
3. **Elson CE, Peffley DM, Hentosh P, Mo H.** Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 294–311.
4. **Pronc GJ, Bos JL.** The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 131–147.
5. **Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, et al.** Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer* 1994; 69: 1015–1020.
6. **Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, et al.** Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett* 1996; 109: 217–222.
7. **Feleszko W, Jakobisiak M.** Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1198–1199.
8. **Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, et al.** Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology* 1992; 103: 982–89.
9. **Mikulski SM, Viera A, Darzynkiewicz Z, Shogen K.** Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1992; 66: 304–310.
10. **Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, et al.** Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas* 1994; 9: 657–661.
11. **Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, et al.** Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res* 2001; 61: 4885–4891.
12. **Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, et al.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002; 122: 308–317.
13. **Kaminski R, Kozar K, Kopec M, et al.** Discussion on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1747.
14. **Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al.** Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549–554.
15. **Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, et al.** Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 2001; 84: 886–891.
16. **Minden MD, Dimitroulakos J, Nohynek D, Penn LZ.** Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; 40: 659–662.
17. **Pedersen TR, Wilhelmssen L, Faergeman O, et al.** Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol* 2000; 86: 257–262.
18. **Blais L, Desgagne A, LeLorier J.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2363–2368.
19. **Lovastatin Study Groups I through IV.** Lovastatin 5-year safety and efficacy study. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1079–1087.
20. **Wong WW, Tan MM, Xia Z, et al.** Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2067–2075.
21. **Newman A, Clutterbuck RD, Powles RL, et al.** A comparison of the effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors simvastatin, lovastatin and pravastatin on leukaemic and normal bone marrow progenitors. *Leuk Lymphoma* 1997; 24: 533–537.
22. **Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, et al.** Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 688–692.
23. **Schachter M.** Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19: 117–125.
24. **Kita K, Saito S, Morioka CY, Watanabe A.** Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int J Cancer* 1999; 80: 553–558.
25. **McKeage MJ, Kelland LR, Boxall FE, et al.** Schedule dependency of orally administered bis-acetato-ammine-dichlorocyclohexylamine-platinum (IV) (JM216) *in vivo*. *Canc Res* 1994; 54: 4118–4122.
26. **Muller C, Bockhorn AG, Klusmeier S, et al.** Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 1998; 12: 717–723.
27. **Ura H, Obara T, Nishino N, et al.** Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 633–638.
28. **Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, et al.** Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells. *Br J Cancer* 2005; 93: 319–330.
29. **Yao CJ, Lai GM, Chan CF, et al.** Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. *Int J Cancer* 2006; 118: 773–779.
30. **Chong PH, Seeger JD, Franklin C.** Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection. *Am J Med* 2001; 111: 390–400.
31. **van Vliet AK, van Thiel GC, Huisman RH, et al.** Different effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on sterol synthesis in various human cell types. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1254: 105–111.
32. **Shitara Y, Sugiyama Y.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and inter-individual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 71–105.
33. **Buemi M, Allegra A, Senatore M, et al.** Pro-apoptotic effect of

- fluvastatin on human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 370: 201–203.
34. **Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, et al.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998; 83: 490–500.
35. **Yamamoto A, Ichihara K, Hoshi K.** Antioxidative effect of fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on peroxidation of phospholipid liposomes. *J Pharmacy Pharmacol* 2001; 53: 227–232.
36. **Mueck AO, Seeger H, Wallwienner D.** Effect of statins combined with estradiol on the proliferation of human receptor-positive and receptor-negative breast cancer cells. *Menopause* 2003; 10: 332–336.
37. **Khurana V, Sheth A, Caldito G, Barkin JS.** Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas* 2007; 34: 260–265.

Bohuslav Melichar

ÚLOHA FARMAKOTERAPIE V KOMPLEXNÍ LÉČBĚ NÁDORŮ JATER

www.galen.cz



Zhoubné nádory patří celosvětově mezi nejčastější příčiny úmrtí. I když frekvence primárních nádorů jater je v Evropě a Severní Americe relativně nízká, jsou játra vůbec nejčastějším místem metastáz. Neléčeny mají velmi špatnou prognózu s mediánem přežití mezi 6 a 12 měsíci. Na druhé straně se nádory jater postupně stávají příkladem možností úspěšného léčení – v posledním desetiletí došlo k významnému pokroku v systémové léčbě nádorů nejčastěji metastazujících do jater. Monografie je určena nejen klinickým onkologům a radioterapeutům, ale i lékařům ostatních oborů, kteří vstupují do léčby nemocných s nádory jater: chirurgům, gastroenterologům a všeobecným internistům. Především odborníkům jiných oborů jsou určeny úvodní kapitoly, které poskytují stručný úvod do klinické onkologie a vysvětlení teoretických základů i metodologie tohoto oboru. Po kapitolách věnovaných epidemiologii a biologii nádorů jater je pojednáno o strategii léčby nádorových onemocnění jater, nejprve obecně, poté konkrétně u každé diagnózy. Pozornost je věnována nejen postavení farmakoterapie samotné, ale zejména její návaznosti na léčbu chirurgickou.

Praha: Galén, 2007, 249 s. – První vydání, 195×280 mm, vázané, černobíle, 490 Kč, ISBN 978-80-7262-446-1.

Obsah: 1. Úvod • 2. Teoretické základy léčby nádorů jater • 3. Stručný přehled léků používaných v léčbě nádorů jater • 4. Strategie léčby nádorů jater • 5. Léčebné postupy zaměřené na játra • 6. Chemoterapie a funkce jaterního parenchymu • 7. Chemoterapie v komplexní léčbě primárních nádorů jater • 8. Sekundární (metastatické) nádory jater • Zkratky • Rejstřík

Galén, spol. s r. o. • Na Bělidle 34 • 150 00 Praha 5 • tel.: 257 326 178 • e-mail: objednavky@galen.cz

Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer

Helena Gbelcová¹, Martin Leníček², Jaroslav Zelenka², Zdeněk Knejzlík¹, Gabriela Dvořáková¹, Marie Zadinová³, Pavla Poučková³, Michal Kudla⁴, Peter Balaž⁴, Tomáš Ruml^{1,5} and Libor Vítek^{2,6*}

¹Department of Biochemistry and Microbiology and Center for Applied Genomics, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

²Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³Institute of Medical Biophysics, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁴Center of Experimental Medicine, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁵Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

⁶Fourth Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Statins are widely used for the treatment of hypercholesterolemia. However, their inhibitory action on HMG-CoA reductase also results in the depletion of intermediate biosynthetic products, which importantly contribute to cell proliferation. The aim of the present study was to compare the effects of the individual commercially available statins on experimental pancreatic cancer. The *in vitro* effects of individual statins (pravastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, cerivastatin, rosuvastatin and fluvastatin) on the viability of human pancreatic cancer were evaluated in CAPAN-2, BxPc-3 and MiaPaCa-2 cell lines. The *in vivo* experiments were performed on nude mice xenotransplanted with CAPAN-2 cells. The mice received oral treatments either with a placebo, or with the statins mentioned earlier in a daily dose corresponding to a hypocholesterolemic dose in humans. The effect of these statins on the intracellular Ras protein, trafficking in MiaPaCa-2 transfected cells, was also investigated. Substantial differences in the tumor-suppressive effects of all statins were detected in both *in vitro* and *in vivo* experiments. While simvastatin exerted the highest tumor-suppressive effects *in vitro*, rosuvastatin ($p = 0.002$), cerivastatin ($p = 0.002$) and fluvastatin ($p = 0.009$) were the most potent compounds in an animal model. All statins (except pravastatin) inhibited intracellular Ras protein translocation. In summary, substantial tumor-suppressive effects of various statins on the progression of experimental pancreatic adenocarcinoma were demonstrated, with marked differences among individual statins. These results support greatly the potential of statins for the chemoadjuvant treatment of pancreatic cancer.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: pancreatic cancer; cholesterol; HMG-CoA reductase; statins; farnesylation; K-ras oncogene; mevalonate

Inhibitors of hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (statins) are widely used for treatment of hypercholesterolemia. However, the effects of statins on human tissues are pleiotropic, involving inhibition of atherogenous plaque formation, platelet aggregation, the improvement of both endothelial function and fibrinolytic activity, or even direct protective effects of the statins upon mortality in acute myocardial infarction.^{1,2} In addition, the inhibition of HMG-CoA reductase, a key enzyme in the cholesterol biosynthesis, also results in the depletion of several important intermediates, including farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), which modify and target small GTPases to their site of action.³ Farnesylated Ras proteins are associated with multiple mitogenic signal transduction pathways in response to growth factor stimulation,⁴ including external signal regulating kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathways to name the most important effectors.⁵ On the other hand, geranylgeranylated proteins of the Ras homologous (Rho) family regulate signal transduction from membrane receptors in a variety of cellular events related to cell adhesion and invasion.⁶ Accordingly, inhibition of farnesylation/geranylgeranylation became a plausible approach to modify cell proliferation in tumor tissues. During the last decade, the antiproliferative effects of statins were demonstrated in numerous *in vitro*

as well as *in vivo* studies on various tumor cell lines including hepatocellular carcinoma,⁷ lung,⁸ colorectal⁹ or pancreatic cancer.^{10–15} In this regard, pancreatic cancer is of particular interest, since more than 90% of human pancreatic cancers bear activating mutations in the K-ras proto-oncogene.¹⁶ These mutations result in the loss of GTPase activity (physiologically associated with the Ras protein as a negative feedback mechanism), which leads to protracted K-Ras activation. Suppression of this event *via* statin-mediated inhibition of K-Ras farnesylation thus seems to be a promising therapeutic approach. In fact, antitumor activities of statins were also demonstrated in some human studies,^{17,18} and also interestingly in several human epidemiological studies, primarily focused on cardiovascular outcomes.^{19–21}

The antiproliferative effects for all marketed statins have been described. However, some data suggest certain differences in the antitumor effects of individual statins. Wong *et al.*²² demonstrated substantially higher inhibitory effects on the growth of acute myeloid leukemia cells of cerivastatin, compared to lovastatin, atorvastatin and fluvastatin. In another *in vitro* study on leukemia cell lines, simvastatin was the most effective statin; while, pravastatin had the weakest effect.²³ A similar tendency was also observed in osteosarcoma cell lines treated with simvastatin or pravastatin,²⁴ as well as in an *in vitro* breast cancer study by Mueck *et al.*²⁵ Based on incomplete and scattered data, it seems that individual statins act differently on various diseases and cell populations,² and this may be the reason for the inconclusive or controversial epidemiological data published so far. This might all result from the differences in the statins' structure, pharmacokinetics and bio-transformation rates.²⁶ For instance, large variations in the modulation of hepatic cytochrome P450 activity have been documented among individual statins.²⁷

Although, as pointed out earlier, statins have been extensively studied as possible chemotherapeutic agents, and no complex data have as yet been provided on the differences in antitumor activities of the individual statins. Therefore, the aim of the present study was to compare the tumor-suppressive effects of the various statins routinely used in clinical medicine upon the growth of human pancreatic cancer in both *in vitro* and *in vivo* experimental models.

The last two authors contributed equally to this paper.

Grant sponsor: Czech Ministry of Health; Grant number: NR8132-3; Grant sponsor: Czech Ministry of Education; Grant number: MSM 6046137305, ME849; Grant sponsor: Czech Science Foundation; Grant number: 204/03/H066.

*Correspondence to: Fourth Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 2, Praha 2, 128 08, Prague, Czech Republic. Fax: +00-420-224-962-532.
E-mail: vitek@cesnet.cz

Received 4 July 2007; Accepted after revision 19 September 2007

DOI 10.1002/ijc.23242

Published online 20 November 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Material and methods

Material

For the *in vitro* study, the following pure forms of statins were used: pravastatin, atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin and rosuvastatin (all obtained from Alexis; San Diego, CA except for simvastatin, kindly provided by Merck, Sharp and Dohme, NJ). Simvastatin was either used in its native (lactone) form (believed not to inhibit HMG-CoA reductase) or in the active (lactam) form, prepared as described previously.²⁸ Mevalonate, FPP and GGPP were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Cell cultures

The following pancreatic cancer cell lines were used for the *in vitro* studies: CAPAN-2, MiaPaCa-2 and BxPc-3 (ATCC, Manassas, VA). All cell lines were both maintained and grown in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C, in the following media, supplemented with 10% fetal bovine serum: MiaPaCa-2 in DMEM, BxPc-3 in RPMI 1640 and CAPAN-2 in McCoy's 5A medium with 1.5 mM L-glutamine containing sodium bicarbonate (1.5 g/l).

All statins in the *in vitro* study were used in the concentration range of 0–40 μM (0; 10; 20; 30 and 40 μM). Three hundred microliters of the cell suspension (~2.7 × 10⁵ cells/ml) were used for inoculation of individual wells in the 6-well plate. Two milliliters of medium were added to each well, and the plates were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Statins from stock solutions in methanol (20 μl per well) were added 24 hr later to the final concentrations, indicated earlier. Twenty microliters of methanol were added to control wells. After 24, 48 and 72 hr of statin treatment, cells in triplicate were washed with PBS, harvested by 0.25% trypsin and resuspended. Both cell growth and viability were assessed by direct counting of 0.4% trypan blue dye-excluding cells.

Ras protein translocation assay

Reverse-transcription polymerase-chain reaction. Total RNA was isolated from HeLa (with wild type *K-ras* gene) and MiaPaCa-2 (with activation mutation in *K-ras* gene) cell lines by RNeasy Kit (Qiagen, MD), and wild type; and the mutated 570-bp *K-ras* cDNA genes, respectively, were amplified by reverse-transcription polymerase-chain reaction (RT-PCR) using Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma) and following primers:

5'-primer of *K-ras*: 5'- TTCAGATCTATGACTGAATATAA ACTTGTGGTAGTTGGAG -3'

3'-primer of *K-ras*: 5'- AAGGATCCTTACATAATTACACAC TTTGTCTTTGACTTC -3'

The PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (250) (Qiagen).

DNA constructs Owing to the C-terminal processing of Ras, both wild type and mutant *ras* DNA sequences were ligated into pEGFP-C1 vector (Clontech, CA), downstream of the coding sequence for the green fluorescent protein (GFP), to generate the pEGFP-K-Ras and pEGFP-K-RasG12C vectors, respectively. Vectors were amplified in the *Escherichia coli* DH5α cells (Invitrogen, CA) and verified by sequencing. Vectors were then used for expression of N-terminally tagged K-Ras with GFP (GFP-K-Ras) in MiaPaCa-2 cells.

Transfection and localization imaging MiaPaCa-2 cells were seeded in a single 6-well cell culture plate, with sterile glass coverslips 5 hr before transfection. Transfection with aforementioned plasmids was carried out by FuGene 6 (Roche, Basel, Switzerland) according to manufacturer instructions. After 24 hr the medium was changed, and statins to final concentration of 20 μM were added. After next 24 hr, cells were washed by PBS and fixed for 20 min with 4% formaldehyde in PBS. Actin filaments were stained with TRITC phalloidine (Sigma). The pEGFP-C1 vector was used as a control of transfection efficiency, and for observing the localization of the GFP protein (alone, with, and without the

drug treatments). Intracellular localization of the individual proteins (GFP, GFP-K-Ras or GFP-K-RasG12C) and actin filaments was visualized by fluorescent microscopy, using QuickPHOTO CAMERA 2.1 processing software (Olympus, Tokyo, Japan).

Animal studies

The *in vivo* study was performed on nude mice (strain CD-1, Charles River WIGA, Sulzfeld, Germany) xenotransplanted subcutaneously with human pancreatic adenocarcinoma cell line CAPAN-2 (10⁷ cells; *n* = 6 for each treatment group). After initiation of tumor growth (7–10 days after xenotransplantation; tumor size at the beginning of treatment was 0.27 ± 0.04 cm³), the mice received oral treatment with a placebo (saline) or one of the following commercially available statins: pravastatin (Lipostat, Bristol-Myers Squibb, NY), atorvastatin (Sortis, Pfizer, NY), lovastatin (Mevacor, Merck, Sharp and Dohme), simvastatin (Zocor, Merck, Sharp and Dohme), cerivastatin (Cholstat, Laboratories Fournier, Paris, France) or fluvastatin (Lescol, Novartis, Basel, Switzerland); given in a daily dose approximately corresponding to the hypocholesterolemic dose used in humans (Fig. 3). Drugs were administered intragastrically once daily *via* gastric tube. The primary endpoint was the survival time. Simultaneously, an assessment of tumor size was performed by measurements of the 2 greatest perpendicular diameters of the subcutaneous tumors, measured every 3 days with a caliper.²⁹

All aspects of the animal studies met the accepted criteria for the care and experimental use of laboratory animals, and all protocols were approved by the Animal Research Committee of the 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague.

Statistical analysis

Data are presented as the median and 25–75% range, or the mean ± SD. The statistical significance of differences between variables was evaluated by the Mann–Whitney Rank Sum test. The effect of statin treatment on the survival of animals was analyzed by a standard nonparametrical analysis (Mann–Whitney Rank Sum test), as well as Kaplan Meier Log Rank survival analysis with Holm–Sidak *posthoc* testing, when survival *p*-value was significant. Group mean differences in tumor size were measured by repeated measures analysis of variance (RM ANOVA) with Holm–Sidak *posthoc* testing, when *p* value was significant. When needed, log transform values of tumor size were used for comparisons to comply with normality and equal variance requirements. Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05.

Results

The *in vitro* inhibitory effects of statins on viability of pancreatic adenocarcinoma cell lines

Tumor-suppressive effects of individual statins were analyzed *in vitro* by experiments on pancreatic cancer-derived cell lines. In contrast to well-differentiated adenocarcinoma cells, CAPAN-2 and MiaPaCa-2 cells are poorly differentiated. Both of these cell lines harbor activating *K-ras* mutations in codon 12, prevalently associated with pancreatic cancer.¹² Generally, the presence of statins in the growth medium dramatically reduced the numbers of cancer cells (Figs. 1a–f, Table I). However, various statins exhibited significantly different inhibitory efficacy and we have also observed notable differences between the sensitivity among the individual cell lines. In the CAPAN-2 and MiaPaCa-2 cell lines, even the lowest tested concentrations (10 and 15 μM, respectively) of cerivastatin, simvastatin and lovastatin induced a cytostatic effect, evaluated as zero increase of the cell number, compared to the control at the time of statin application (Figs. 1a–d, Table I). The tumor-suppressive effect of fluvastatin and atorvastatin was slightly lower, corresponding to a 20 μM concentration. The tumor-suppressive effect of rosuvastatin was significantly lower than the aforementioned statins, and was observed at a concentration

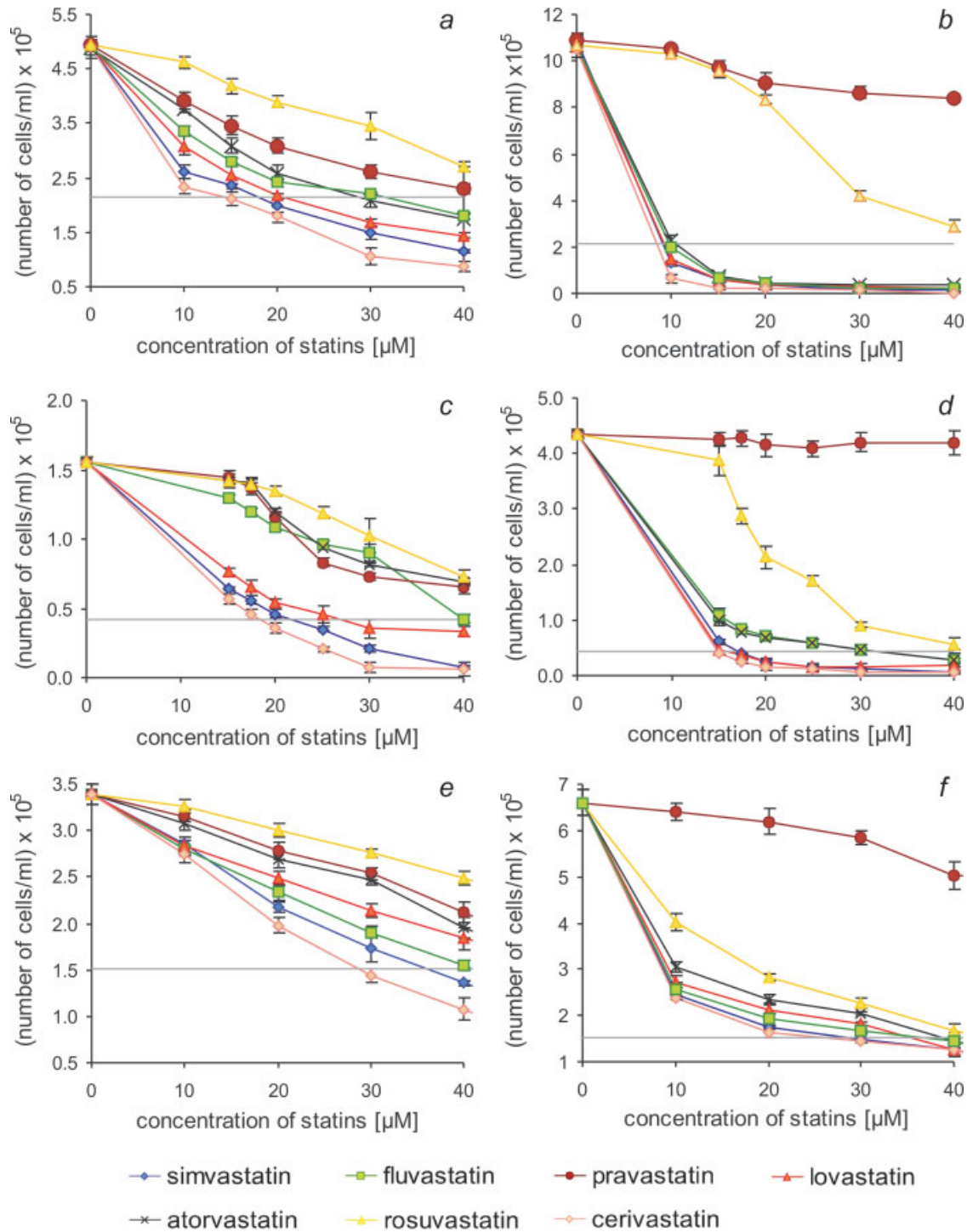


FIGURE 1 – Growth curves of pancreatic cancer cell lines cultured with different concentrations of individual statins. (a) CAPAN-2 cells, 24-hr incubation; (b) CAPAN-2 cells, 72-hr incubation; (c) MiaPaCa-2 cells, 24-hr incubation; (d) MiaPaCa-2 cells, 72-hr incubation; (e) BxPc-3 cells, 24-hr incubation; (f) BxPc-3 cells, 72-hr incubation. Gray horizontal line in each graph represents the initial cell number.

of 40 μM. Only slight cytotoxic effects (the prevalence of cell dying) were observed at the lower tested concentrations (Fig. 1). All statins (except pravastatin) exhibited an acute cytotoxic effect in concentrations higher than 40 μM, manifested by release of the cells into the growth medium and permeabilization of the plasma membrane, which was detected by trypan blue staining (data not shown).

BxPc-3 cells are moderately differentiated cancer cells producing the wild type *K-ras* proto-oncogene³⁰ and overexpressing cyclooxygenase-2.³¹ This cell line was less sensitive to the tumor-suppressive effect of statins especially in the short-term experiments (24 and 72 hr, Figs. 1e and 1f, Table I; data for 48 hr not shown). This is well documented by an increase of IC₅₀ values for individual statin, compared to these values for the other cell lines

TABLE I – THE EFFECT OF INDIVIDUAL STATINS ON GROWTH OF PANCREATIC CANCER

	IC ₅₀ (μM)								
	CAPAN-2			MiaPaCa-2			BxPc-3		
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Rosuvastatin	39	30	26	36	27	20	56	50	13
Pravastatin	27	>40	>40	29	>40	>40	39	48	>40
Atorvastatin	22	7	5	27	21	10	37	33	10
Fluvastatin	21	5	5	26	12	9	29	27	7
Lovastatin	16	5	4	13	11	3	33	31	7
Simvastatin	14	6	3	12	10	5	26	23	6
Cerivastatin	12	3	2	10	9	5	22	21	8

TABLE II – THE EFFECT OF MEVALONATE, FPP AND GGPP ON THE TUMOR SUPPRESSIVE ACTION OF STATINS

	CAPAN-2 (% of control cells)	MiaPaCa-2 (% of control cells)	BxPc-3 (% of control cells)
Mevalonate 17 μM	76	–	–
Mevalonate 600 μM	98	92	81
FPP	103	–	–
GGPP	133	–	–
Pravastatin	88	91	88
Pravastatin + mevalonate 17 μM	91	–	–
Pravastatin + mevalonate 600 μM	98	112	87
Prava + FPP	90	–	–
Prava + GGPP	115	–	–
Lovastatin	6	2	9
Lovastatin + mevalonate 17 μM	32	–	–
Lovastatin + mevalonate 600 μM	86	93	90
Lovastatin + FPP	56	–	–
Lovastatin + GGPP	79	–	–
Atorvastatin	1	0	8
Atorvastatin + mevalonate 17 μM	23	–	–
Atorvastatin + mevalonate 600 μM	91	71	79
Atorvastatin + FPP	59	–	–
Atorvastatin + GGPP	76	–	–
Simvastatin	0	0	5
Simvastatin + mevalonate 17 μM	10	–	–
Simvastatin + mevalonate 600 μM	78	84	85
Simvastatin + FPP	29	–	–
Simvastatin + GGPP	75	–	–
Fluvastatin	3	0	6
Fluvastatin + mevalonate 17 μM	55	–	–
Fluvastatin + mevalonate 600 μM	105	99	67
Fluvastatin + FPP	41	–	–
Fluvastatin + GGPP	62	–	–

The cells were cultured for 72 hr in the presence of the substances stated above (concentration of statins = 30 μM, FPP, GGPP = 17 μM).

tested (Table I). Interestingly, all the tested compounds (except pravastatin) exhibited a comparable cytostatic effect for both the BxPc-3 cells and the other cell lines, after 72-hr exposure. A high proportion of the cell population exhibited signs of degeneration, such as granulation of cytoplasmic material, as well as decreased cell viability, according to trypan blue staining. A total cytostatic effect was observed at the 60 μM concentration of cerivastatin, simvastatin, lovastatin and fluvastatin (data not shown).

The viability of cancer cells was substantially prevented by all statins, except pravastatin, which only reduced the growth progression when administered at a high concentration (40 μM). Although pravastatin was generally the least effective statin after 48-hr and 72-hr exposure, compared to rosuvastatin, it exhibited a better inhibitory effect in the 24-hr experiment (Table I).

Addition of mevalonate, as well as FPP or GGPP, substantially abrogated the inhibitory growth effect of all statins (Table II), suggesting that the effect was caused by effective inhibition of farnesylation and not by the possible toxicity of statins. When mevalonate was added in a concentration far exceeding 20× that of statins, their tumor-suppressive effect was completely eliminated, while equimolar concentrations of mevalonate only had a partial effect (Table II). Surprisingly, both forms of simvastatin (*i.e.*, lactam and lactone) were found to have similar efficacy (data not shown).

The effect of individual statins on K-Ras protein translocation

Since K-Ras proteins translocation from cytoplasm to the cell membrane is dependent on its farnesylation, we investigated the potential effect of statins on this cellular event in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells transfected with pEGFP-K-Ras (HeLa, wild type) plasmids.

As demonstrated in Figure 2, all the statins tested at the 20 μM concentration efficiently inhibited K-Ras protein trafficking from cytoplasm to the cell membrane. The only exception was pravastatin, which did not influence this process at all. Similar effect of statins on the localization of K-ras carrying the activation mutation (MiaPaCa-2 G12C) was observed. Again, pravastatin did not have any effect (data not shown).

Antitumor effects of individual statins on human pancreatic adenocarcinoma cell line CAPAN-2 xenotransplanted to nude mice

All of the statins used significantly prolonged survival in mice suffering from human pancreatic adenocarcinoma. While the median survival rate of placebo treated animals was 31.5 [29–32] days (median [25–75%]), the mice treated with statins survived significantly longer, depending on statin used (39–106.5 days, Fig. 3). Compared to placebo-treated animals, mice treated with pravastatin

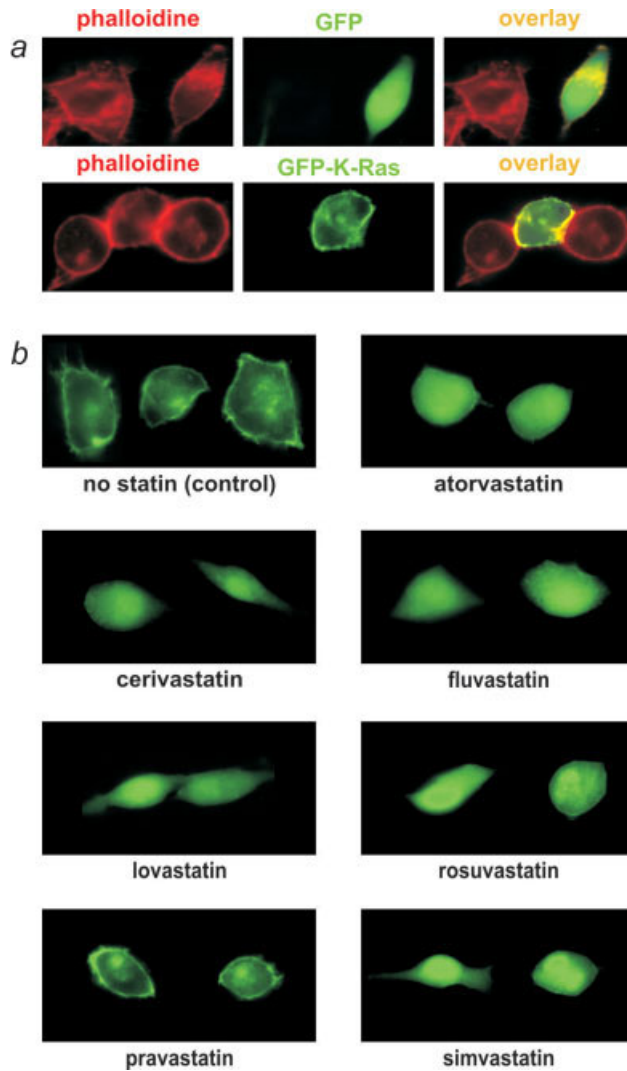


FIGURE 2 – Localization of GFP-K-Ras in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. (a) Cells expressing GFP or GFP-K-Ras cultured without statin were stained with TRITC phalloidine for visualization of actin, localized predominantly in the cytoplasmic membrane. (b) The effect of individual statins (20 μ M) on GFP-K-Ras localization in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells transfected by pEGFP-K-Ras plasmids.

survived 39.5 [36–42] days ($p = 0.01$), while survival rates in the atorvastatin and simvastatin group were 39 [36–45] ($p = 0.04$) and 42 [39–44] days ($p = 0.002$), respectively. The highest survival rate was found in the mice treated with cerivastatin (106.5 [47–122] days, $p = 0.002$) and rosuvastatin groups (104.5 [65–122] days, $p = 0.002$). Substantial anticancer effects were also observed in a fluvastatin group (56 [42–246] days, $p = 0.009$), where 2 complete remissions were even recorded. Partial tumor regressions accompanied by central necrosis were also observed in several mice treated with cerivastatin and rosuvastatin. The significance of these results was also confirmed in a Kaplan–Meier survival analysis, demonstrating that the longest survivals in animals were those treated with rosuvastatin, cerivastatin, fluvastatin and simvastatin (Fig. 3). However, marked differences in the survival rate were also observed among these most effective statins. After detailed analysis of the survival data, significant differences among the most and the least effective statins were detected (Table III).

The survival rate correlated well with the progression of tumor size. The increase in volume of CAPAN-2 tumors during treat-

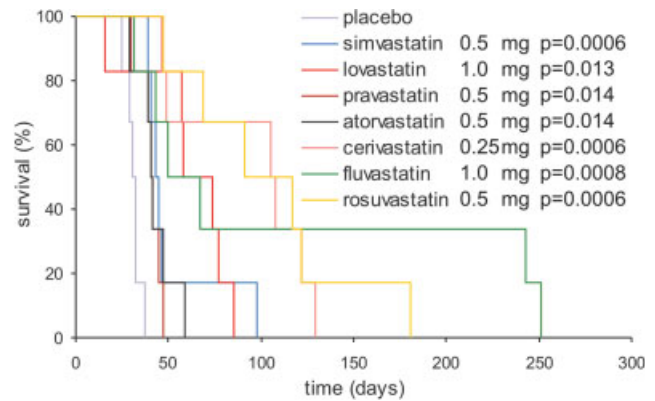


FIGURE 3 – The effect of statin therapy on survival of nude mice xenotransplanted with human pancreatic cancer cell line CAPAN-2. Dose = mg/kg body wt.

TABLE III – DIFFERENCES IN THE SURVIVAL RATE OF CAPAN-2 PANCREATIC CANCER-BEARING ANIMALS AMONG VARIOUS STATIN TREATMENTS

Statin treatment	p value
Rosuvastatin > pravastatin	0.0005
Rosuvastatin > atorvastatin	0.002
Rosuvastatin > simvastatin	0.013
Rosuvastatin > lovastatin	0.042
Cerivastatin > pravastatin	0.0005
Cerivastatin > atorvastatin	0.006
Cerivastatin > simvastatin	0.005
Cerivastatin > lovastatin	0.065
Fluvastatin > pravastatin	0.025
Fluvastatin > atorvastatin	0.060
Fluvastatin > simvastatin	0.165
Fluvastatin > lovastatin	0.582

Data from Kaplan–Meier Log-Rank Survival analysis.

ment was significantly depressed in the statin-treated groups (Fig. 4a). Similar to the results of the survival analysis, significant differences were detected among the individual statins, with the best results found in fluvastatin and cerivastatin groups (Fig. 4b).

Compared to initial values of tumor size, treatment with cerivastatin and rosuvastatin did not lead to significant tumor progression, as measured by tumor size before death ($p > 0.05$, data not shown); while treatment with fluvastatin resulted in a subtle, but again insignificant, diminishing of tumors (due to 2 remissions observed in this group). In all other treatment groups, tumor progression was delayed but not prevented.

Routine histological examination of pancreatic cancer treated with saline and fluvastatin did not show any major difference in any of the examined samples, despite the fact that placebo-treated animals exhibited rapid progression of the tumors (data not shown).

Discussion

Statins have been intensively studied drugs because of their deep impact on the human organism caused, in particular, by their cholesterol-lowering actions. However, their effects are pleiotropic and include potentially remarkable and clinically relevant antitumor effects. Indeed, the antiproliferative effects of statins were described for various experimental tumors, including pancreatic cancer.^{10–15,32–35} The first study on the effect of statins upon pancreatic cancer was published as early as 1992 by Sumi *et al.*,¹⁰ who described the substantial antiproliferative effect of lovastatin on both poorly and well-differentiated human pancreatic cancer cell lines *in vitro* as well as *in vivo*. However, only extremely high doses of lovastatin (60 mg/kg body wt./day) were used *in vivo*.¹⁰ A similar effect on pancreatic cancer was also described for lova-

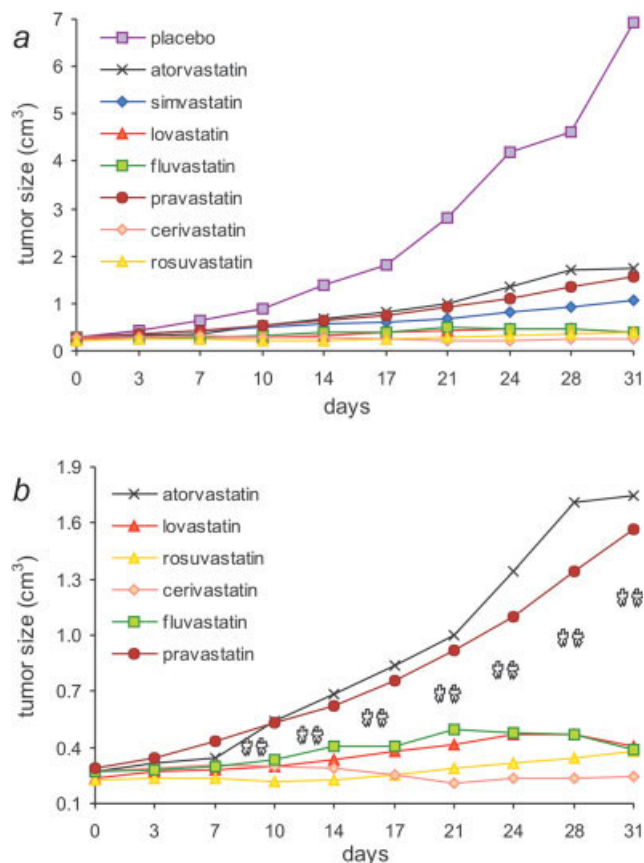


FIGURE 4 – (a) Tumor size after various statin treatments. (b) Differences in tumor size after various statin treatments. RM ANOVA with Holm–Sidak *posthoc* testing was used for comparison of measured variables. Although original data are depicted in the figures, statistical analyses were performed on log transform values to comply with normality and equal variance requirements. $**p < 0.05$ for the difference between atorvastatin and pravastatin vs. the remaining (except simvastatin) statin groups.

statin by Mikulski *et al.*¹¹ In studies by Kusama *et al.*,^{13,14} performed upon 3 human pancreatic cancer cell lines, micromolar concentrations of fluvastatin and lovastatin inhibited EGF-induced translocations of RhoA and cancer cell invasion in a dose-dependent manner. These effects were reversed by the addition of all-*trans*-geranylgeraniol, but not by the addition of all-*trans*-farnesol, suggesting involvement of Rho activation, and not Ras signaling, in the process of cancer cell invasion. In another *in vitro* study on 5 pancreatic cancer cell lines by Sumi *et al.*,¹² as well as in a study by Muller *et al.*,³² lovastatin inhibited the proliferation of pancreatic cancer, even in the absence of activating point mutations in the *K-ras* gene. In addition, the chemoadjuvant effect of statins on experimental pancreatic cancer has been described in several studies, including the beneficiary action of fluvastatin and gemcitabine³⁴ or lovastatin and troglitazone, a PPAR- γ agonist.³⁵

These data seem to be in contrast to recent observations on the inducing effects of statins on the heme oxygenase-1 (HO-1),³⁶ a potent bioactive enzymatic system supposed by some authors to have procancerogenic role.^{37,38} However, opposing, *i.e.*, protective effects of HO-1 expression have been demonstrated by other authors for breast,³⁹ liver⁴⁰ and colon cancers.⁴¹ In addition, both pravastatin and simvastatin in a concentration range of 50–250 μM were not able to anyhow modulate HO-1 activity in CAPAN-2 pancreatic cancer cells (unpublished data, R. Motterlini and L. Vitek).

The current study is, according to the authors' knowledge, the first study to have compared differences in the effects of the indi-

vidual commercially available statins upon the viability and growth of human pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. All of the statins used, except pravastatin, substantially inhibited the growth of all 3 different pancreatic cell lines *in vitro* (Fig. 1, Table I). However, the intensity of this effect was dependent on the type of statin used, with marked differences among the individual compounds. These inhibitory effects were partially prevented by concomitant addition of mevalonic acid, FPP or GGPP, indicating the contribution of downstream intermediates in cholesterol biosynthesis for growth and viability of pancreatic cancer cells (Table II). The effect of GGPP can be related to the activation of another protein family than Ras, *i.e.* the Rho family (Rho, Rac and Cdc42), where geranylgeranylation is the predominant mechanism, whereas Ras proteins are mainly farnesylated. However, both K- and N-ras can be geranylgeranylated in the cells treated with inhibitors of farnesyltransferase.⁴²

The most potent statin under *in vitro* conditions was cervastatin, followed by simvastatin and lovastatin. Slightly less effective were fluvastatin and atorvastatin. The effect of these statins far exceeded the effects of rosuvastatin and pravastatin. However, these findings did not entirely parallel *in vivo* results, in which fluvastatin, cervastatin and rosuvastatin had much better tumor-suppressive responses (Fig. 3). This is very interesting, especially for fluvastatin, if we consider that fluvastatin has the lowest hypocholesterolemic effects among the statins on the market.⁴³ Marked differences in the impact of individual statins on cancer cell viability, with the worst effects found for pravastatin, may be due to many factors such as different chemical structures leading to changes in their pharmacokinetics and pharmacodynamics.²⁶ Except for pravastatin and rosuvastatin, all statins are lipophilic substances which certainly affect their behavior and bioavailability for cells and tissues in the organism (where the situation is far more complex). In fact, lipophilic statins lovastatin and simvastatin were found to inhibit HMG-CoA reductase (also in the cells of peripheral origin), while pravastatin exhibited this action only in cultured hepatocytes.⁴⁴ In contrast to pravastatin, rosuvastatin, the second hydrophilic statin, is able to inhibit HMG-CoA reductase in nonhepatic cells with 2 orders of magnitude higher efficacy.⁴⁵ However, it should also be noted that the half-life elimination of rosuvastatin is ~ 20 hr, compared to a half-life of all other statins between 2 and 3 hr. In addition, whereas lipophilic atorvastatin, fluvastatin, lovastatin and simvastatin were described to have direct proapoptotic effects,^{46,47} pravastatin lacks this action.⁴⁷ These data are also consistent with the lack of inhibitory effects of pravastatin on K-Ras protein translocation in pancreatic cancer cells, as compared to other statins. Interestingly, the effect of rosuvastatin on K-Ras translocation, which exhibits the highest IC_{50} value, was comparable to the most effective statins (Table I, Figs. 1 and 2).

Differences in the biological behavior of statins are further evidenced by their antioxidant effects, since it has been demonstrated that fluvastatin exerts 2 orders of magnitude higher antioxidant capacity (which obviously might be of clinical relevance) as compared to pravastatin.⁴⁸ Although lactone prodrugs of lovastatin and simvastatin are ineffective for the inhibition of HMG-CoA reductase, these isomers are potent modulators of the 20S proteasome.⁴⁹ However, it is important to emphasize that both (open and lactone) forms were identically active against tumor viability in our *in vitro* experiments. Other factors, such as the aforementioned different bioavailability, protein binding, conversion to metabolites, as well as elimination half-life²⁶ may contribute to the observed diversity.

Our data are corroborated by an *in vitro* breast cancer study by Mueck *et al.*,²⁵ who also reported different tumor-suppressive effects of various statins. Interestingly, in this study, fluvastatin and simvastatin were also the most effective statins, whereas pravastatin had no effect up to 50 μM concentrations.²⁵ Negligible antitumor effects of pravastatin were also observed in other cancer studies,^{22–24} as well as no antiviral effect having been demon-

strated for pravastatin compared to the strong antiviral activity on hepatitis C of the other tested statins.⁵⁰

Genetic heterogeneity is another important factor which affects sensitivity of particular cancer cells to antiproliferative/proapoptotic effects of statins. This has been reported in a very recent paper by Wong *et al.*,⁵¹ who demonstrated that only half of the 17 multiple myeloma cell lines tested was sensitive to lovastatin-induced apoptosis, while resistant cell lines had different genetic profile. Moreover, specific adaptation mechanisms may lead to selection of variant resistant cancer cell clones as was shown for pravastatin-treated human breast and gastric cell lines.⁵² It is not clear whether other statins are more efficient in preventing development of statin resistance, but this may be further factor accounting for the weakest anticancer effects of pravastatin.

In vitro inhibitory concentrations of statins, similarly as in the majority of previous studies, may seem biologically irrelevant and not accounting for marked tumor-suppressive effects of much lower doses of statins *in vivo*. However, it must be stressed that in the human body statins may undergo biotransformation to become substantially more active inhibitors. All statins are metabolized in the liver where lovastatin, simvastatin, atorvastatin and cerivastatin share a common metabolic pathway through cytochrome P-450 3A4. Simvastatin is metabolized by hepatic CYP3A4 onto its dihydroxy acid form, whose antiproliferative effects were ~1 order of magnitude higher, compared to simvastatin with IC₅₀ (being 0.5–2.3 mg/l for 8 different pancreatic cancer cell lines tested).³³ Similar biotransformation into active hydroxyl metabolites was also described for lovastatin, atorvastatin and fluvastatin,²⁶ which is subjected to the action of cytochrome P-450 2C9. Pravastatin has multiple metabolic pathways. Since pancreatic cancer cell lines are not equipped with these biotransforming enzymes, it is not surprising that much higher doses must be used *in vitro* to mimic similar *in vivo* effects.

In support of the tumor-suppressive effects of statins, there are also the results of either randomized clinical trials or observational epidemiological studies, which were the subject of recent reviews and meta-analyses (for review, see Ref. 2). Although several epidemiological studies have proved the beneficial effects of statins on cancer risk,² these recent meta-analyses^{53–56} did not confirm cancer protection in statin users. This fact might be due to a too short follow-up period, as well as a methodology bias of the epidemiologic studies on cardiovascular outcomes, which were not designed or statistically powered to appropriately evaluate any

beneficial or detrimental effects on a relatively rare event (such as a subsequent malignancy). This also has been recognized as a possible explanation for the slightly increased cancer incidence in elderly individuals taking pravastatin in the PROSPER study.⁵⁷ Moreover, based on our *in vitro* and *in vivo* results, it seems that pravastatin has only negligible tumor-suppressive effects on pancreatic cancer. Interestingly, pravastatin also does not inhibit the proliferation of human breast cancer cells²⁵ or gastric carcinoma cells in culture,⁵⁸ but it does have beneficial effects on colon tumors in an animal model.⁵¹ This may account for the negative results of the meta-analytic studies mentioned earlier. In fact, in a meta-analysis of 7 trials by Hebert *et al.*,⁵³ 43% (3 out of 7) of studies involved were those with pravastatin. The same was true for a study by Bjerre and LeLorier⁵⁴ (3 of 5 studies involved), CTT Collaborator's study⁵⁵ (5 of 14 studies involved), as well as in the most recent meta-analysis by Dale *et al.*⁵⁶ (10 of 20 studies). Interestingly, studies not demonstrating a drop of total cancer incidence or mortality also include data showing selective protective effects for certain types of cancer. This is true, for instance, for a large pravastatin clinical study CARE, in which a 43% decreased incidence of colorectal cancer was detected,⁵⁹ consistent with the experimental data for pravastatin mentioned earlier.⁶⁰ Similar results on the risk of colorectal cancer in patients mainly treated by pravastatin and simvastatin were also found in the study by Poynter *et al.*⁶¹

In conclusion, on the basis of our findings as well as results of other studies, we propose that the inhibitors of HMG-CoA reductase might be of potential for the chemoadjuvant treatment of pancreatic cancer. Indeed, promising results of a large, very recent study on the risk of pancreatic cancer in a population of almost half million US veterans support this.⁶²

Acknowledgements

Fruitful and stimulating discussions on the mechanisms of statins, as well as material support, are greatly appreciated from Professor Henning Schröder from the University of Halle, Germany. Authors also thank Dr. Roberto Motterlini from Northwick Park Institute for Biomedical Research, UK, for his help with preliminary experiments on the effects of statins on heme oxygenase activity. The authors also thank Drs. Alžběta Kračmarová, Michaela Merkerová and Eva Michalová for their help with molecular biology studies.

References

- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000;32:164–76.
- Vítek L, Leníček M. Cytoprotective and antiproliferative effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr Enz Inhib* 2006;2:261–80.
- Elson CE, Peffley DM, Hentosh P, Mo H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;221:294–311.
- Pronc GJ, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:131–47.
- Bondar VM, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, Mills GB, McConkey DJ. Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2002;1:989–97.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509–14.
- Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H, Matsuzawa Y. Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer* 1994;69:1015–20.
- Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, Stoner GD, Ruch RJ. Inhibition of lung tumor cell growth *in vitro* and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett* 1996;109:217–22.
- Feleszko W, Jakobisiak M. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:1198–9.
- Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, Uchida T, Murakami M, Rajaraman S, Ishizuka J, Thompson JC. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology* 1992;103:982–9.
- Mikulski SM, Viera A, Darzynkiewicz Z, Shogen K. Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1992;66:304–10.
- Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, Jr, Pour PM, Ishizuka J, Thompson JC. Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas* 1994;9:657–61.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors. *Cancer Res* 2001;61:4885–91.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Inoue M, Nakamura H. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002;122:308–17.
- Kaminski R, Kozar K, Kopec M, Basak G, Skierski JS, Koronkiewicz M, Jakobisiak M, Golab J. Discussion on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002;123:1747–8.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549–54.
- Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, Inada M, Tamura S, Noda S, Imai Y, Matsuzawa Y. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 2001;84:886–91.

18. Minden MD, Dimitroulakos J, Nohynek D, Penn LZ. Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001;40:659–62.
19. Pedersen TR, Wilhelmssen L, Faergeman O, Strandberg TE, Thorgeirsson G, Troedsson L, Kristianson J, Berg K, Cook TJ, Haghfelt T, Kjekshus J, Miettinen T, et al. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol* 2000;86:257–62.
20. Blais L, Desgagne A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000;160:2363–8.
21. Lovastatin Study Groups I through IV. Lovastatin 5-year safety and efficacy study. *Arch Intern Med* 1993;153:1079–87.
22. Wong WW, Tan MM, Xia Z, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res* 2001;7:2067–75.
23. Newman A, Clutterbuck RD, Powles RL, Catovsky D, Millar JL. A comparison of the effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors simvastatin, lovastatin and pravastatin on leukaemic and normal bone marrow progenitors. *Leuk Lymphoma* 1997;24:533–7.
24. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:688–92.
25. Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. Effect of statins combined with estradiol on the proliferation of human receptor-positive and receptor-negative breast cancer cells. *Menopause* 2003;10:332–6.
26. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:117–25.
27. Tornio A, Pasanen MK, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT. Comparison of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) as inhibitors of cytochrome P450 2C8. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:104–8.
28. Feleszko W, Balkowicz EC, Sieberth E, Marczak M, Dabrowska A, Giermasz A, Czajka A, Jakobisiak M. Lovastatin and tumor necrosis factor- α exhibit potentiated antitumor effects against Ha-ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 1999;81:560–7.
29. McKeage MJ, Kelland LR, Boxall FE, Valenti MR, Jones M, Goddard PM, Gwynne J, Harrap KR. Schedule dependency of orally administered bis-acetato-amine-dichlorocyclohexylamine-platinum (IV) (JM216) in vivo. *Cancer Res* 1994;54:4118–22.
30. Kita K, Saito S, Morioka CY, Watanabe A. Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int J Cancer* 1999;80:553–8.
31. El-Rayes BF, Ali S, Sarkar FH, Philip PA. Cyclooxygenase-2-dependent and -independent effects of celecoxib in pancreatic cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1421–6.
32. Muller C, Bockhorn AG, Klusmeier S, Kiehl M, Roeder C, Kalthoff H, Koch OM. Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 1998;12:717–23.
33. Ura H, Obara T, Nishino N, Tanno S, Okamura K, Namiki M. Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:633–8.
34. Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, Bernardini N, Collecchi P, De Tacca M, Danesi R. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MiaPaCa-2 cells. *Br J Cancer* 2005;93:319–30.
35. Yao CJ, Lai GM, Chan CF, Cheng AL, Yang YY. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. *Int J Cancer* 2006;118:773–9.
36. Hsu M, Muchova L, Morioka I, Wong RJ, Schroder H, Stevenson DK. Tissue-specific effects of statins on the expression of heme oxygenase-1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:738–44.
37. Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamachi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003;6:15–24.
38. Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, Autschbach F, Meuer S, Buchler MW, Friess H. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 2005;11:3790–8.
39. Hill M, Pereira V, Chauveau C, Zagani R, Remy S, Tesson L, Mazal D, Ubbilos L, Brion R, Asghar K, Mashreghi MF, Kotsch K, et al. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J* 2005;19:1957–68.
40. Caballero F, Meiss R, Gimenez A, Batlle A, Vazquez E. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis. *Int J Exp Pathol* 2004;85:213–22.
41. Becker JC, Fukui H, Imai Y, Sekikawa A, Kimura T, Yamagishi H, Yoshitake N, Pohle T, Domschke W, Fujimori T. Colonic expression of heme oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:852–8.
42. Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, Pai JK. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 1997;272:14459–64.
43. Chong PH, Seeger JD, Franklin C. Clinically relevant differences between the statins: implications for therapeutic selection. *Am J Med* 2001;111:390–400.
44. van Vliet AK, van Thiel GC, Huisman RH, Moshage H, Yap SH, Cohen LH. Different effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on sterol synthesis in various human cell types. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254:105–11.
45. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther* 2006;112:71–105.
46. Buemi M, Allegra A, Senatore M, Marino D, Medici MA, Aloisi C, Pasquale D, Corica F. Pro-apoptotic effect of fluvastatin on human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1999;370:201–3.
47. Guijaro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egidio J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998;83:490–500.
48. Yamamoto A, Ichihara K, Hoshi K. Antioxidative effect of fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on peroxidation of phospholipid liposomes. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:227–32.
49. Wojcik C, Bury M, Stoklosa T, Giermasz A., Feleszko W, Mlynarczuk I, Pleban E, Basak G, Omura S, Jakobisiak M. Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:957–65.
50. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* 2006;44:117–25.
51. Wong WW, Clendening JW, Martirosyan A, Boutros PC, Bros C, Khosravi F, Jurisica I, Stewart AK, Bergsagel PL, Penn LZ. Determinants of sensitivity to lovastatin-induced apoptosis in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1886–97.
52. Gebhardt A, Niendorf A. Effects of pravastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, on two human tumour cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121:343–9.
53. Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *J Am Med Assoc* 1997;278:313–21.
54. Bjerre LM, LeLorier J. Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials. *Am J Med* 2001;110:716–23.
55. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–78.
56. Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, Kluger J, White CM. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2006;295:74–80.
57. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, et al.; PROSPER study group. PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1623–30.
58. Gebhardt A, Niendorf A. Effects of pravastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, on two human tumour cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121:343–9.
59. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996;335:1001–9.
60. Narisawa T, Fukaura Y, Tanida N, Hasebe M, Ito M, Aizawa R. Chemopreventive efficacy of low dose of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in ICR mice. *Tohoku J Exp Med* 1996;180:131–8.
61. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almgro R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2184–92.
62. Khurana V, Sheth A, Caldito G, Barkin JS. Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas* 2007;34:260–5.

PROTEÍNY Ras: KLÚČOVÉ REGULÁTORY BUNKOVÉHO CYKLU

HELENA GBELCOVÁ^{a,b}, SILVIE RIMPELOVÁ^a,
ZDENĚK KNEJZLÍK^a, VANDA REPISKÁ^b,
TOMÁŠ RUML^a a DANIEL BÖHMER^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^b Ústav lékařské biologie, genetiky a klinické genetiky, Lékařská fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava
helena.gbelcova@fmed.uniba.sk

Došlo 15.12.14, prijaté 8.1.15.

Klíčové slová: Ras, aktivačná mutácia, farnezylácia, nádorové ochorenia, RASopatie

Obsah

1. Úvod
2. Štruktúra Ras proteínov a ich posttranslačná modifikácia
3. Vnútrobunkový transport Ras proteínov
4. Signálne dráhy zahŕňajúce Ras proteíny, ich regulácia a úloha v ľudských chorobách
5. Záver

1. Úvod

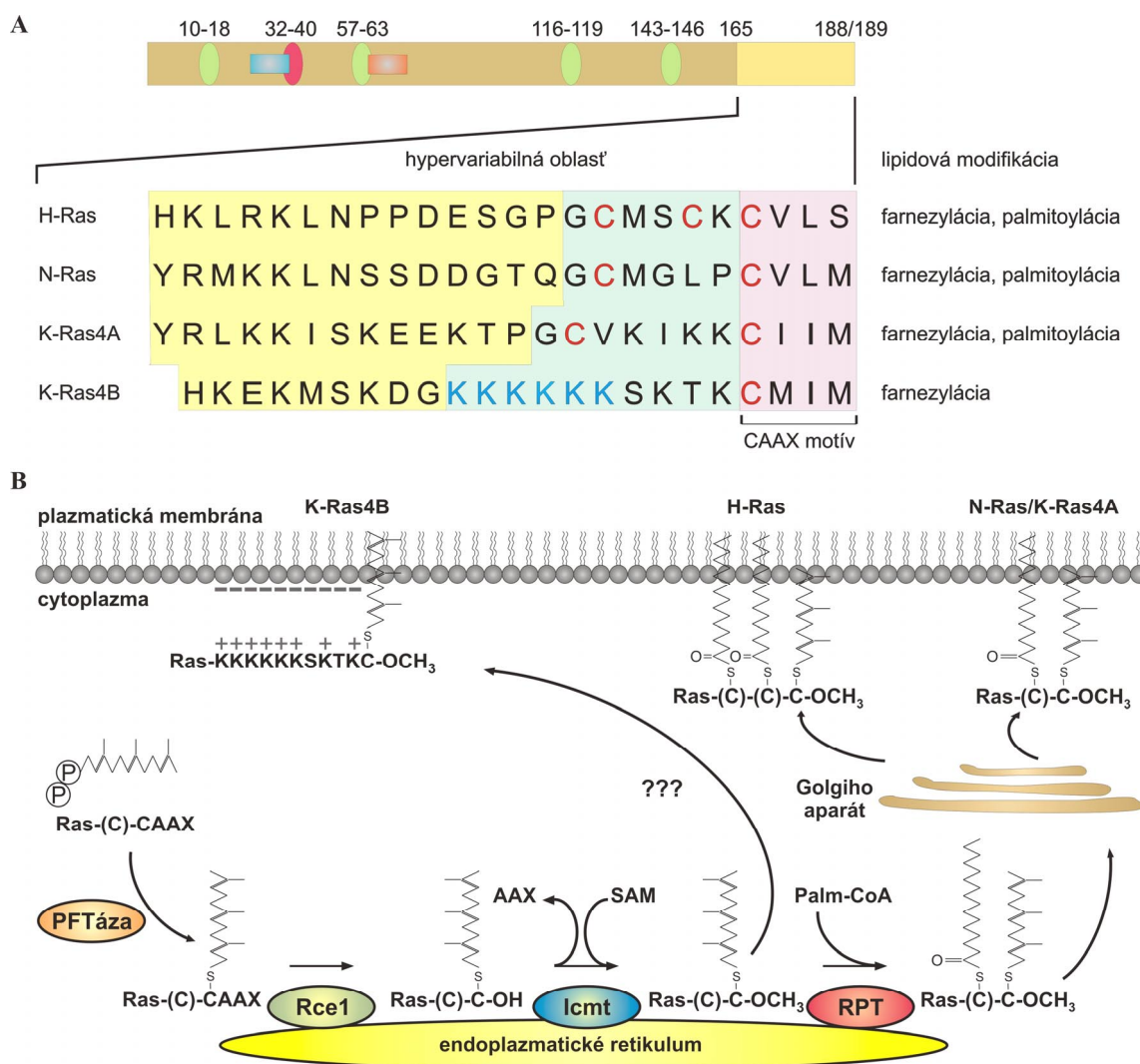
Od objavenia aktivačnej mutácie *ras* génu v nádorových bunkách ľudí, ktoré odštartovalo intenzívny výskum zameraný na pochopenie štruktúry, kinetiky a signalizácie Ras proteínov, ubehlo viac ako 30 rokov. Počas tohto obdobia bolo uverejnených viac ako 40 000 odborných publikácií popisujúcich objavy súvisiace s *ras* génmi alebo Ras proteínmi. A hoci by sa zdalo, že daná téma je vyčerpaná, mesačne sa objaví 200–300 ďalších prác popisujúcich skutočnosti v danej oblasti úplne nové alebo aspoň v nových súvislostiach. V tomto prehľadovom článku prinášame stručný súhrn objavov ostatných troch dekád stavajúcich *ras* gény a Ras proteíny do úlohy diagnostických biomarkerov, a to nielen vo vzťahu k nádorovým ochoreniam, ale aj k menej referovaným vrodeným chybám, ktoré sú manifestované ako syndróm.

2. Štruktúra Ras proteínov a ich posttranslačná modifikácia

Tri *ras* gény (*K-ras*, *N-ras* a *H-ras*) kódujú štyri Ras proteíny (*H-Ras*, *N-Ras*, *K-Ras4A* a *K-Ras4B*), nízkomolekulové guanozíntrifosfatázy (GTPázy), ktoré regulujú bunkový rast, diferenciáciu, proliferáciu, prežívanie a bunkovú smrť¹.

Okrem *K-Ras4B*, ktorý pozostáva zo 188 aminokyselín, všetky Ras proteíny sú tvorené zo 189 aminokyselín². Ras proteíny majú mimoriadne podobnú sekvenciu v oblasti domén viazucich efektorov, výmenné faktory a guanín nukleotidy. Jediná oblasť Ras izoformiem, ktorá vykazuje významné rozdiely v sekvenciách, je tzv. hypervariabilný región (HVR) na C-konci proteínov pozostávajúci z 24 aminokyselín. Ten obsahuje dve signálne sekvencie spolupracujúce na celení Ras proteínov k plazmatickej membráne (PM). Prvou z nich je CAAX motív (C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín)^{3,4}, druhú tvorí polybázický úsek šiestich lyzínových zvyškov (175–180) v *K-Ras4B*, alebo cysteín 180 v *K-Ras4A*, 181 v *N-Ras*, a 181 a 184 v *H-Ras*^{2,3,5} (obr. 1A).

Ras proteíny sú syntetizované v cytoplazme na voľných ribozómoch ako prekurzorové proteíny s molekulovou hmotnosťou 21 kDa. Prekurzory podstupujú sériu posttranslačných modifikácií na C-konci, ktorými sa zvyšuje ich hydrofóbnosť, čo umožňuje následnú asociáciu s vnútornou stranou PM. PM je jedno z miest, kde Ras proteíny interagujú s ich aktivátormi a interakčnými partnermi, a preto posttranslačné procesovanie Ras proteínov (obr. 1B) predstavuje jeden z dvoch kľúčových dejov, potrebných pre ich biologickú aktivitu. Novosyntetizované prekurzory Ras proteínov sú najskôr farnezylované v cytoplazme farnezyltransferázou (FTáza), ktorá pridáva farnezylovú skupinu k cysteínovému zvyšku (Cys186) v aminokyselínovom motíve CAAX. Prenylná reakcia je nasledovaná proteolytickým odstránením AAX motívu pomocou Ras meniaceho enzýmu (*Rce1 – Ras converting enzyme 1*)³. Vzniknutá karboxylová skupina na Cys186 je metylovaná izoprenylcysteínkarboxylmetyltransferázou (*Icmt*)⁶. Zodpovedajúce kroky posttranslačných modifikácií Ras proteínov prebiehajú na cytoplazmovej strane membrány endoplazmatického retikula (ER), kde sú oba vyššie zmienené enzýmy lokalizované. Po metylácii sú cysteínové zvyšky (Cys184 a Cys181 v *H-Ras*, Cys181 v *N-Ras* a Cys180 v *K-Ras4A*) reverzibilne palmitoylované pomocou palmitoyltransferázy lokalizovanej na ER⁷ alebo na Golgiho aparáte (GA)⁸. *K-Ras4B*, ktorý má namiesto cysteínových zvyškov polylyzínovú sekvenciu, nie je palmitoylovaný.



Obr. 1. A. Štruktúra Ras izoform a Ras hypervariabilnej oblasti. B. Posttranslačná modifikácia a konvenčný vnútrobunkový transport Ras proteínov. ■ – GEF interakčná oblasť, ■ – efektor/GAP interakcia, ■ – oblasť viažuca efektor, ■ – oblasť zodpovedná za väzbu s guaninnukleotidom, GEF – guaninnukleotid výmenný faktor (guanine nucleotide-exchange factor), GAP – guanozintri-fosfát aktivujúci proteín (guanosinetriphosphatases-activating protein), C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín, FTáza - farnezyltransferáza, ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, Icm1 – izoprenylcysteínkarboxymetyltransferáza, Rce1 - Ras meniaci enzým, Palm-CoA – palmitoyl koenzým A, SAM – S-adenozylmetionín, RPT – ER-lokalizovaná palmitoyltransferáza, PM – plazmatická membrána (upravené podľa³⁹⁻⁴¹)

3. Vnútrobunkový transport

3.1. Transport Ras proteínov k plazmatickej membráne

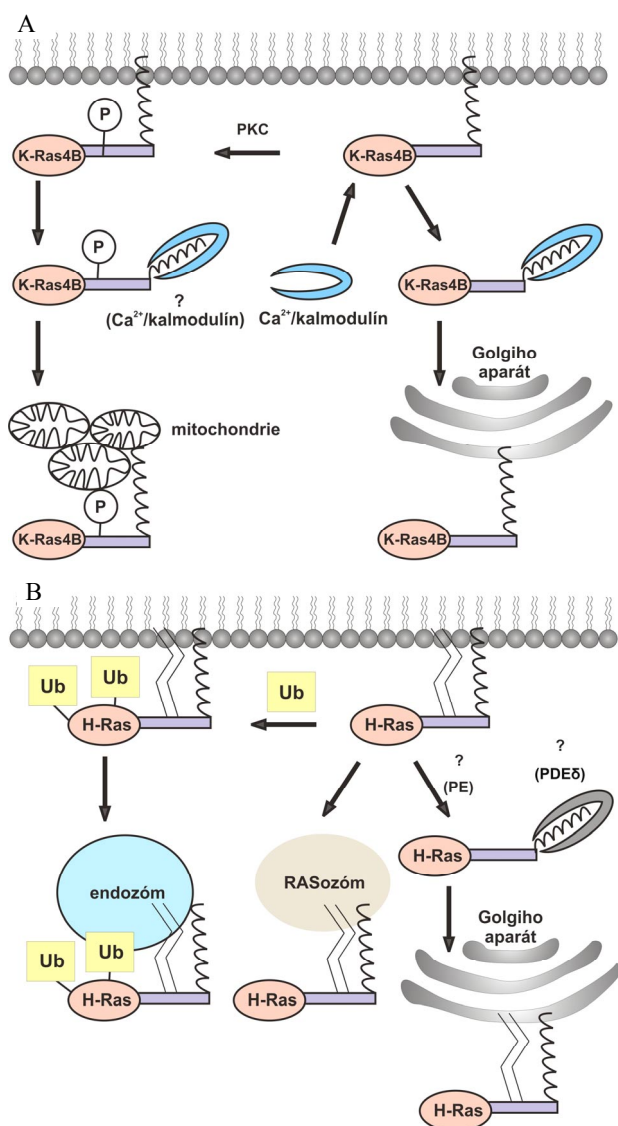
Farnezylácia Ras proteínov je nevyhnutná pre ich transport k PM a ukotvenie v nej. Novosyntetizované prekurzory Ras proteínov po farnezylácii v cytoplazme smerujú k ER. Zatiaľ čo H-Ras, N-Ras a K-Ras4A vyžadujú palmitoyláciu pre transport na ER a Golgiho aparát a následný vezikulárny transport k PM, nepalmitoylovaný

K-Ras4B nepodstupuje konvenčnú sekrečnú dráhu, ale smeruje z ER priamo na PM doteraz presne neopísaným, GA nezávislým spôsobom⁹ (obr. 1B).

Úsek šiestich susediacich lyzínov a päť ďalších lyzínových zvyškov v HVR spájajú K-Ras4B prostredníctvom iónových interakcií s negatívnym nábojom hláv fosfolipidových skupín v PM. Palmitát palmitoylovaných Ras proteínov tiež prispieva k membránovej interakcii jeho schopnosťou vložiť sa hlboko do lipidovej dvojvrstvy¹⁰.

3.2. Transport K-Ras4B z plazmatickej membrány

Za istých okolností je K-Ras4B transportovaný z PM k vnútrobunkovým štruktúram^{11,12} (obr. 2A). Interakcia K-Ras4B s kalmodulínom (CaM – calcium modulated protein-CaM – je malý proteín viažuci vápenaté ióny, ktorý reguluje rad kľúčových procesov, vrátane apoptózy, zápalových procesov, kontrakcie hladkého svalstva alebo pamäte) vedie k destabilizácii interakcie K-Ras4B s membránou, v dôsledku narušenia elektrostatickej interakcie medzi polybázickým regiónom a negatívne nabitými



Obr. 2. Úloha modifikácií proteínu K-Ras4B (A) a palmitoylovaných proteínov Ras (B) v retrográdnom transporte z plazmatickej membrány. ~ – farnesylová skupina, P – fosfátová skupina, PKC – proteínkináza C, ~ – dve skupiny palmitoylu, Ub – ubiquitín, PE – palmitoylsteráza, PDEδ – δ-podjednotka fosfodiesterázy (upravené podľa¹⁸)

fosfolipidmi v PM alebo priamou hydrofóbnou interakciou kalmodulínu s farnesylovou skupinou K-Ras4B. Disociácia K-Ras4B umožní transport ku GA alebo skorým endozómom^{12,13}.

Serín v pozícii 181 v polybázickej doméne K-Ras4B je cieľom pre fosforyláciu proteínkinázou C, ktorá podporuje rapidnú disociáciu K-Ras4B z PM a jeho asociáciu s vnútrobunkovými membránami vrátane vonkajšej membrány mitochondrií, kde indukuje bunkovú smrť prostredníctvom interakcie s mitochondriálnym proapoptickým faktorom Bcl-XL^{11,12}. K-Ras4B predstavuje izofornu najčastejšie spájanú s ľudskými nádormi. Preto látka podporujúca fosforyláciu K-Ras4B v pozícii S181 by mala byť schopná indukovať apoptózu K-Ras4B transformovaných buniek a tak slúžiť ako nový protinádorový liek¹⁴.

3.3. Transport palmitoylovaných Ras izoforiem z plazmatickej membrány

Palmitoylované H-Ras a N-Ras proteíny viazané na PM podstupujú depalmitoyláciu prostredníctvom palmitoylsterázy (PE), uvoľnia sa z PM a presúvajú sa ku GA zatiaľ neznámym mechanizmom, ktorý môže zahŕňať rôzne proteíny vrátane δ-podjednotky fosfodiesterázy alebo galektínu-1 (obr. 2B). Tento spôsob transportu a signalizácie je odlišný od endozomálneho spôsobu a je nezávislý od endocytózy¹⁵.

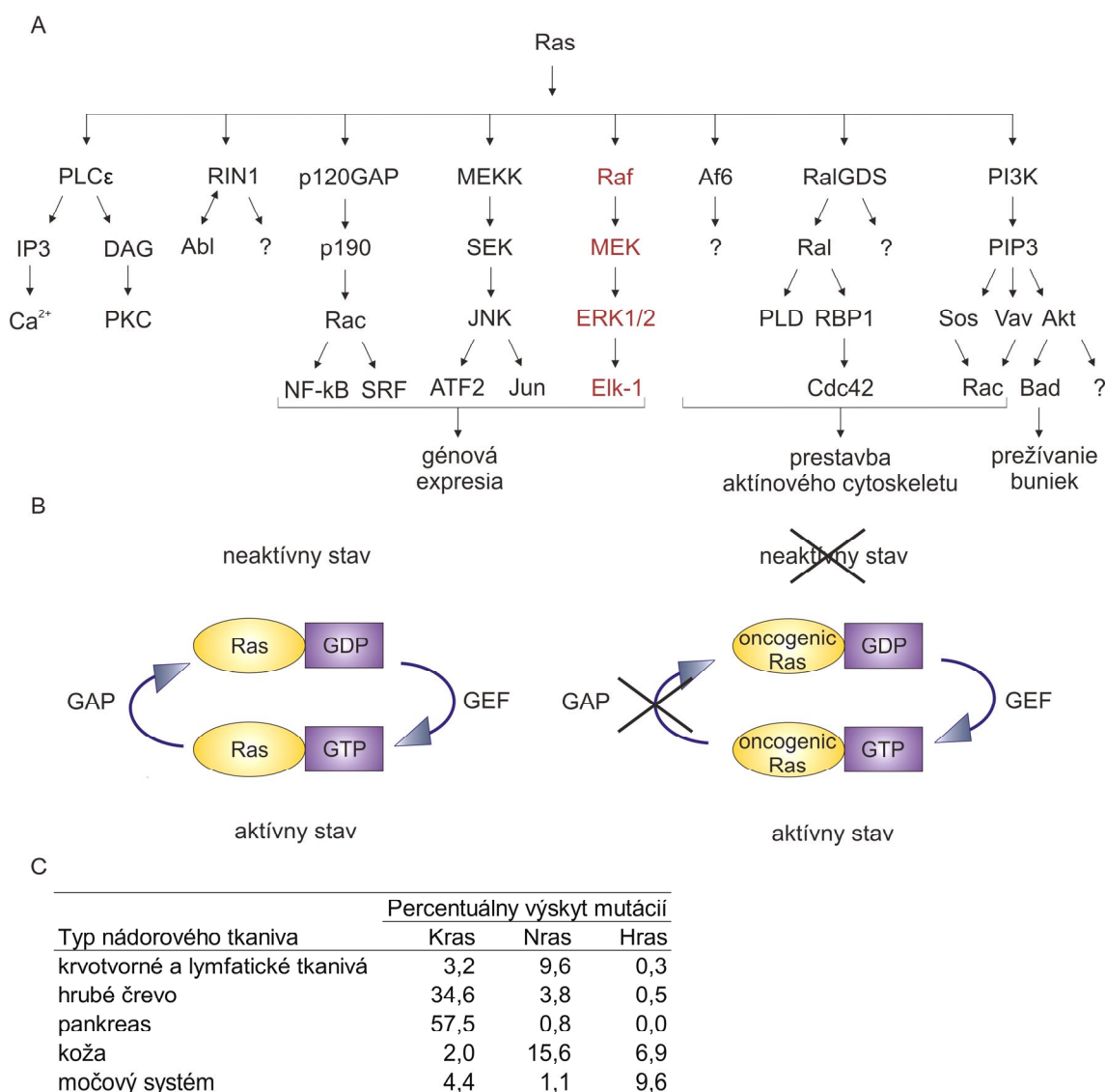
H-Ras podstupuje mono- a diubikvitináciu. HVR proteínu H-Ras obsahuje tri lyzíny, ktoré môžu byť ubikvitinované. Ubikvitinácia cieľi H-Ras k endozómu, stabilizuje asociáciu s nimi a bráni jeho recirkulácii¹⁶.

Ďalším popísaným nekonvenčným transportom palmitoylovaných Ras proteínov je transport pomocou membránových častíc nanometrových rozmerov (cca 80 až 100 nm; angl. raso-somes)¹⁷, ktoré nesú viacero kópií H-Ras alebo N-Ras, ale nie K-Ras (čo súvisí s potrebou palmitoylovej skupiny pre interakciu s RASozómami¹⁷), šíria sa rýchlo v cytoplazme náhodným pohybom nezávislým od ATP. RASozómy nesú Ras proteíny v aktívnej a neaktívnej forme¹⁸, nekolokalizujú s endocytickými alebo exocytickými markermi a sú nezávislé od syntézy proteínov a GA¹⁹ (obr. 2B).

4. Signálne dráhy zahŕňajúce Ras proteíny a ich regulácia

Ras proteíny spúšťajú celý rad signálnych dráh (obr. 3A). Najintenzívnejšie z nich je študovaná mitogénom aktivovaná proteín-kinázová signálna dráha (MAPK – mitogen-activated protein kinase) a to najmä v súvislosti s onkogenézou, nakoľko jej deregulácia predstavuje jednu z primárnych príčin vzniku nádoru²⁰.

V nenádorových bunkách Ras proteíny cirkulujú medzi neaktívnym GDP – viazaným stavom a aktívnym GTP – viazaným stavom¹. Pretože GTP je v bunkách prítomné za fyziologických podmienok vo vyššej koncentrácii ako GDP, Ras proteíny prednostne viažu GTP a tvoria aktívne



Obr. 3. Signálne dráhy zahrňujúce proteíny Ras (A), regulácia aktivity proteínov Ras (B) a nádorové ľudské tkanivá s najvyšším percentuálnym výskytom mutácií v onkogénoch *ras* (C). PLC ϵ – fosfolipáza C, DAG – diacylglycerol, PKC – proteínkináza C, PLD – fosfolipáza D, IP $_3$ – inozitol trifosfát, PIP $_3$ – fosfatidylinozitol trifosfát, MEKK – MEK kináza, SEK – SAPK (stresom aktivovaná proteín kináza)/JNK (Jun N-terminálna kináza) kináza, ERK – extrabunkové signálregulujúce kinázy, p190 – GAP pre členov rodiny Rho, p120GAP – RasGTPázy aktivujúci proteín, Sos – RasGEF, RalGDS – rodina GEF pre Ral, GEF – guanínukleotid výmenný faktor, Akt = PKB – proteín kináza B, GDP – guanozín difosfát, GTP – guanozín trifosfát, GAP – GTPázy aktivujúci proteín, GEF – guanínukleotid výmenný faktor (upravené podľa^{21–23,40,42})

Ras-GTP. Rýchlosť prirodzenej hydrolýzy viazaného GTP samotnými Ras proteínmi (majú GTPázovú aktivitu) je veľmi nízka. Ukončenie aktívneho stavu je za fyziologických podmienok urýchľované GTPázy aktivujúcim proteínom (GAP). Onkogénne Ras proteíny sú rezistentné k aktivite GAP, čoho výsledkom je ich nepretržitá aktivita. Aby mohli byť Ras proteíny opätovne aktivované, guanínukleotid výmenné faktory (GEFs – guanine nucleotide-exchange factors) viažu Ras-GDP, pričom spôsobujú disociáciu viazaného GDP. Ras proteíny sú tak zase prístupné pre väzbu s GTP a cyklus sa uzatvára (obr. 3B).

Ras izoformy sú najčastejšie mutovanými génmi v nádorových tkanivách. Frekvencia výskytu *K-ras* mutácie je najvyššia v nádoroch pankreasu a hrubého čreva, mutovaný *H-ras* gén bol identifikovaný predovšetkým v močovom systéme a *N-ras* mutácie dominujú v melanómoch a v nádoroch lymfatického systému (COSMIC, Wellcome trust Sanger Institute, Cambridge, UK)^{21–23} (obr. 3C).

Mutácie, ktoré sa vyskytujú s najvyššou frekvenciou v géne *K-ras* nádorových buniek, sú lokalizované v kodónoch 12 a 13, menej často v kodónoch 61, 63, 117,

Tabuľka I
Genetické syndrómy spriahnuté s Ras/MAPK signálnou dráhou

Názov syndrómu	Genetická podstata	Kódovaný proteín	Funkcia proteínu
Noonanovej syndróm	PTPN11	SHP2	fosfatáza
	SOS1	SOS1	RasGEF
	RAF1	CRAF	kináza
	KRAS	KRAS	GTPáza
Leopard syndróm	PTPN11	SHP2	fosfatáza
	RAF1	RAF1/CRAF	kináza
Dedičná gingiválna fibromatóza	SOS1	SOS1	RasGEF
Noonaanovej neurofibromatóza typ 1	NF1	Neurofibromín	RasGAP
Costellov syndróm	HRAS	HRAS	GTPáza
Autoimúny lymfoproliferačný syndróm	NRAS	NRAS	GTPáza
Kardio-facio-kutánný syndróm	BRAF	BRAF	kináza
	MAP2K1	MEK1	kináza
	MAP2K2	MEK2	kináza
	KRAS	KRAS	GTPáza
Legius syndróm	SPRED1	SPRED1	inhibitor kináz
Syndróm kapilárnej malformácie - artériovenózne malformácie	RASA1	p120Gap	RasGAP

119 a 146 (cit.^{24–26}). Tieto mutácie sa nachádzajú v blízkosti miesta viažuceho GTP. Somatické zmeny mutácie v pozíciách 12, 13, 61 a 63 spôsobujú konformačné zmeny proteínu K-Ras a tým aj narušenie jeho prirodzenej GTPázovej aktivity, čo má za následok redukciu GTP hydrolyzačnej kapacity²⁷. Mutácie v pozíciách 116, 117, 119 a 146 redukujú nukleotidovú afinitu proteínu K-Ras a tým ovplyvňujú rýchlosť výmeny GDP/GTP. Onkogénne formy Ras proteínu sú zodpovedné za oveľa vyššiu proliferáciu aktivitu nádorových buniek. Transformačná schopnosť onkogénu K-*ras* môže byť výsledkom nadexpresie mutovaných K-*ras* alieli alebo výsledkom delécie divého typu K-*ras* alely²⁸. Divý typ K-*ras* alely môže zároveň potlačiť onkogénnu funkciu mutovanej alely²⁹.

Existuje skupina ľudských genetických syndrómov súhrnne známych ako RASopatie, ktoré sú spôsobené zárodočnou mutáciou (mutácia na úrovni pohlavných buniek) v génoch kódujúcich zložky MAPK signálnej dráhy. Každá z týchto RASopatií na jednej strane vykazuje unikátne fenotypové rysy, na druhej strane mnohé tieto syndrómy zdieľajú charakteristické prekrývajúce sa rysy vrátane kraniofaciálnej dysmorfológie, malformácie srdca a kože, svalovokostenné a očné abnormality, s rôznym stupňom neurokognitívnych zhoršení, v prípade niektorých syndrómov dokonca zvýšené riziko vzniku nádorového ochorenia³⁰. Diagnostiku jednotlivých RASopatií sťažujú prekrývajúce sa klinické znaky a široké spektrum fenotypových prejavov³¹. Preto sa molekulárna analýza stala dôležitým kľúčom k potvrdeniu klinickej diagnózy u jednotlivých pacientov. Zoznam RASopatií spolu s ich molekulárnou charakteristikou je uvedený v tab. I.

5. Záver

Enzymy katalyzujúce jednotlivé kroky posttranslačnej úpravy Ras proteínov sa dostali na vrchol záujmu pri vývoji nových liekov použiteľných či už pri liečbe nádorových ochorení s výskytom mutovaných Ras proteínov alebo pri eliminácii príznakov RASopatií³². Ďalšie úsilie je venované testovaniu látok, ktoré inhibujú jednotlivé zložky Ras/MAPK signálnej dráhy^{33,34}. V neposlednej rade treba spomenúť vývoj inhibície mutovaných foriem Ras proteínov založených na eliminácii expresie Ras proteínov použitím anti-sense RNA³⁵, anti-Ras ribozýmov^{36,37} alebo aplikovaním anti-Ras reovirálny terapie³⁸.

Publikácia bola pripravená vďaka podpore grantovej komisie VEGA pre lekárske a farmaceutické vedy – číslo projektu 1/0407/13 a za podpory projektu MŠMT CZ.1.07/2.3.00/30.0060 podporovaného Evropskými sociálnymi fondy.

Zoznam skratiek

CAAX	C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	extrabunkové signálregulujúce kinázy
FTáza	farnezyltransferáza
GA	Golgiho aparát, Golgiho komplex
GAP	GTPázy aktivujúci proteín
GDP	guanozín difosfát

GEFs	guanínukleotid výmenné faktory
GTP	guanozín trifosfát
GTPáza	guanozíntrifosfatáza
HVR	hypervariabilný región
Icmt	izoprenylcysteínkarboxylmetyltransferáza
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MEK	MAP a ERK kináza
PE	palmitoylsteráza
PM	plazmatická membrána
p120GAP	RasGTPázy aktivujúci proteín
Rce1	Ras meniaci enzým
Sos	RasGEF

LITERATÚRA

- Boguski M. S., McCormick F.: *Nature* 366, 643 (1993).
- Lowy D. R., Willumsen B. M.: *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851 (1993).
- Hancock J. F., Magee A. I., Childs J. E., Marshall C. J.: *Cell* 57, 1167 (1989).
- Willumsen B. M., Christensen A., Hubert N. L., Pageorge A. G., Lowy D.: *Nature* 310, 583 (1984).
- Hancock J. F., Cadwallader K., Marshall C. J.: *EMBO J.* 10, 641 (1991).
- Hancock J. F., Cadwallader K., Paterson H., Marshall C. J.: *EMBO J.* 10, 4033 (1991).
- Sefton B. M., Trowbridge I. S., Cooper J. A., Scolnick E. M.: *Cell* 31, 465 (1982).
- Goodwin J. S., Drake K. R., Rogers C., Wright L., Lippincott-Schwartz J., Philips M. R., Kenworthy A.K.: *J. Cell Biol.* 170, 261 (2005).
- Apolloni A., Prior I. A., Lindsay M., Parton R. G., Hancock J. G.: *Mol. Cell. Biol.* 20, 2475 (2000).
- Murray D., Ben-Tal N., Honig B., McLaughlin S.: *Structure* 5, 985 (1997).
- Bivona T. G., Quatela S. E., Bodemann B. O., Ahearn I. M., Soskis M. J., Mor A., Miura J.: *Mol. Cell* 21, 481 (2006).
- Fivaz M., Meyer T.: *J. Cell Biol.* 170, 429 (2005).
- Villalonga P., López-Alcalá C., Bosch M., Chiloeches A., Rocamora N., Gil J., Marais R., Marshall C. J., Bachs O., Agell N.: *Mol. Cell. Biol.* 21, 7345 (2001).
- Philips M. R.: *Biochem. Soc. Trans.* 33, 657 (2005).
- Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P. J., Koerner C., Lumbierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A., Bastiaens P. I.: *Science* 307, 1746 (2005).
- Jura N., Scotto-Lavino E., Sobczyk A., Bar-Sagi D.: *Mol. Cell* 21, 679 (2006).
- Grunwald A., Gottfried I., Cox A. D., Haklai R., Kloog Y., Ashery U.: *Cell Death Dis.* 4, e496. doi: 10.1038/cddis.2013.16 (2014).
- Ashery U., Yizhar O., Rotblat B., Elad-Sfadia G., Barkan B., Haklai R., Kloog Y.: *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 471 (2006b).
- Rotblat B., Yizhar O., Haklai R., Ashery U., Kloog Y.: *Cancer Res.* 66, 1974 (2006).
- Santarpia L., Lippman S. M., El-Naggar A. K.: *Expert Opin. Ther. Targets* 16(1), 103 (2012).
- <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=HRAS#histo>, stiahnuté 10. januára 2014.
- <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=NRAS#histo>, stiahnuté 10. januára 2014.
- <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS#histo>, stiahnuté 10. januára 2014.
- Barbacid M.: *Eur. J. Clin. Invest.* 20, 225 (1990).
- Rodenhuis S., Slebos R. J.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 142(6), 2:S27 (1990).
- Beránek M., Bureš J., Šácha M., Sákra L., Rajman M., Jandík P., Rudolf E., Landt O.: *Chem. Listy* 101, 738–741 (2007).
- Scheffzek K., Ahmadioan M. R., Kabsch W.: *Science* 277, 333 (1997).
- Marshall C. J.: *Trends Genet.* 7, 91 (1991).
- Zhang Z., Wang Y., Vikis H.G., Johnson L., Liu G., Li J., Anderson M. W., Sills R. C., Hong H. L., Deveaux T. R., Jacks T., Guan K. L., You M.: *Nat. Genet.* 29, 25 (2001).
- Tydyman W. E., Rauen K. A.: *Genet. Dev.* 19, 230 (2009).
- Tartaglia M., Gelb B. D., Zenker M.: *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 161 (2011).
- Winter-Vann A. M., Baron R. A., Wong W., dela Cruz J., York J. D., Gooden D. M., Bergo M. O., Young S. G., Toone E. J., Casey P. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4336 (2005).
- Sebolt-Leopold J. S., Dudley D. T., Herrera R., Van Becelaere K., Wiland A., Gowan R. C., Tecle H., Barrett S. D., Bridges A., Przybranowski S., Leopold W. R., Saltiel A. R.: *Nat. Med.* 5, 810 (1999).
- Bollag G., Freeman S., Lyons J. F., Post L. E.: *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4, 1436 (2003).
- Mukhopadhyay T., Tainsky M., Cavender A. C., Roth J. A.: *Cancer Res.* 51, 1744 (1991).
- Zhang Y. A., Nemunaitis J., Scanlon K. J., Tong A. W.: *Gene Ther.* 7, 2041 (2000).
- Kijima H., Yamazaki H., Nakamura M., Scanlon K. J., Osamura R. Y., Ueyama Y.: *Int. J. Oncol.* 24, 559 (2004).
- Coffey M. C., Strong J. E., Forsyth P., Lee P. W.: *Science* 282, 1332 (1998).
- Prior I. A., Hancock J. F.: *Cell Sci.* 114, 1603 (2001).
- Midgley R. S., Kerr D. J.: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44, 109 (2002).
- Hancock J. F.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373 (2003).
- Vojtek A. B., Der C. J.: *Biol. Chem.* 273, 19925 (1998).

**H. Gbelcová^{a,b}, S. Rimpelová^a, Z. Knejzlík^a,
V. Repiská^b, T. Ruml^a, and D. Böhmer^b** (^a *Department of
Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry
and Technology, Prague,* ^b *Institute of Medical Biology,
Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Co-
menius University, Bratislava*): **RAS Proteins – Key Re-
gulators of Cell Cycle**

RAS proteins are small guanosine triphosphatases controlling the cell growth, differentiation, proliferation, survival, and death. They are encoded by *ras* proto-oncogenes, frequently mutated, in many cancer tissues and in the whole group of congenital defects. Understanding the structure, kinetics and signaling of RAS proteins allow the use of *ras* genes and RAS proteins as diagnostic biomarkers.

ÚLOHA HYPERVARIABILNEJ OBLASTI RAS PROTEÍNOV V ICH VNÚTROBUNKOVOM TRANSPORTE

(The role of hypervariable region of Ras proteins for their targeting)

Helena Gbelcová¹, Vanda Repiská¹, Daniel Böhmer¹, Tomáš Ruml², Zdeněk Knejzlík²

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR, helena.gbelcova@fmed.uniba.sk

² Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠChT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ČR

Súhrn

Ras proteíny sú malé s membránou viazané GTPázy dôležité pre prenos signálov regulujúcich rast, prežitie a diferenciáciu buniek. Rôzne Ras izoformy (H-ras, N-ras, K-ras) sprostredkujú rôzne signály. Za tieto biologické rozdiely je zodpovedný krátky úsek na C-konci Ras proteínov označovaný ako hypervariabilná oblasť. Pre ukotvenie Ras proteínov v bunkových membránach a následnú signalizáciu Ras proteínov je potrebná správna posttranslačná modifikácia hypervariabilnej domény. Procesy súvisiace s posttranslačnou modifikáciou Ras proteínov sa dostali na vrchol záujmu pri dizajnovaní nových liekov použiteľných pri liečbe nádorových ochorení spájaných s mutovanými Ras proteínmi. Aj z tohto dôvodu je nutné poznať presný význam jednotlivých krokov posttranslačných úprav hypervariabilnej oblasti Ras proteínov.

Kľúčové slová

Ras, farnezylácia, palmitoylácia, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum

Summary

Ras proteins are small membrane bound GTPases essential in transducing of the signals that regulate cell growth, survival and differentiation. Different Ras isoforms (H-ras, N-ras, K-ras) generate distinct signal outputs. These biological differences are accounted for the short carboxy-terminal hypervariable domain. The correct posttranslational processing of hypervariable domain is required for Ras association with the cell membranes and signaling. Posttranslational modifications of Ras proteins dominate in designing of new drugs useful in the treatment of cancer diseases caused by mutated Ras proteins. For this reason it is necessary to know the exact role of each step of posttranslational modifications of the hypervariable region of Ras proteins.

Key Words

Ras, farnesylation, palmitoylation, Golgi, Endoplasmic reticulum

Úvod

Ras proteíny v netransformovaných bunkách cirkulujú medzi aktívnym a neaktívnym stavom a tak regulujú bunkový rast, delenie, diferenciáciu, prežívanie a bunkovú smrť (1). Od objavenia takzvanej aktivačnej mutácie *ras* génu v nádorových bunkách ľudí, ktoré odštartovalo intenzívny výskum zameraný na pochopenie štruktúry, kinetiky a signalizácie Ras proteínov, ubehlo už viac ako 30 rokov. Všetky nadobudnuté poznatky viedli k vývoju terapií cielených na Ras proteíny založených na zabránení aktivácie, prípadne správnej posttranslačnej modifikácie Ras proteínov a tým znemožneniu plnenia ich funkcie, alebo na priamej inhibícii transportu signálu nimi bežne sprostredkovaného. Pokroky v technológii sekvenovania umožnili masívne mapovanie kompletného genómu rôznych tkanív, vrátane jednotlivých typov nádorov. *Ras* izoformy sa okamžite dostali do centra pozornosti, nakoľko boli najčastejšie mutovanými génmi v nádorových tkanivách.

Tri *ras* gény (*K-ras*, *N-ras* and *H-ras*) kódujú štyri Ras proteíny (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A and K-Ras4B), nízkomolekulové guanozíntrifosfatázy (GTPázy). Okrem K-Ras4B, ktorý pozostáva zo 188 aminokyselín, všetky Ras proteíny sú tvorené zo 189 aminokyselín (2). Ras proteíny majú mimoriadne podobnú sekvenciu v oblasti domén viažucich efektorov, výmenné faktory a guanínukleotidy (Obr. 1). Jediná oblasť Ras izoformiem, ktorá vykazuje významné rozdiely v sekvenciách báz, je tzv. hypervariabilný región (HVR) na C-konci proteínov pozostávajúci z 24 aminokyselín (Obr. 1). Ten obsahuje dve signálne sekvencie spolupracujúce na celení Ras proteínov k plazmatickej membráne (PM). Prvou z nich je CAAX motív (C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín) (3,4), druhú tvorí polybázický úsek šiestich lyzínových zvyškov (175-180) v K-Ras4B, alebo cysteín 180 v K-Ras4A, 181 v N-Ras, a 181 a 184 v H-Ras (2,3,5)(Obr. 1).

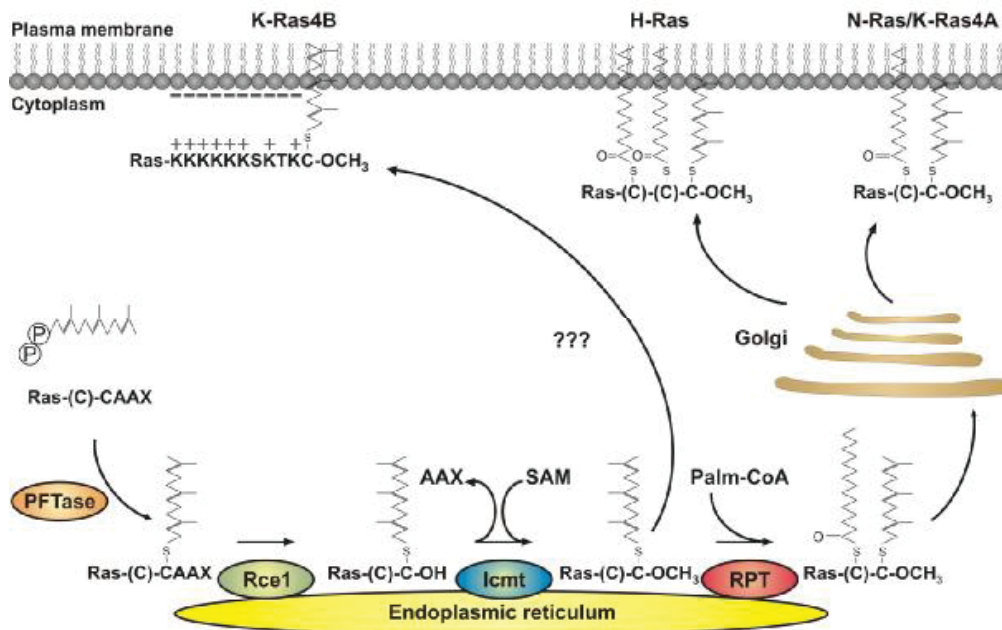
	hypervariabilná oblasť	lipidová modifikácia
H-Ras	HKLRKLNPPDESGP GCMSCKCVLS	farnezylácia, palmitoylácia
N-Ras	YRMKKLNSDDGTQG CMGLPCVLM	farnezylácia, palmitoylácia
K-Ras4A	YRLKKISKEEKT PGCVKIKKCIIM	farnezylácia, palmitoylácia
K-Ras4B	HKEKMSKD GKSKKSKTKCMIM	farnezylácia

Obr. 1 Štruktúra Ras hypervariabilnej oblasti (upravené podľa (6,7)).

Procesovanie a vnútrobunkový transport Ras proteínov k PM je znázornený na Obr. 2. Farnezylácia Ras proteínov je nevyhnutná pre ich transport k PM a ukotvenie v nej. Novo syntetizované prekursor Ras proteínov po farnezylácii v cytoplazme smerujú k ER, kde prebiehajú ďalšie modifikačné kroky, ktoré sú pre jednotlivé Ras izoformy rôzne. Zatiaľ čo H-Ras, N-Ras a K-Ras4A vyžadujú palmitoyláciu pre transport na ER a Golgiho aparát (GA) a následný vezikulárny transport k PM, nepalmitoylovaný K-Ras4B nepodstupuje konvenčnú sekrečnú dráhu, ale smeruje z ER priamo na PM doteraz presne neopísaným, GA nezávislým spôsobom (8,9) (Obr. 2). Úsek šiestich susediacich lyzínov a päť ďalších lyzínových zvyškov v HVR spájajú K-Ras4B prostredníctvom iónových interakcií s negatívnym nábojom hláv fosfolipidových skupín v PM. Palmitát palmitoylovaných Ras proteínov tiež prispieva k membránovej interakcii jeho schopnosťou vložiť sa hlboko do lipidovej dvojvrstvy (10,11).

Procesovanie CAAX motívu začína v cytoplazme FTázou, ktorá na cysteín v motíve pridáva farnezylovú skupinu. Dokončenie procesovania prebieha na ER pomocou Rce1 (odstránenie AAX tripeptidu) a Icm1 (metylácia použitím SAM ako substrátu) enzýmov. K-Ras je následne

translokovaný z ER na PM GA nezávislým spôsobom. H-Ras a N-Ras, sú palmitoylované RPTázou (vyžíva Palm-CoA ako substrát), a translokované klasickou sekrečnou cestou cez GA na PM. C - cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín, FTáza - farnesyltransferáza, ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, Icmt – izoprenylcysteinkarboxymetyltransferáza, Rce1 - Ras meniaci enzým, Palm-CoA - palmitoyl koenzým A, SAM - S-adenozylmetionín, RPT - ER-lokalizovaná palmitoyltransferáza, PM – plazmatická membrána (upravené podľa (12)).



Obr. 2 Posttranslačná modifikácia a konvenčný vnútrobunkový transport Ras proteínov.

Vďaka tomu, že farnesylácia predstavuje kľúčový krok v správnej posttranslačnej modifikácii a následnej signalizácii Ras proteínov, enzýmy katalyzujúce tieto deje sa dostali na vrchol záujmu pri dizajnovaní nových liekov použiteľných pri liečbe nádorových ochorení s výskytom mutovaných Ras proteínov (12). Nemalá pozornosť je v súvislosti s inhibíciou farnesylácie Ras proteínov venovaná aj statínom, v súčasnosti svetovo najpoužívanejšej skupine látok na zníženie hladiny cholesterolu v krvi. Statíny inhibujú tzv. mevalonátovú dráhu v jej rýchlosť limitujúcom kroku, ktorej medziproduktom je práve farnesylpyrofosfát potrebný pre správnu modifikáciu Ras proteínov. Kanceroprotektívne účinky statínov proti vzniku pľúcnych nádorov a nádorov prostaty v dávkach používaných na liečbu hypercholesterolémie boli popísané v retrospektívnej štúdií vykonanej na skupine bez mála 500 000 amerických vojnových veteránov (13). V klinickej praxi v úlohe protinádorových látok zatiaľ statíny nevystupujú v dôsledku nepresne definovaného veľkého množstva nežiaducich vedľajších účinkov, ktoré by mohli mať v dávkach s terapeutickým účinkom.

Z tohto dôvodu sme pripravili konštrukty kódujúce GFP značené N-Ras proteíny (celý a aj jeho C-koniec) simulujúce inhibíciu farnesylácie alebo palmitoylácie a sledovali vplyv týchto mutácií na vnútrobunkovú lokalizáciu daných proteínov.

Materiál a metódy

Bunky

HEK 293T – ľudské primárne embryonálne bunky obličky transformované adenovírusom (ATCC, Manassas, VA, USA)

HeLa – ľudské epitelové bunky izolované z nádoru krčka maternice (ATCC, Manassas, VA, USA)

Plazmidy

pEGFP-C1 (Clontech, CA, USA)

pDsRed2-ER (Clontech, CA, USA) – umožňuje fluorescenčné značenie endoplazmatického retikula v cicavčích bunkách

pDsRed-Monomer-Golgi (Clontech, CA, USA) – umožňuje fluorescenčné značenie Golgiho aparátu v cicavčích bunkách

Oligonukleotídy

+BglIII_Nras 5'- GCAAGATCTATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGG
-Pst_Nras 5'- TTTCTGCAGTTACATCACCACACATGGCAATCCCATACA
+NrasC181S 5'- GATGATGGGACTCAGGGTAGTATGGGATTGCCATGTGTG
-NrasC181S 5'- CACACATGGCAATCCCATACTACCCTGAGTCCCATCATC
-Nras(C186S)Pst 5'- TGCAGTGCAGTTACATCACCACACTTGGCAATCCCATACAA
+HVR-NRAS-BglIII 5'- GAAGATCTCAGTACCGAATGAAAAAACTCAACAG
-HVR-NRAS-PstI 5'- ATGCACTGCAGTTACATCACCACACATGGCAATCCCAT

Kultivácia buniek

Bunkové línie HEK 293T a HeLa boli kultivované v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5% CO₂. Na kultiváciu bolo použité médium DMEM (Dulbeccom modifikované Eaglovo médium, Sigma, USA) obohatené fetálnym sérom (10%, Sigma, USA).

Príprava DNA konštruktov

Konštrukt	Primery	Templát	Vektor	Metóda
pEGFPNrasWT	+BglIII_Nras -Pst_Nras	HeLa total RNA	pEGFP-C1	RT-PCR
pEGFPNrasC181S	+NrasC181S -NrasC181S	pEGFPNrasWT	-	PCR mutagenesis
pEGFPNrasC186S	+BglIII_Nras -Nras(C186S)Pst	pEGFPNrasWT	-	PCR mutagenesis
pEGFPNrasCendWT	+HVR-NRAS-BglIII -HVR-NRAS-PstI	pEGFPNrasWT	pEGFP-C1	PCR
pEGFPNrasCendC181S	+HVR-NRAS-BglIII -HVR-NRAS-PstI	pEGFPNrasC181S	pEGFP-C1	PCR
pEGFPNrasCendC186S	+HVR-NRAS-BglIII -Nras(C186S)Pst	pEGFPNrasC186S	pEGFP-C1	PCR

Tab. 1 Príprava DNA konštruktov

Konštrukty kódujúce proteíny Ras boli vytvorené ligáciou fragmentov DNA (vytvorené pomocou RT-PCR alebo PCR) a vhodných vektorov alebo cieľnou PCR mutagenézou z vopred pripravených konštruktov (tab.1). Správnosť pripravených konštruktov bola overená sekvenovaním DNA. Expresné produkty všetkých konštruktov boli analyzované metódou Western blot.

Celková RNA bola izolovaná z bunkovej línie HeLa pomocou komerčnej súpravy RNeasy Kit (Qiagen, USA). *N-ras* onkogén bol izolovaný metódou RT-PCR pomocou komerčnej súpravy Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma, USA). Zloženie reakčnej zmesi RT-PCR a teplotné a časové parametre zodpovedali odporúčaniam výrobcu komerčnej súpravy. Primery pre amplifikáciu 570-bp dlhých *N-ras* cDNA fragmentov sú uvedené vyššie. Produkty boli prečistené pomocou komerčnej súpravy GIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA).

Lepivé konce plazmidov a DNA fragmentov boli produkované reštrikčnými endonukleázami *BglIII* a *PstI* (New England Biolabs, USA). Linearizované molekuly DNA plazmidu boli defosforylované alkalickou fosfatázou CIP (New England Biolabs, USA).

Ligačná reakčná zmes obsahovala DNA (plazmid a fragmenty), T4-DNA ligázu (New England Biolabs, USA) a tlmivý roztok pre T4-DNA ligázu (New England Biolabs, USA). Ligovanou DNA boli transformované kompetentné bunky *E. coli* kmeňa DH5 α (Clontech, USA).

Jednotlivé kolónie transformovaných *E. coli* DH5 α boli prenesené do 3 ml LB (Luria-Bertani) média (10 g/l tryptón, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) a inkubovali sa cez noc pod kanamycínovým selektívnym tlakom. Bakteriálne pelety vytvorené z 1,5 ml suspenzie boli resuspendované v 200 μ l tlmivého roztoku STETL (50 mM Tris, pH 8; 50 mM EDTA; 5% Triton X-100, 8% glukóza; 0,5 mg/ml lyzozým) a inkubované vo vriacom vodnom kúpeli po dobu 30 sekúnd. Lyzáty boli odstredené pri 24000 g počas 15 minút pri laboratórnej teplote. Sedimenty sa odstránili a supernatanty boli inkubované po dobu 30 minút pri 37 °C s 1 μ l RNázy A (10 mg / ml, Roche, Nemecko). Pridalo sa 200 μ l izopropanolu a inkubovalo ďalších 15-30 minút pri teplote -20 °C. Vyzrážané DNA boli peletované odstredovaním pri 24000 g počas 5 minút pri teplote 4 °C. DNA pelety boli premyté 200 μ l 70% etanolu a resuspendované v 20 μ l vody bez nukleázy.

Konštrukty majúce mutáciu v hypervariabilnej oblasti boli pripravené cieľnou PCR mutagenézou pripraveného konštrukt pEGFPNrasWT (tab. I). Páry oligonukleotidových primérov boli navrhnuté tak, aby obsahovali požadovanú mutáciu približne vo svojom strede. PCR reakcia obsahovala 5-50 ng DNA templátu, 250 ng zmesi oligonukleotidových primérov, 1 μ l zmesi dNTP, 5 μ l 10 x reakčného tlmivého roztoku a 1 μ l PFU DNA polymerázy (Promega, UK) Reakčná zmes bola doplnená vodou bez nukleáz na konečný objem 50 μ l. Parametre cieľnej PCR mutagenézy PCR boli nasledovné: 1 x (95 °C - 4 minúty), 16 x (55 °C - 1 minúta, 68 °C - 10 minút, 95 °C - 1 minúta).

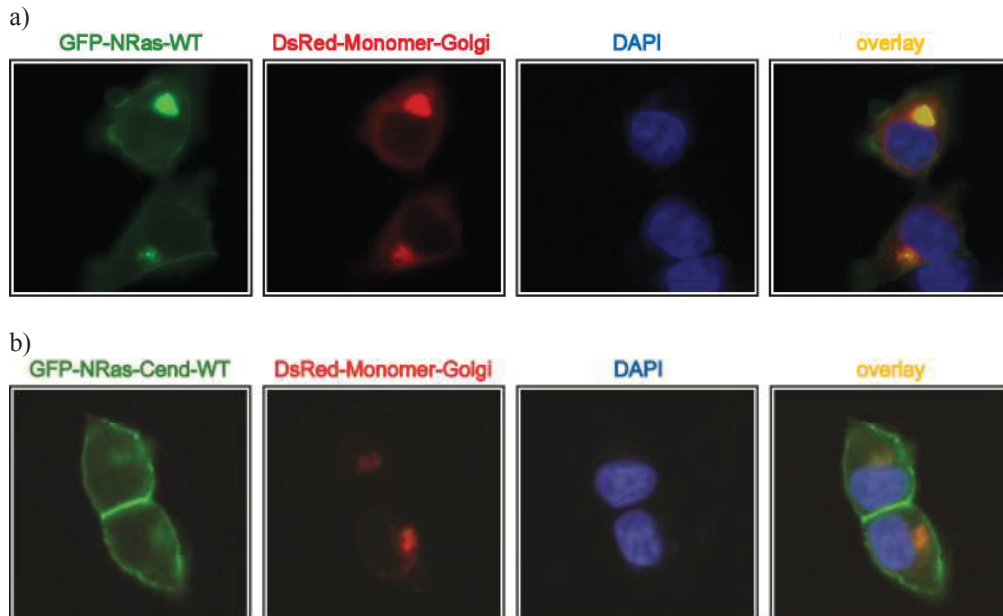
Nereplikované molekuly DNA sa štiepili enzýmom *DpnI* (New England Biolabs, USA). Pripravené konštrukty boli prečistené pomocou komerčnej súpravy MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, USA). Následne nimi boli transformované bunky *E. coli* kmeňa DH5 α .

Transfekcia tkanivových buniek a fluorescenčná mikroskopia.

Bunky boli inokulované na sterilné krycie sklíčka umiestnené na dne 6-jamkovej doštičky pre kultiváciu buniek 5 hodín pred transfekciou. Transfekcia bola vykonaná pomocou transfekčného činidla Fugen 6 (Roche, nemecko) v súlade s pokynmi výrobcu. Po 24 hodinách boli bunky premyté fosfátovým tlmivým roztokom a fixované po dobu 20 minút so 4% formaldehydom vo fosfátovom tlmivom roztoku. Po fixácii boli jadrá buniek zafarbené DAPI (Sigma, USA). Intracelulárnu lokalizáciu proteínov bola vizualizovaná fluorescenčným mikroskopom pomocou softvéru QuickPHOTO CAMERA 2.1 (Olympus, Japan).

Výsledky a diskusia

Pre detekciu rozdielov v lokalizácii N-Ras proteínu značeného pomocou GFP (zelený fluorescenčný proteín) a jeho variantov modifikovaných na C-konci boli použité Fluorescenčné markery Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula.

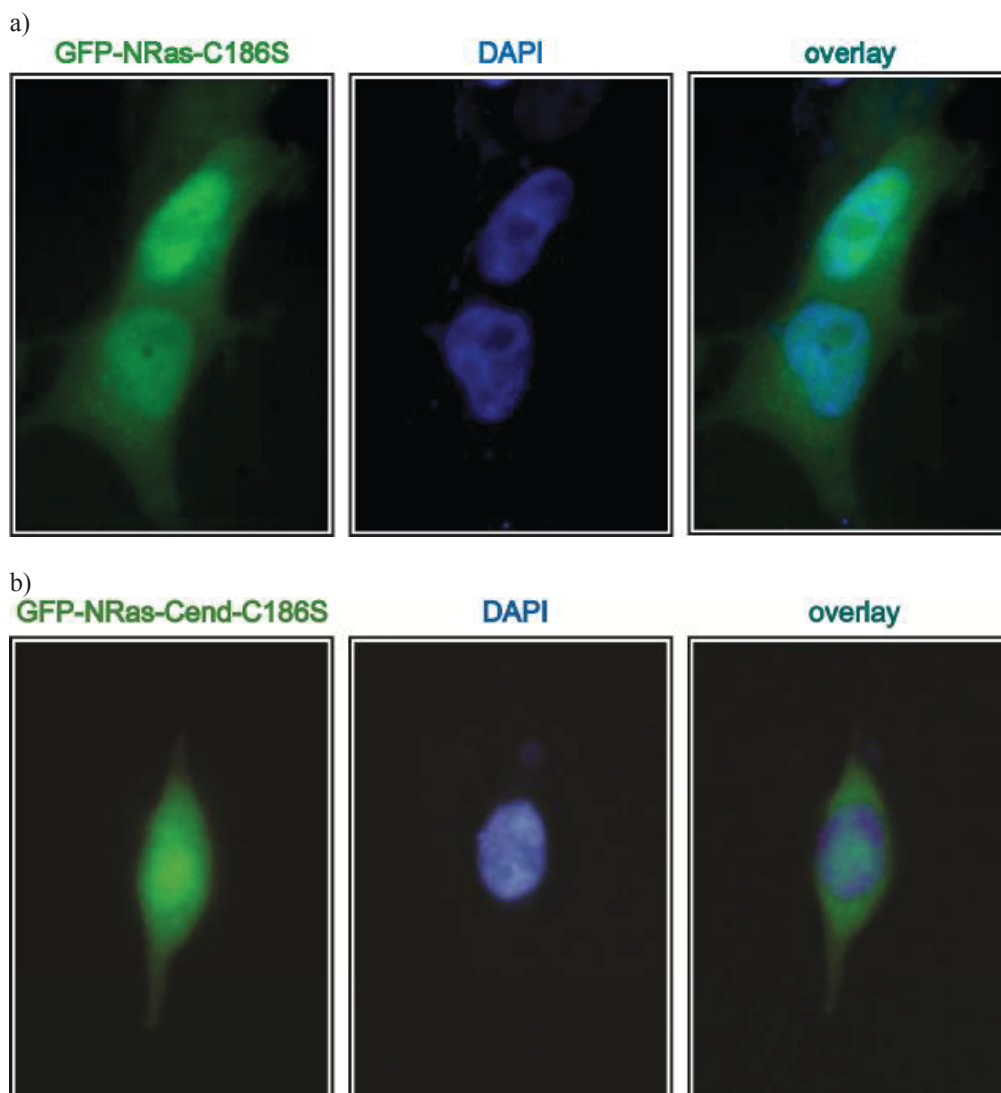


Obr. 3 Lokalizácia GFP-NRas-WT proteínu a jeho C-konca v bunke.

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasWT konštruktom a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (marker Golgiho aparátu), b) pEGFPNrasCendWT konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (Golgi marker). Jadrá sú farbené s DAPI.

Prítomnosť proteínu GFP-N-Ras-WT (obr. 3a) na plazmatickej membráne je v súlade s ďalšími publikovanými údajmi (9) plazmidu, avšak Golgi je jediná intracelulárna membrána, kde bola akumulácia GFP-N-Ras-WT proteínu pozorovaná. V prípade GFP-N-Ras-Cend-WT proteínu (obr. 1b), je nahromadených viac proteínov na PM ako v Golgiho aparáte. To naznačuje, že hypervariabilná oblasť nie je jediná doména proteínu GFP-N-Ras, ktorá je zodpovedná za jeho intracelulárne cielenie, ale nie je jasné, či tento jav je výsledkom akumulácie GFP-N-Ras-Cend-WT na plazmatickej membráne alebo skôr výsledkom jeho uľahčeného uvoľnenia z Golgiho aparátu.

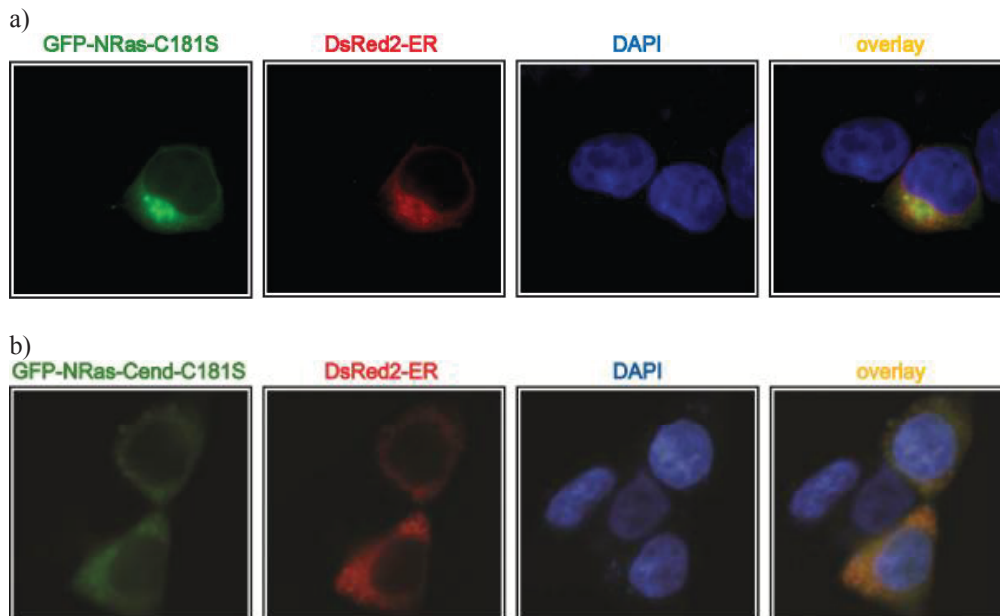
Ako vyplýva z obrázkov 3 a 4, farnezylácia je nevyhnutná pre cielenie na plazmatickú membránu alebo intracelulárne membrány oboch proteínov GFP-N-Ras aj GFP-N-Ras-C-end. Okrem toho je lokalizácia oboch proteínov s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnezylácie (GFP-N-Ras-C186S a GFP-N-Ras-Cendo-C186S) rovnaká a je v súlade s lokalizáciou značeného GFP K-Ras proteínu v bunkách ošetrovaných statínmi, ktoré inhibujú mevalonátovú dráhu (14) a teda aj syntézu farnezylopyrofosfátu potrebného pre farnezyláciu nie len Ras proteínov, tj v cytoplazme (obr. 4).



Obr. 4 Lokalizácia GFP-NRas-C186S proteínu a jeho C-konca v bunke – simulácia inhibície farnesyľácie.

HEK 293T bunky tranzientne transfekované a) pEGFPNrasC186S konštruktom (simulácia inhibície farnesyľácie) b) pEGFPNrasCendC186S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnesyľácie značená zeleným fluorescenčným proteínom). Jadrá sú farbené s DAPI.

Obrázok 5 naznačuje, že palmitoyľácia cysteínu v pozícii 181 je potrebná predovšetkým ako signál pre odchod proteínu GFP-N-Ras z endoplazmatického retikula. Lokalizácia proteínov GFP-N-Ras-C181S a GFP-N-Ras-Cend-C181S v bunke je rovnaká, nie sú lokalizované na plazmatickej membráne a hromadia sa na ER.



Obr. 5 Lokalizácia GFP-NRas-C181S proteínu a jeho C-konca v bunke – simulácia inhibície palmitoylácie.

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasC181S konštruktom (simulácia inhibície palmitoylácie) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula), b) pEGFPNrasC181S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu palmitoylácie značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula). Jadrá sú farbené s DAPI.

Záver

Zdá sa, že okrem hypervariabilnej oblasti existuje v Ras proteíne ešte ďalšia doména zodpovedná za jeho intracelulárnu lokalizáciu. Avšak úloha tejto hypotetickej ďalšej domény je závislá na predchádzajúcej farnezylácii a palmitoylácii hypervariabilnej oblasti.

PodĎakovanie

Publikácia bola pripravená vďaka podpore grantovej komisie VEGA pre lekárske a farmaceutické vedy - číslo projektu 1/0051/16.

Literatúra

1. **Boguski MS, McCormick F.** Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993, 366: 643-654.
2. **Lowy DR, Willumsen BM.** Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 851-891.
3. **Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ.** All Ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989, 57: 1167-1177.
4. **Willumsen BM, Christensen A, Hubert NL, Papageorge AG, Lowy D.** The p21 ras C terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 1984, 310: 583-586
5. **Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ.** Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras (B)EMBO J 1991, 10: 641-646.
6. **Prior IA, Hancock JF.** Compartmentalization of Ras proteins. *Cell Sci* 2001, 114: 1603-1608.

7. **Midgley RS, Kerr DJ.** Ras as a target in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, 44: 109-120.
8. **Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JG.** H-Ras but not K-Ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 2475-2487.
9. **Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR.** Endomembrane trafficking of Ras: CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 1999, 98: 69-80.
10. **Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S.** Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 1997, 5: 985-989.
11. **Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG.** Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999, 1: 98-105.
12. **Cox AD, Der CJ, Philips MR.** Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res.* 2015, 21(8): 1819-1827.
13. **Khurana V, Sheth A, Caldito G, Barkin JS.** Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas* 2007, 34: 260-265.
14. **Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Kudla M, Balaž P, Ruml T, Víték L.** Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer, *Int J Cancer* 2008, 122: 1214-1221.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer

Helena Gbelcová^{1,2}, Silvie Rimpelová², Tomáš Ruml², Marie Fenclová², Vítek Kosek², Jana Hajšlová², Hynek Strnad³, Michal Kolář³ & Libor Vítek⁴

Received: 20 July 2016

Accepted: 06 February 2017

Published: 09 March 2017

Statins, besides being powerful cholesterol-lowering drugs, also exert potent anti-proliferative activities. However, their anti-cancer efficacy differs among the individual statins. Thus, the aim of this study was to identify the biological pathways affected by individual statins in an *in vitro* model of human pancreatic cancer. The study was performed on a human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2, exposed to all commercially available statins (12 μ M, 24 h exposure). DNA microarray analysis was used to determine changes in the gene expression of treated cells. Intracellular concentrations of individual statins were measured by UPLC (ultra performance liquid chromatography)-HRMS (high resolution mass spectrometer). Large differences in the gene transcription profiles of pancreatic cancer cells exposed to various statins were observed; cerivastatin, pitavastatin, and simvastatin being the most efficient modulators of expression of genes involved namely in the mevalonate pathway, cell cycle regulation, DNA replication, apoptosis and cytoskeleton signaling. Marked differences in the intracellular concentrations of individual statins in pancreatic cancer cells were found (>11 times lower concentration of rosuvastatin compared to lovastatin), which may contribute to inter-individual variability in their anti-cancer effects. In conclusion, individual statins exert different gene expression modulating effects in treated pancreatic cancer cells. These effects may be partially caused by large differences in their bioavailability. We report large differences in gene transcription profiles of pancreatic cancer cells exposed to various statins. These data correlate to some extent with the intracellular concentrations of statins, and may explain the inter-individual variability in the anti-cancer effects of statins.

Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase (Fig. 1), represent the dominant class of compounds for treatment of hypercholesterolemia due to their ability to inhibit *de novo* cholesterol synthesis. In addition to their hypolipidemic effects, owing to depletion of the mevalonate pathway products, statins also exert many other pleiotropic biological activities, preventing the progression of diseases associated with inflammation, increased oxidative stress, and proliferation¹. Since the introduction of lovastatin as the first novel cholesterol-lowering drug in 1980's, our understanding of the biological activities of statins has dramatically changed. The potential anti-cancer effects of statins were experimentally demonstrated as early as 1985². Since then, a number of experimental as well as clinical studies, demonstrating the apparent effect of statins on cell proliferation of a variety of tumors have been published (for comprehensive reviews, see refs 1,3). Although multiple biological pathways contribute to the anti-proliferative effects of statins, inhibition of protein prenylation (a critical event in the posttranslational modulation of proteins involved in the regulation of cell cycle progression, proliferation, and signaling pathways) seems to be the most important⁴. Among many protein targets, activation of the Ras protein *via* farnesylation is a key step in cell proliferation. In fact, activation mutations of the *ras* oncogene are present in about 30% of human cancers, and more than 90% of pancreatic cancers⁴.

¹Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. ²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic. ³Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ⁴Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.V. (email: vitek@cesnet.cz)

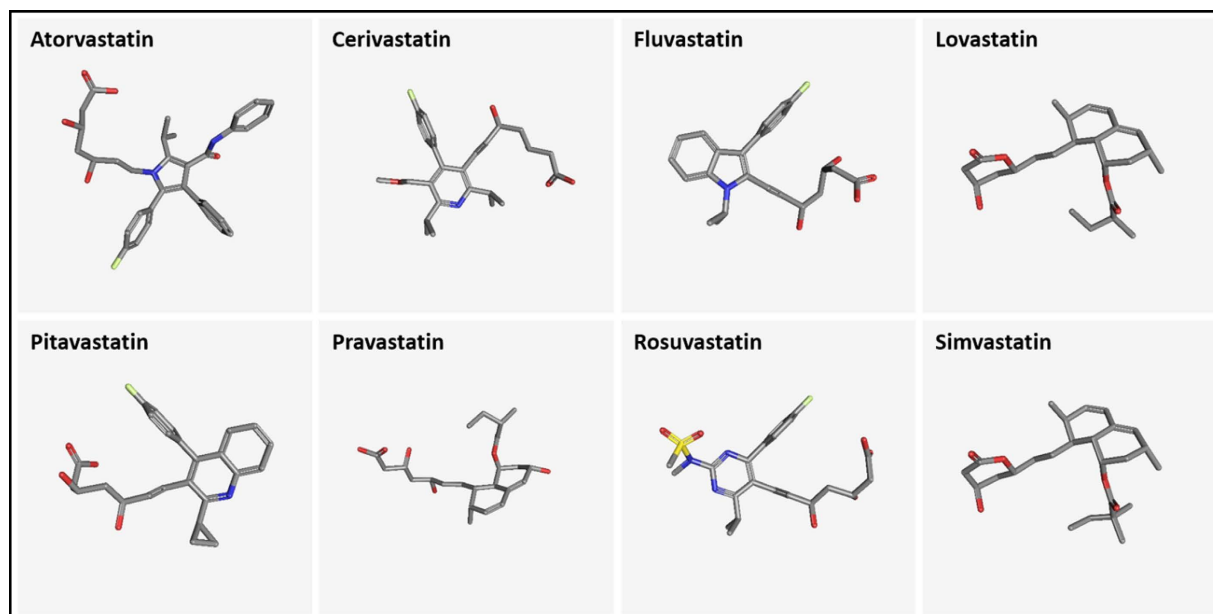


Figure 1. 3D conformers of commercially available statins. Grey – carbon, red – oxygen, blue – nitrogen, light green – fluorine, yellow – sulphur.

The majority of clinical data on the potential anti-cancer effects of statins is based on extensive cardiovascular studies. As far as pancreatic cancer, some of these studies have indeed demonstrated a significantly decreased incidence of cancer among statin users, despite a relatively short observation period and improper patient selection (the studies were primarily focused on prevention of cardiovascular diseases)^{5,6}; nevertheless, other data are not supportive^{7–10}. There are many possible reasons for these discrepancies, including methodological bias¹¹, socio-economical aspects¹², as well as possible differences in the biological activities of individual statins¹³. In our previous study¹³, we reported substantial differences in the anti-cancer effects of individual commercially available statins, and speculated on the possible reasons for these observations.

The aim of this present study was to assess the gene expression profiles in human pancreatic cancer cells bearing an activation mutation in the *ras* oncogene, which were exposed to individual statins.

Materials and Methods

Materials. In all experiments, pure forms ($\geq 98\%$) of the following statins were used: atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin, pravastatin, rosuvastatin, and pitavastatin (Alexis; San Diego, CA, USA). All statins were tested in $12\ \mu\text{M}$ concentrations, representing the IC_{50} value for simvastatin after a 24 h treatment of MiaPaCa-2 cancer cells; simvastatin was chosen as the most effective clinically used statin tested *in vitro* in our previous study¹³. All statins were dissolved in methanol.

Cell culture. Human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2 (ATCC, Manassas, VA, USA), bearing an activation mutation in the *ras* oncogene was maintained in the exponential phase of growth in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C . The final concentration of methanol, which was used for dissolving statins, was below 1%. The cell line was authenticated at ATCC by STR profiling before distribution, and also reauthenticated by the end of study by external laboratory (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic).

Cell growth and viability assessment. The *in vitro* effects of individual statins (pravastatin, atorvastatin, simvastatin, lovastatin, cerivastatin, rosuvastatin, and fluvastatin) on the viability of human pancreatic cancer cells were evaluated in Gbelcová *et al.*¹³. Here, we have assessed the potential anti-proliferative effect of pitavastatin by the same procedure using MiaPaCa-2 cells. The quantity of $2.7 \cdot 10^5$ cells per mL was used for inoculation of individual wells in 6-well plates (total media volume of 2 mL). After 24 h of incubation, the cells were treated with pitavastatin (10, 20, 30 and $40\ \mu\text{M}$ concentrations) dissolved in fresh cell culture media; untreated cells and cells only treated with the vehicle (methanol) served as controls. After 24 h, the medium was removed, the cells were gently washed with PBS, detached from the plate surface by 0.25% trypsin-EDTA solution, and resuspended. Cell growth and viability were determined by direct counting under an inverse microscope using the 0.4% trypan blue exclusion test.

Determination of intracellular concentrations of statins. MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells were exposed to individual statins ($12\ \mu\text{M}$) for 24 h. The cells were then scraped and homogenized in isopropanol to precipitate proteins. After centrifugation, an aliquot of supernatant was used for target analyte quantification (UPLC, Dionex UltiMate[®] 3000 RSLC; Thermo Scientific, CA, USA), coupled to a HRMS with a Q-orbitrap mass analyzer (Q-Exactive[™]; Thermo Scientific) with a heated electrospray ion source. An Acquity BEH C18 ($1.7\ \mu\text{m}$,

2.1 mm × 100 mm; Waters, MA, USA) separation column was used for chromatographic separation of sample components (mobile phase A consisting of 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid in water:methanol (95:5, v/v); mobile phase B consisted of 5 mM aqueous ammonium formate and 0.1% in 2-propanol:methanol:water (65:30:5, v/v)). To assess the impact of the intracellular concentration of statins on the cancer cell proliferation, a sample of the cancer cells treated with respective statin was used for determination of the intracellular concentration of statins. A parallel cancer cell sample cultured and treated under identical conditions was used to assess the cancer cell proliferation (measured by WST-1 test, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

The quantitation was done by external standard calibration curve (as standards, all commercially available statins were used as described above). Lower limits of quantitation (LLOQ) ranged from 1 to 20 ng/mL, the linear dynamic range was 1000 ng/mL for all analytes. Relative standard deviations did not exceed 11%. As a quality control, the following procedure was used. Statin standards of a known concentration (100 ng/mL) were added to a defined number of otherwise untreated pancreatic cancer cells, which were scraped after 30 min incubation, processed in an identical way as described above, and individual statins were measured in each control cells.

DNA Microarray Analysis. MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells (1.5×10^5 per mL) were used for inoculation of three parallel cultures (10 cm² culture dish, total media volume equal to 10 mL). After 24 h of incubation the cells were treated with statins (12 μM concentration), and dissolved in fresh cell culture media; untreated cells, and cells treated only with the solvent (methanol) served as controls. The cells were further incubated for 24 h. Then, the cells were lysed in the stage of subconfluency using the RLT lysis buffer supplied in the RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA). Total RNA was isolated by RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to the procedure for animal cells. The quantity of the RNA was measured by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies LLC, DE, USA). The quality of the RNA was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, USA). RNA samples that had a RIN (RNA integrity number) above 9 were used for further analysis.

Illumina HumanWG-6_V3 Expression BeadChips (Illumina, CA, USA) were used for the microarray analysis, following the standard protocol. In brief, 150 ng of RNA was amplified with an Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, TX, USA), and 1.5 μg of labeled RNA was hybridized on the chip according to the manufacturer's procedure. The analysis was performed in at least two replicates per group (see Suppl. Table 1). To control physiological consistency of the results, the additional Petri-dish replicates for two groups (control and simvastatin) were used, and parallel experiments with 6 μM concentration for all statin groups were also performed. In addition, the technical quality of the microarray data was controlled by technical replicates (see Suppl. Table 1).

The raw data were preprocessed using GenomeStudio software (version 1.9.0.24624; Illumina, CA, USA), and analyzed within the limma package of the Bioconductor as described elsewhere¹⁴. In short, the transcription profiles were background corrected using a normal-exponential model, quantile normalized and variance stabilized using a base 2 logarithmic transformation.

A moderated t-test was used to detect transcripts differentially expressed between the treated samples and the controls. Those transcripts with a false discovery rate smaller than 0.05, and a fold change smaller than 0.5 or higher than 2, were reported and used in the downstream analysis. The MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) compliant transcription data was deposited in the ArrayExpress database (accession E-MTAB-3979). Further, we performed the gene set enrichment analysis (GSEA) on KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathways¹⁵ using the Fisher's exact test and the approach published by Tian *et al.*¹⁶.

Quantitative real-time PCR. Reverse transcription was performed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). All experiments were performed in two replicates with all statins (except for rosuvastatin and pravastatin, the least efficient statins from the microarray analyses). The RT-PCR was performed on LightCycler 2.0 System using a LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany) and analyzed by LightCycler software. The resulting crossing point values were normalized using reference genes RPS9, TBP, and GAPDH. Relative fold changes of expression intensity in statin-treated against control samples were computed under the assumption of perfect effectivity of the PCR amplification. Statistical significance was estimated using Student's t-test. All computations were performed within the R environment¹⁷. The list of amplicons/primers of randomly selected target and housekeeping genes are provided in Suppl. Table 2.

STITCH analysis. A functional association network predicted for all eight commercially available statins was created using an interaction network database for small molecules and proteins (based on STRING), STITCH 4.0 (Search Tool for Interaction of Chemicals)¹⁸. Individual input nodes were atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin. The action view diagrams were generated to illustrate the known protein-chemical relationships of all connected nodes. The view of the statin association network was generated for *Homo sapiens* according to known and predicted interactions including direct (physical) and indirect (functional) associations derived from genomic contexts, high-throughput experiments, co-expression, and literature mining. The confidence score was set to high, equal to 0.850, with a maximum of 150 interactions. The line thickness indicates the confidence score; individual colors indicate the type of the interaction: binding in blue (a ball), activation in green (arrow), inhibition in red (a perpendicular stripe), catalysis in magenta (a ball), the same activity in cyan, and reaction in black (a ball). Individual nodes were clustered based on the Markov clustering algorithm (MCL, inflation equal to 4)¹⁹.

Results

Relationships among cell viability, statin penetrance, and gene expressions in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells exposed to individual statins. Since IC₅₀ values for individual statins differ

IC ₅₀ studies* [24h exposure, μ M]	Gene expression studies	Upregulated genes (No.)	Downregulated genes (No.)	Total genes with changed expression (No.)	i.c. concentration of statin [nmol/100 000 cells]**	Proportion of i.c. statin concentration to that of lovastatin [%]	Lipophilicity of statins***		
Cerivastatin	10	Cerivastatin	397	268	665	Lovastatin	301.1	—	Atorvastatin
Simvastatin	12	Pitavastatin	344	320	664	Fluvastatin	189.1	97	Simvastatin
Lovastatin	13	Simvastatin	128	38	166	Simvastatin	156.4	61	Pitavastatin
Pitavastatin	20	Fluvastatin	59	15	74	Cerivastatin	146.3	56	Cerivastatin
Fluvastatin	26	Atorvastatin	41	10	51	Atorvastatin	111.5	52	Fluvastatin
Atorvastatin	27	Lovastatin	33	5	38	Pitavastatin	92.6	36	Lovastatin
Pravastatin	29	Pravastatin	0	0	0	Pravastatin	50.7	25	Pravastatin
Rosuvastatin	36	Rosuvastatin	0	0	0	Rosuvastatin	26.6	18	Rosuvastatin

Table 1. The effect of individual statins on viability, cell penetrance, and gene expression in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Data retrieved from¹³ were combined with those of pitavastatin experiment. **i.c. statin concentration measured at the end of 24-h incubation and recalculated to 100 000 cells to take into account different antiproliferative potential of individual statins. ***Statins sorted from the most to the least lipophilic compounds. Lipophilicity of ring-opened forms of statins based on partition between n-octanol and water⁵¹. Analyses of intracellular (i.c.) concentrations of statins were performed in duplicates after 24h incubation with respective statin (initial concentration was 12 μ M). Differentially transcribed genes detected in statin-treated cells (12 μ M) compared to untreated control samples. Presented are only the transcripts with FC > 2.0 or < 0.5 and FDR < 0.05 (FC – fold change, FDR – false discovery rate). For full list of differentially regulated transcripts see the ArrayExpress database, accession E-MTAB-3979.

substantially¹³, and this is also true for pitavastatin (Table 1), we were interested in how these differences are reflected in the changes in mRNA expressions. Overall numbers of genes with significant changes in expression (± 2 log fold change), after treatment of MiaPaCa-2 cells with individual statins at 12 μ M concentrations are listed in Table 1 (for a complete list of the differentially expressed genes see Suppl. Table 3A,B, and also Figs 2 and 3). Consistency of the microarray results can be viewed in the ArrayExpress database, accession E-MTAB-3979 in the heatmaps of all differentially expressed genes in all employed samples (Suppl. Figs 1 and 2). The most effective statins were cerivastatin and pitavastatin; whereas pravastatin and rosuvastatin exhibited practically no effect. The effectiveness of statins on the change in gene expression was lowest in the least lipophilic statins; this observation also correlated well with the anti-proliferative effectiveness of statins on pancreatic cancer cells *in vitro* (Table 1, Fig. 4)¹³. The only exception was lovastatin, which did not have any major effect on gene expression despite its potent anti-proliferative activity *in vitro*.

To assess whether the biological effects of statins correlate with their bioavailability in the treated cells, we determined the intracellular concentrations of statins after their exposure to MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells (Table 1). The bioavailability of statins differed substantially, reaching 301.1 nmol/100 000 cells for lovastatin, but only 26.6 nmol/100 000 cells for rosuvastatin (the least efficient anti-proliferative statin) (Table 1, Fig. 4). Interestingly, we were able to find a certain correlation between intracellular levels of statins and their anti-proliferative effects. This correlation was strongest for the least efficient statins (rosuvastatin, pitavastatin and pravastatin); whereas for the most bioavailable statins (in particular lovastatin) this correlation was not so strong (Table 1, Fig. 4). The effects of statins on overall gene expression correlated with their effects on viability and bioavailability only to limited extent. This was especially true for cerivastatin, but not for pitavastatin or lovastatin (Table 1, Fig. 4), suggesting that other factors must play a role in the inter-individual differences in the effects of statins on proliferation of the pancreatic cancer cells used.

Variability in gene expressions in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells exposed to individual statins.

As mentioned above, except for pravastatin and rosuvastatin (the least effective statins *in vitro*), all tested compounds affected the expression of a significant number of genes involved in multiple cell pathways (Table 2, for a complete list of the differentially expressed genes see Suppl. Table 3A,B). As expected, statins significantly modulated the expressions of genes in the mevalonate pathway in treated pancreatic cancer cells (Fig. 2a). The most upregulated gene in this pathway was *HMGCS1* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1) (Fig. 2a), which encodes the enzyme catalyzing condensation of acetyl-CoA, with acetoacetyl-CoA forming HMG-CoA. Another upregulated gene, *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) is responsible for conversion of HMG-CoA into mevalonic acid. MVD (mevalonate decarboxylase), encoded by the third most affected gene of this pathway, catalyzes the conversion of mevalonate pyrophosphate into isopentenyl pyrophosphate. The intensity of effect of statins on the expression of the above-mentioned genes, related to the mevalonate pathway, decreased in the following order: cerivastatin, pitavastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, lovastatin, pravastatin, and rosuvastatin.

Moreover, cerivastatin, pitavastatin and simvastatin (the most effective anti-proliferative statins) also affected the expression of genes involved in the Kennedy pathway (Fig. 2a) of phospholipid and glycerolipid *de novo* synthesis. These are involved in many biological processes including proliferation, inflammation, carcinogenesis, apoptosis, necrosis, growth arrest, and lipid droplets metabolism²⁰. It is interesting to note that pitavastatin compared to most of the other statins affected a number of mevalonate pathway genes despite its low intracellular concentrations (Tables 1 and 2).

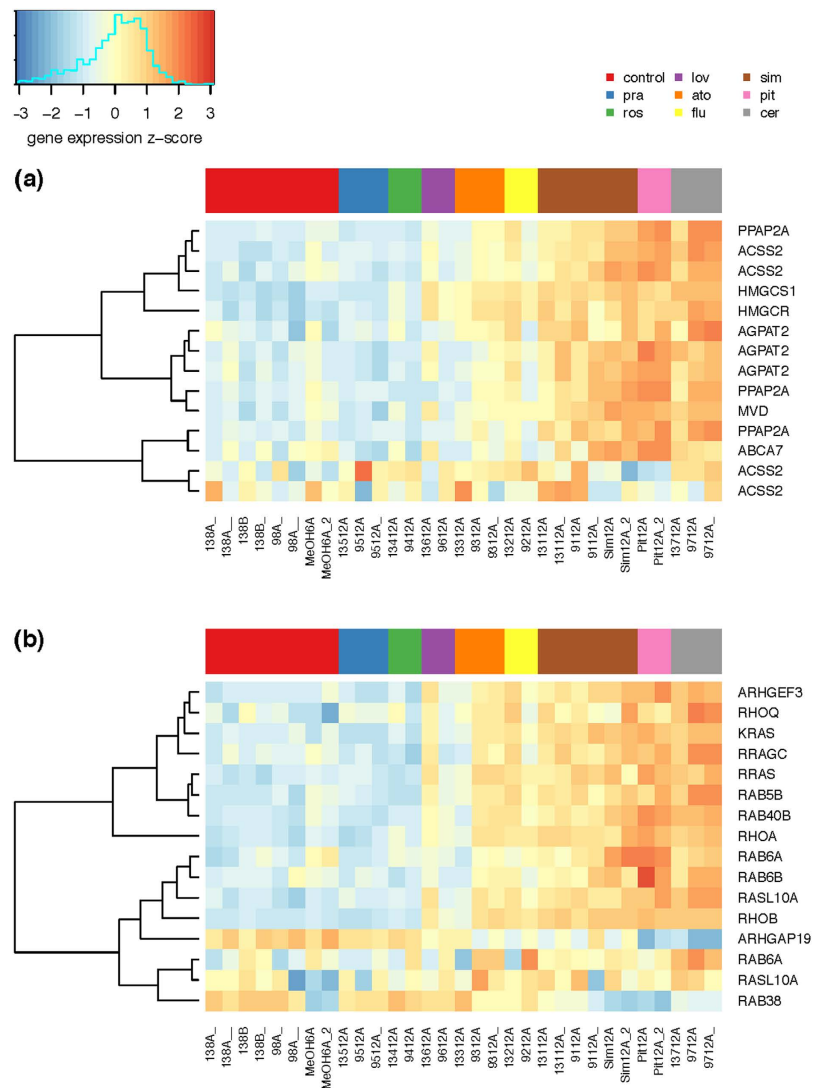


Figure 2. The effect of statins on expression of genes **(a)** related to lipid metabolism, and **(b)** encoding Ras and Ras-related proteins in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. Figure represents heatmaps of z-score of the log expression intensities of differentially expressed genes. Presented are only the genes with statistically significant difference ($FDR < 0.05$) in expression intensity in at least one comparison statin vs. control and at least two-fold change of the expression intensity after the statin exposure.

Isoprenoids produced in the mevalonate pathway are required for posttranslational modifications of many proteins. As we reported previously, statins affect K-Ras protein trafficking in the pancreatic cancer cells¹³. Therefore, we expected a modulating effect of the statins on the expression of genes encoding the Ras and Ras-related proteins. Indeed, we were able to demonstrate that cerivastatin, pitavastatin, simvastatin, and fluvastatin significantly increased the expressions of *Kras* and also *Rras* genes (except for fluvastatin; Fig. 2b), which promote the formation of focal adhesions, cell spreading, and integrin activation²¹. Moreover, upregulation of several genes belonging to this family of growth regulators was also observed (Fig. 2b). *RhoB*, which was the most dramatically upregulated gene by all statins with the exception of rosuvastatin and pitavastatin (Fig. 2b), belongs to the Rho protein family involved in regulating diverse cellular processes including cytoskeletal organization, gene transcription, cell cycle progression, and cytokinesis²². Although the RhoA, upregulated by the three most effective statins, shares 86% amino acid sequence identity with RhoB, RhoB displays several distinct properties such as subcellular localization in endosomes and the pre-lysosomal compartment²³, rapid turnover of mRNA and protein level²⁴, posttranslational modification by either farnesylation or geranylgeranylation²⁵, and early upregulation by stress or growth factors²⁶. Lastly, while most Rho proteins play a significant role in the stimulation of cell proliferation and malignant transformation processes, RhoB appears instead to act as a negative regulator²⁷.

In addition, all statins, except for pravastatin and rosuvastatin, upregulated *CDKN1A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), encoding the p21 protein (Fig. 3a) related to cell cycle regulation, which binds to and inhibits the activity of cyclin-cyclin dependent kinases (CDK)2, -CDK1, and -CDK4/6 complexes; thus functioning as a regulator of cell cycle progression in the G1 and S phase. But surprisingly, only two statins (cerivastatin and

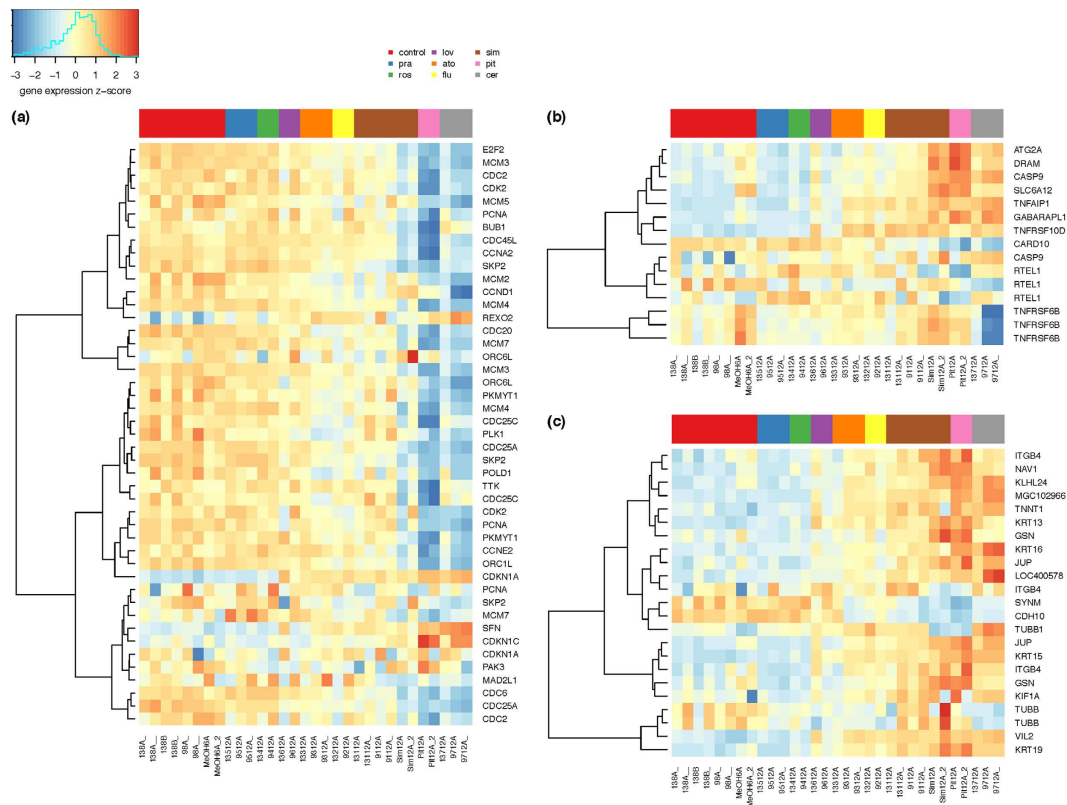


Figure 3. The effect of statins on expression of genes involved in (a) cell cycle and DNA replication, (b) cell death, and (c) cytoskeleton signaling in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. Figure represents heatmaps of z-score of the log expression intensities of differentially expressed genes. Presented are only the genes with statistically significant difference (FDR < 0.05) in expression intensity in at least one comparison statin vs. control and at least two-fold change of the expression intensity after the statin exposure.

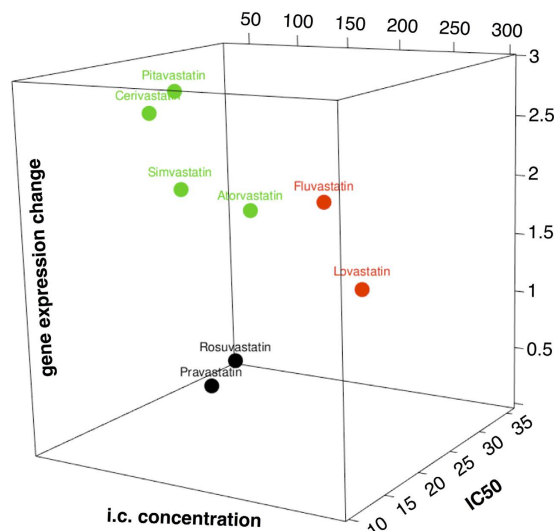


Figure 4. The relationships among the lipophilicity, intracellular concentrations of individual statins, and their impact the gene expression change. Statins were clustered according to their lipophilicity⁵¹ into 3 groups: hydrophilic (black color), lipophilic (red color), and highly lipophilic (green color). IC₅₀ is expressed in μM , intracellular concentration (i.c.) of statins in nmol/100 000 cells, and gene expression change as $\log_{10}(\#\text{DEG} + 1)$.

Path ID	Path name	Cerivastatin	Pitavastatin	Simvastatin	Fluvastatin	Atorvastatin	Lovastatin	Pravastatin	Rosuvastatin
		False discovery rate (FDR)							
hsa00100	Steroid biosynthesis	—	<10 ⁻⁷	—	—	—	<10 ⁻⁹	—	—
hsa03030	DNA replication	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	<10 ⁻³	—	—
hsa04110	Cell cycle	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁶	—	—
hsa03040	Spliceosome	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	—	—
hsa03430	Mismatch repair	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁵	—	—	—	—	—
hsa03440	Homologous recombination	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	—	—	—	—
hsa03020	RNA polymerase	<10 ⁻⁷	—	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁵	<10 ⁻³	10 ⁻³	—	—
hsa04144	Endocytosis	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁶	<10 ⁻³	—	—	—
hsa00240	Pyrimidine metabolism	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁴	<10 ⁻³	—	—	—
hsa04146	Peroxisome	<10 ⁻⁵	<10 ⁻³	—	<10 ⁻³	—	—	—	—
hsa03018	RNA degradation	<10 ⁻³	—	—	—	—	—	—	—
hsa03010	Ribosome	—	—	<10 ⁻⁸	10 ⁻³	—	<10 ⁻³	—	—
hsa04010	MAPK signaling pathway	—	—	<10 ⁻⁴	—	—	<10 ⁻³	—	—
hsa04540	Gap junction	—	—	<10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
hsa00230	Purine metabolism	—	—	<10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
hsa03410	Base excision repair	—	<10 ⁻³	—	—	—	—	—	—

Table 2. Metabolic and signaling pathways affected by statin treatment of MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. KEGG pathways enriched for differentially expressed genes (DEG) as detected by GSEA. GSEA was performed individually for each comparison of statin-treated (12 μM) and control samples. FDR < 0.001 was used as a cut-off value.

pitavastatin), caused significant downregulation of additional genes encoding proteins involved in cell cycle regulation and DNA replication, among others: *CDC2*, *CDC25A*, *SKP2*, *E2F2*, *CDC3*, or origin recognition complex (*ORC1L/6L*) (Fig. 3a); suggesting that cerivastatin and pitavastatin may block cell cycle progression at the S phase, whereas the remaining statins did not exert any significant effect on the expression of these genes.

The other group of genes affected by statin treatment were those involved in apoptosis (Fig. 3b). Similar differential effects on gene expression were also observed for this group of genes, with the *TNFRSF10D* gene being the most differentially expressed; its expression was significantly upregulated independently on the type of statin used (Fig. 3b). The biological relevance of this observation is uncertain, since *TNFRSF10D* does not induce apoptosis. On the other hand, the upregulation of the *GABARAPL* gene (also known as an early estrogen-regulated protein) (Fig. 3b) suggests that cerivastatin, pitavastatin, simvastatin, and fluvastatin might induce cell death by a different mechanism such as autophagy²⁸. Furthermore, both cerivastatin and pitavastatin also increased the expression of the *DRAM* gene (Fig. 3b) implemented in the p53 tumor suppressor and autophagy pathways. Decreased transcriptional expression of this gene is associated with the development of various tumors²⁹.

The expressions of genes encoding several cytoskeletal proteins involved in cell-to-cell adhesion were also changed by statin treatment (again, except for pravastatin and rosuvastatin, Fig. 3c). All effective statins upregulated genes encoding keratins or cytokeratins; other genes differentially expressed upon exposure to individual statins involved those coding for junction plakoglobin (*JUP*, gamma-catenin), cadherin 10 (*CDH10*), synemin (desmuslin), kinesins, or ezrin (Fig. 3c).

Quantitative PCR analysis of selected genes. Although the comparisons of RT-PCR and microarray results were limited by a low number of replicates in the RT-PCR analyses, quantitative PCR analysis of randomly selected genes revealed trends in the gene expressions in agreement with the microarray data obtained (Suppl. Table 4).

Predicted interactions of statins with their known biological targets. Finally, we performed an *in silico* analysis of the predicted interactions of all eight commercially available statins with their known biological targets, using the STICH database (Fig. 5). The results were clustered according to the Markov clustering algorithm into four groups. Interestingly, no interaction has previously been reported for pitavastatin for the set confidence score of 0.850. The detected results were compared with the data gained from the microarray analysis. Thus, based on the results from the microarray analysis (selected genes with changed expression in Figs 2 and 3) we extended the information available on a number of genes, expressions of which were affected by pitavastatin treatment (see Figs 2 and 3). The only reported/predicted (inhibition) interaction for pitavastatin so far, has been HMGCR.

Discussion

Although not all of the published data are conclusive^{7–10}, statins have been demonstrated in several studies to significantly decrease risk of pancreatic cancer^{5,6,30}. In fact, both reduction of overall cancer as well as pancreatic cancer-related mortality rates were reported in a recent large Danish study³¹.

One of the possible reasons, which may account for the reported discrepancies in the outcomes of statin-treated cancer patients might lie in the inter-individual differences among these compounds¹³. Indeed, a recent report showed significant differences among individual statins and their effects on the risk of lung, breast, and hematological cancers³². Similarly, use of simvastatin was demonstrated to be more potent, compared to the

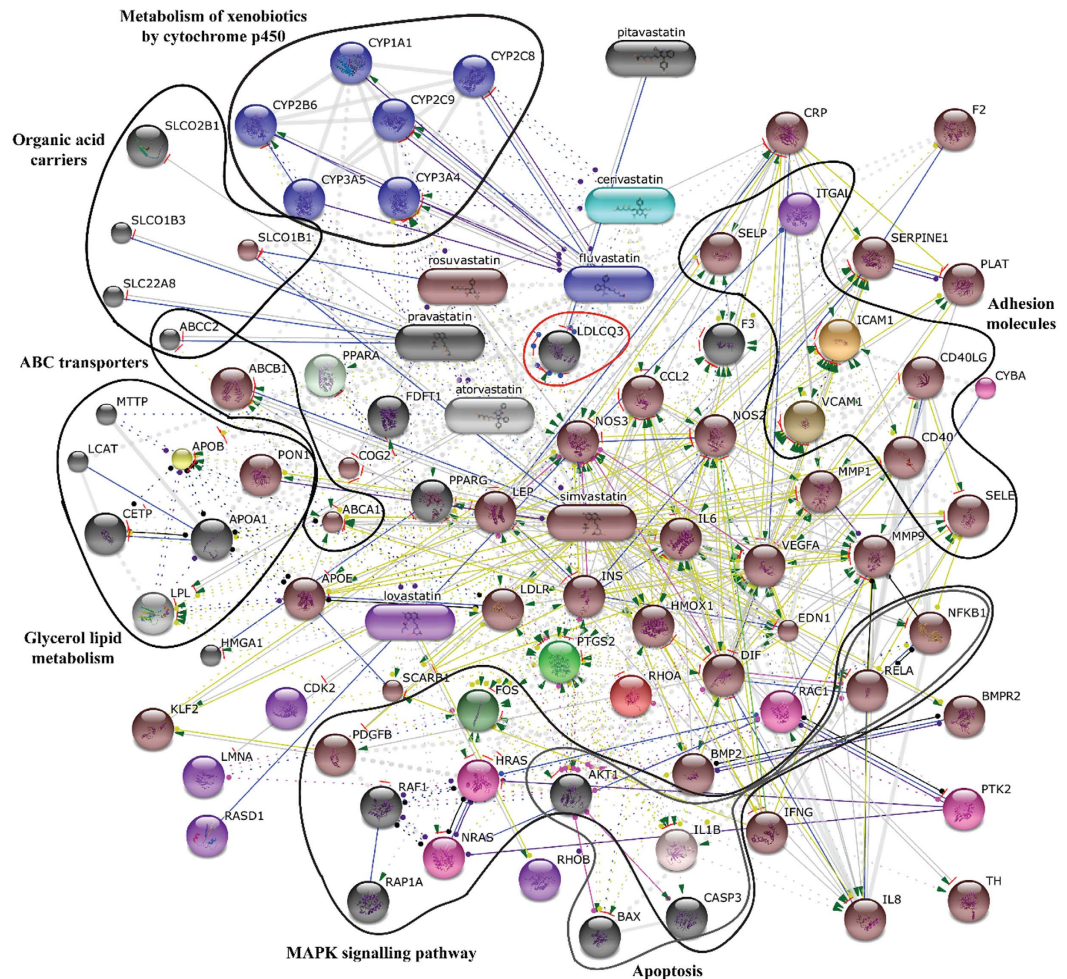


Figure 5. Predicted functional association networks for all statins. Individual nodes represent drugs and genes products. Input nodes: atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin. The action view of the statin association network was generated according to known and predicted interactions for *Homo sapiens*. Individual node colors indicate the type of the interaction: binding – blue ball, activation – green arrow, inhibition – red bar, catalysis – magenta ball, same activity – cyan, reaction – black ball. The line thickness indicates the confidence score. The complete description of the listed genes is stated in Suppl. Table 5.

other statins in terms of the survival of pancreatic cancer patients³³; simvastatin but not lovastatin improved the survival rate in patients undergoing resection for early-stage pancreatic cancer³⁴. On the other hand, lovastatin was the only efficient statin in patients with colorectal cancer³⁵. In general, lipophilic statins were superior in their protective functions over hydrophilic compounds in patients with pancreatic³⁰ and breast³⁶ cancers. All of these data indicate that statins, despite their common inhibitory effect on HMG-CoA (their major intracellular target) exert substantial differences in their biological outcomes.

The data from our comprehensive analyses confirmed large inter-individual variability among all of the clinically-used statins, in terms of their effects on the metabolism and signaling of pancreatic cancer cells. Indeed, we found large differences in gene transcription profiles of pancreatic cancer cells exposed to statins with cerivastatin, pitavastatin, and simvastatin, which were the most efficient modulators of gene expressions. Although to some extent these results correlated with the intracellular concentrations of the statins, to our surprise, this correlation was not as strong as expected. Apart from cerivastatin (the most efficient anti-proliferative statin, and also having the deepest impact on the expression of a wide array of intracellular targets in pancreatic cancer cells) the second most influential statin was pitavastatin, despite its relatively low bioavailability and only moderate anti-proliferative efficiency. Interestingly, pravastatin and rosuvastatin, capable of reaching the intracellular compartment in only very low concentrations, were practically without any significant effect on gene expressions.

It should be noted that the observed results are very likely to be cell type-specific, since completely different results in terms of anti-proliferative activities as well as intracellular concentrations of statins, were reached for both human hepatoblastoma (HepG2) cells and human embryonic kidney cells (our own unpublished data). This is also supported by recent data by Menter *et al.* who demonstrated the differential effects of pravastatin and simvastatin on a number of malignant cell lines³⁷.

Apart from the expected impacts of statin treatment on the genes involved in cholesterol metabolism, our results also indicate that some statins (namely cerivastatin and pitavastatin, and to lesser extent also other statins, except for rosuvastatin and pravastatin) directly affect the expression of specific genes related to the Rho GTPase signaling, and cytoskeletal regulation in the pancreatic cancer cell line used. These data are in line with the effect of simvastatin on a similar group of genes observed in endothelial cells³⁸. In another DNA microarray study, Johnson-Anuna *et al.* tried to identify gene expression patterns in the cerebral cortex of mice treated with oral doses of simvastatin (50 mg·kg⁻¹ b. wt.) once a day for 21 days. They found that simvastatin significantly reduced the expression of the proto-oncogenic gene *c-fos* with simultaneously enhanced expression of both the *c-myc* oncogene and antiapoptotic *Bcl-2* gene³⁹. We were not able to confirm this data in our study, presumably due to the different experimental model and also the much lower statin dosage. In our experiments, only cerivastatin increased the expression of a gene encoding for caspase 9 (Fig. 3b), an initiator caspase, which has been linked to the mitochondrial death pathway. Nevertheless, as demonstrated by the analysis of the most altered functional pathways (Table 2, Suppl. Table 3A,B), statins affected some processes related to DNA repair, such as base excision repair (pitavastatin) or mismatch repair (cerivastatin, pitavastatin, simvastatin). It is known that failure of these processes could be followed by programmed necrosis⁴⁰. Concurrently, cerivastatin, simvastatin, pitavastatin, and additionally fluvastatin caused upregulation of *GABARAP1* gene, related to autophagy (Fig. 3b). Out of many end products of this pathway, ubiquinone is required in the process of ATP formation during oxidative phosphorylation. Interestingly, it was reported that ubiquitinated hydrophobic proteins, which are prone to aggregation, are kept on the surface of lipid droplets (formation of lipid droplets is affected by statins²⁰) and subjected to autophagy as well as proteasomal degradation⁴¹.

The cell cycle arrest induced by statins represents another frequently discussed, potential anti-cancer pathway. Many reports describe the effect of individual statins on the expression of the cell cycle-related genes. For example, changes in the expression of a number of genes related to the cell cycle in chronic myelogenous leukemia K562 cells upon exposure to simvastatin were described⁴². The results of flow cytometry showed that the cell cycle was arrested in the G1 phase⁴². In another study, Assmus B *et al.*⁴³ performed a microarray analysis using a primary cell line of endothelial progenitor cells treated with low concentrations of atorvastatin. Among other studies, the expression of genes coding for cyclins and PCNA was increased after atorvastatin incubation; whereas that of the cell cycle inhibitory protein p27 was reduced⁴³. Similarly, the downregulation of cyclin D1, PCNA, *c-myc*, as well as the upregulation of *p21* and *p19* were reported in human breast cancer cells treated with cerivastatin⁴⁴. In contrast to this study, the expression of genes encoding cyclins or PCNA was not affected by atorvastatin treatment in our microarray analysis, underlining the cell specificity dependent biological variability of individual statins. In fact, only the two most effective statins (cerivastatin and pitavastatin) affected the expression of cyclins and PCNA; with both statins inducing downregulation of the mentioned genes (Fig. 3a). Consistent with the reported data⁴⁴, the expression of the *p21* gene was increased by all effective statins (Fig. 3a). On the other hand, the genes associated with DNA replication, such as subunits of the ORC, and components of the minichromosome maintenance complex were downregulated by cerivastatin and pitavastatin (Fig. 3a); thus suggesting that cerivastatin and pitavastatin primarily blocked the progress of the cell cycle through the S phase. Likewise, in our study, other proteins related to both the S phase (*SKP2*, *E2F2*) and M phase (*CDCs*) were downregulated by cerivastatin and pitavastatin, indicating that except for the G1 phase, the statins mentioned blocked the cell cycle entry into the M phase. This is not surprising, as lovastatin is used in the cell-cycle synchronization protocols⁴⁵ and as a pharmacological tool for controlling the growth of neoplastic cells⁴⁶. Furthermore, lovastatin is commercially available as an inhibitor of the cell cycle in the G1 and G2/M phase (Sigma-Aldrich). Last but not least, cerivastatin, pitavastatin, simvastatin and fluvastatin also increased the expression of the *Kras* gene implicated in multiple signaling pathways; thus accounting for the pleiotropic effects of the statins. It is likely that upregulation of the *Kras* gene after statin treatment reflects the unavailability of properly posttranslationally modified K-Ras protein for cell signaling due to inhibition of the mevalonate pathway. Similarly, this mechanism could also explain the upregulation of other Ras and Ras-related proteins induced by statin treatment. However, the products of the mevalonate pathway are required not only for posttranslational modifications of various proteins; but also for the functional regulation of posttranslational modifications of intermediate filaments, including nuclear lamins as well as cytoplasmic keratins, vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein, or neurofilaments. In general, the pancreatic cancer cells used in this study were firmly attached to the cultivating surface, and their detachment was very inefficient. However, the treatment of the cells with effective statins changed their shape and facilitated their detachment (data not shown). This is consistent with the effect of statins on the expression of genes encoding the cytoskeletal proteins (Fig. 3c).

It should also be emphasized that statins certainly have broad and variable modulatory effects on gene expressions, which differ substantially among various animal models, as well as among various organs even within the same animals⁴⁷; additionally the same phenomenon of gene expression variability dependent on cell-type specificity, was also confirmed in *in vitro* studies^{48,49}.

Our study has several limitations. First, it is generally known that transcriptomics data do not always translate into phenotype, most likely due to posttranscriptional modification of encoded proteins or their increased degradation rates⁵⁰. Furthermore, only one human pancreatic cancer cell line was used in our studies, and it is likely that the mRNA transcriptomics profiles would substantially differ even within different pancreatic cancer cells.

In conclusion, we found large differences in gene transcription profiles of pancreatic cancer cells exposed to various statins, with cerivastatin, pitavastatin, and simvastatin being the most efficient modulators of gene expressions. To some extent these results correlated with intracellular concentrations of statins; although this was not the case for pitavastatin, which potently changed the expression of a wide array of genes despite its relatively low bioavailability, and only moderate anti-proliferative efficiency. Our data may account for the inter-individual variability in the anti-cancer effects of individual statins; although further, particularly proteomic studies, would be required to fully uncover this phenomenon.

References

- Vitek, L. & Lenicek, M. Cytoprotective and antiproliferative effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr Enz Inhib*. **2**, 261–280 (2006).
- Maltese, W. A., Defendini, R., Green, R. A., Sheridan, K. M. & Donley, D. K. Suppression of murine neuroblastoma growth *in vivo* by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Clin Invest*. **76**, 1748–1754 (1985).
- Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A. & Bifulco, M. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacol Res*. **88**, 84–98 (2014).
- Garcia-Ruiz, C., Morales, A. & Fernandez-Checa, J. C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. **12**, 303–315 (2012).
- Walker, E. J., Ko, A. H., Holly, E. A. & Bracci, P. M. Statin use and risk of pancreatic cancer: results from a large, clinic-based case-control study. *Cancer*. **121**, 1287–1294 (2015).
- Khurana, V., Sheth, A., Caldito, G. & Barkin, J. S. Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas*. **34**, 260–265 (2007).
- Cui, X. *et al.* Statin use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. **23**, 1099–1111 (2012).
- Bradley, M. C., Hughes, C. M., Cantwell, M. M. & Murray, L. J. Statins and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Causes Control*. **21**, 2093–2100 (2010).
- Chiu, H. F., Chang, C. C., Ho, S. C., Wu, T. N. & Yang, C. Y. Statin use and the risk of pancreatic cancer: a population-based case-control study. *Pancreas*. **40**, 669–672 (2011).
- Bonovas, S., Filioussi, K. & Sitaras, N. M. Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol*. **103**, 1–6 (2008).
- Vitek, L. Statins and pancreatic cancer: are all statins the same? *Am J Gastroenterol*. **104**, 525 (2009).
- Bonovas, S. & Sitaras, N. M. Statins and cancer risk: a confounded association. *Gastroenterology*. **137**, 740–741 (2009).
- Gbelcova, H. *et al.* Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. **122**, 1214–1221 (2008).
- Valach, J. *et al.* Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. **131**, 2499–2508 (2012).
- Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27–30 (2000).
- Tian, L. *et al.* Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13544–13549 (2005).
- Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/> (2015).
- Kuhn, M. *et al.* STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res*. **42**, D401–407 (2014).
- Enright, A. J., Van Dongen, S. & Ouzounis, C. A. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res*. **30**, 1575–1584 (2002).
- Gbelcova, H. *et al.* The effect of simvastatin on lipid droplets accumulation in human embryonic kidney cells and pancreatic cancer cells. *Lipids Health Dis*. **12**, 126 (2013).
- Furuhjelm, J. & Peranen, J. The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. *J Cell Sci*. **116**, 3729–3738 (2003).
- Sahai, E. & Marshall, C. J. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. **2**, 133–142 (2002).
- Michaelson, D. *et al.* Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*. **152**, 111–126 (2001).
- Lebowitz, P. F., Davide, J. P. & Prendergast, G. C. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol*. **15**, 6613–6622 (1995).
- Baron, R. *et al.* RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced *in vivo* by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11626–11631 (2000).
- Canguilhem, B. *et al.* RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*. **280**, 43257–43263 (2005).
- Bousquet, E. *et al.* Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res*. **69**, 6092–6099 (2009).
- Nowak, J. *et al.* The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. **20**, 870–881 (2009).
- Crighton, D. *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. **126**, 121–134 (2006).
- Chen, M. J. *et al.* Statins and the risk of pancreatic cancer in Type 2 diabetic patients-A population-based cohort study. *Int J Cancer*. **138**, 594–603 (2016).
- Nielsen, S. F., Nordestgaard, B. G. & Bojesen, S. E. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med*. **367**, 1792–1802 (2012).
- Fujimoto, M., Higuchi, T., Hosomi, K. & Takada, M. Association between statin use and cancer: data mining of a spontaneous reporting database and a claims database. *Int J Med Sci* **12**, 223–233 (2015).
- Jeon, C. Y. *et al.* The Association of Statin Use after Cancer Diagnosis with Survival in Pancreatic Cancer Patients: A SEER-Medicare Analysis. *PLoS One* **10**, e0121783 (2015).
- Wu, B. U. *et al.* Impact of Statin Use on Survival in Patients Undergoing Resection for Early-Stage Pancreatic Cancer. *Am J Gastroenterol*. **110**, 1233–1239 (2015).
- Simon, M. S. *et al.* Prospective analysis of association between use of statins or other lipid-lowering agents and colorectal cancer risk. *Ann Epidemiol*. **22**, 17–27 (2012).
- Desai, P. *et al.* Statins and breast cancer stage and mortality in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes Control*. **26**, 529–539 (2015).
- Menter, D. G. *et al.* Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites. *PLoS One*. **6**, e28813 (2011).
- Jacobson, J. R. *et al.* Cytoskeletal activation and altered gene expression in endothelial barrier regulation by simvastatin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **30**, 662–670 (2004).
- Johnson-Anuna, L. N. *et al.* Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. **312**, 786–793 (2005).
- Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q. & Thompson, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*. **18**, 1272–1282 (2004).
- Fujimoto, T. & Ohsaki, Y. Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets. *Autophagy*. **2**, 299–301 (2006).
- Yang, Y. C. *et al.* *In vitro* and *in vivo* study of cell growth inhibition of simvastatin on chronic myelogenous leukemia cells. *Chemotherapy*. **54**, 438–446 (2008).
- Assmus, B. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res*. **92**, 1049–1055 (2003).
- Denoyelle, C. *et al.* Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells. *Cell Signal*. **15**, 327–338 (2003).

45. Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V. & Pardee, A. B. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res.* **51**, 3602–3609 (1991).
46. Feleszko, W. & Jakobsiak, M. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* **6**, 1198–1199 (2000).
47. Kato, N., Liang, Y. Q., Ochiai, Y. & Jesmin, S. Systemic evaluation of gene expression changes in major target organs induced by atorvastatin. *Eur J Pharmacol.* **584**, 376–389 (2008).
48. Morikawa, S. *et al.* Global analysis of RNA expression profile in human vascular cells treated with statins. *J Atheroscler Thromb.* **11**, 62–72 (2004).
49. Morikawa, S. *et al.* Analysis of the global RNA expression profiles of skeletal muscle cells treated with statins. *J Atheroscler Thromb.* **12**, 121–131 (2005).
50. Pascal, L. E. *et al.* Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics.* **9**, 246 (2008).
51. Sierra, S. *et al.* Statins as neuroprotectants: a comparative *in vitro* study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzh Dis.* **23**, 307–318 (2011).

Acknowledgements

This work was supported by grants IGA MZ 13112-4, and RVO-VFN64165/2016 from the Czech Ministry of Health; PRVOUK-P25/LF1/2 from Charles University in Prague and National Programs of Sustainability Nos LO1304, LO1601, and project OPPC CZ.2.16/3.1.00/24503.

Author Contributions

H.G., T.R. and S.R. performed the cell culture studies, M.F., V.K., and J.H. were involved in statin determination studies in the studied cells, H.S. and M.K. performed all gene expression studies, L.V. was involved in the study design, coordination of the studies, and data interpretation. All authors contributed to the data interpretation and writing the Ms.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Gbelcová, H. *et al.* Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **7**, 44219; doi: 10.1038/srep44219 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

RESEARCH

Open Access



Isoprenoids responsible for protein prenylation modulate the biological effects of statins on pancreatic cancer cells

Helena Gbelcová^{1,2}, Silvie Rimpelová², Zdeněk Knejzlík², Jana Šáchová³, Michal Kolář³, Hynek Strnad³, Vanda Repiská¹, Walter Cosimo D'Acunto², Tomáš Ruml^{2*} and Libor Vítek^{4*†} 

Abstract

Background: Statin treatment of hypercholesterolemia is accompanied also with depletion of the mevalonate intermediates, including farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) necessary for proper function of small GTPases. These include Ras proteins, prevalently mutated in pancreatic cancer. In our study, we evaluated the effect of three key intermediates of the mevalonate pathway on GFP-K-Ras protein localization and the gene expression profile in pancreatic cancer cells after exposure to individual statins.

Methods: These effects were tested on MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells carrying a K-Ras activating mutation (G12C) after exposure to individual statins (20 μM). The effect of statins (atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin, rosuvastatin, and pitavastatin) and mevalonate intermediates on GFP-K-Ras protein translocation was analyzed using fluorescence microscopy. The changes in gene expression induced in MiaPaCa-2 cells treated with simvastatin, FPP, GGPP, and their combinations with simvastatin were examined by whole genome DNA microarray analysis.

Results: All tested statins efficiently inhibited K-Ras protein trafficking from cytoplasm to the cell membrane of the MiaPaCa-2 cells. The inhibitory effect of statins on GFP-K-Ras protein trafficking was partially prevented by addition of any of the mevalonate pathway's intermediates tested. Expressions of genes involved in metabolic and signaling pathways modulated by simvastatin treatment was normalized by the concurrent addition of FPP or GGPP. K-Ras protein trafficking within the pancreatic cancer cells is effectively inhibited by the majority of statins; the inhibition is eliminated by isoprenoid intermediates of the mevalonate pathway.

Conclusions: Our data indicate that the anticancer effects of statins observed in numerous studies to a large extent are mediated through isoprenoid intermediates of the mevalonate pathway, as they influence expression of genes involved in multiple intracellular pathways.

Keywords: Farnesyl pyrophosphate, Gene expression, Geranylgeranyl pyrophosphate, HMG-CoA reductase inhibitors, Isoprenoids, *K-Ras* oncogene, Mevalonate, Pancreatic cancer, Prenylation, Statins

* Correspondence: tomas.ruml@vscht.cz; vitek@cesnet.cz

†Equal contributors

²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic

⁴Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article

Background

World-wide, statins are prescribed as hypocholesterolemic drugs preventing cardiovascular morbidity as well as mortality [1]. They lower cholesterol by inhibiting HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway for de novo synthesis of cholesterol. However, the statins' inhibitory action on HMG-CoA reductase also results in depletion of the downstream intermediate products of this pathway, such as farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), which modify and target small GTPases, such as Ras proteins, to their site of action [2]. Farnesylation is also required for Ras protein anchoring in the plasma membrane, a compartment crucial for its proper signaling function [3]. Accordingly, the inhibition of prenylation (farnesylation and geranylgeranylation), became a plausible approach to modify tumor cell proliferation [4], but also seems to have therapeutic potential for cardiovascular and pulmonary medicine [5]. Importantly, in healthy cells, cholesterol and exogenous isoprenoids suppress HMG-CoA reductase via post-translational downregulation [6]. On the contrary, tumor cells are resistant to cholesterol-mediated suppression, although they remain sensitive to dietary, tumor-specific isoprenoid-mediated suppression of mevalonate synthesis [7]. The K-Ras signaling pathway is of special importance in pancreatic cancer, since >90% of these tumors bear activating mutations in *K-Ras* oncogene [8]. This oncogenic signaling pathway in pancreatic cancer is complex and passes through three major effector branches: Raf/Mek/Erk, PI3K/Pdk1/Akt and the Ral guanine nucleotide exchange factor pathway [9]. Because of this widespread effects, the K-Ras signaling pathway is a promising target in pancreatic cancer and various novel therapeutic approaches to suppress K-Ras signaling are currently under investigation. However, despite these comprehensive efforts, effective anti-Ras drugs have yet to reach the clinic [10].

Recently, we demonstrated substantial differences in the antitumor effects of individual statins used in clinical practice in an experimental model of human pancreatic cancer [11]. The effect of statins on the viability of pancreatic cells was, at least partially, caused by impairment of K-Ras protein trafficking, since all statins except for pravastatin efficiently inhibited GFP-K-Ras protein translocation from cytoplasm to the cell membrane [11].

Hence, the primary aim of the present study was to compare the effect of the mevalonate pathway intermediates on GFP-K-Ras protein dislocation in the pancreatic cancer cells treated with individual statins, and assess the role of these intermediates in the tumor-suppressive action of statins. The observations that addition of FPP or GGPP rescued the viability of cancer cells treated with statins [11] suggested that the effects of these compounds on gene expression changes were induced by statins. Thus, we also

aimed to screen for differential gene expression of pancreatic cancer cells exposed to simvastatin, and to assess the gene expression profile after simultaneous exposure of these cells to FPP and GGPP in the whole genome expression array.

Methods

Materials

In each of the experiments, pure forms of the following statins were used: atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin, rosuvastatin, and pitavastatin (all obtained from Alexis; San Diego, CA, USA); mevalonate, FPP, and GGPP were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell cultures

The human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2 (ATCC, Manassas, VA, USA) carrying the activation mutation in the *K-Ras* oncogene (G12C) was maintained in the exponential phase of growth in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C, in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The final concentration of methanol, which was used for dissolving the experimental compounds, was below 1%. The cell line was authenticated at ATCC by STR profiling before distribution, and also re-authenticated by the end of the study by an external laboratory (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic).

Transfection and imaging of GFP-K-Ras intracellular localization

MiaPaCa-2 cells were seeded in 6-well cell culture plates with sterile glass coverslips 5 h before transfection. Transfection with pEGFP-K-Ras plasmids, prepared as previously described [11], was carried out using FuGene[®] 6 (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. After 24 h of incubation, the medium was changed, and the tested compounds were added: statins to a final concentration of 20 μM, mevalonate to a final concentration of 600 μM, and FPP or GGPP to final concentrations of 17 μM. All experiments were performed in triplicates and repeated 4 times for all measurements.

The tested concentrations were chosen based on our previously published data [11], in which all the statins tested at the 20 μM concentration efficiently inhibited GFP-K-Ras protein accumulation in the plasma membrane, while FPP and GGPP at 17 μM substantially abrogated the tumor cell growth inhibitory effect of all statins tested in vitro. Simultaneously, mevalonate at the concentration of 600 μM completely eliminated the cytotoxic effect of all of the statins tested in vitro, whereas the equimolar concentration of mevalonate (17 μM) only had a partial effect [11].

After an additional 24 h, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min. Intracellular localization of GFP-K-Ras protein was visualized by fluorescence microscopy, using an Olympus IX-81 microscope and processing with Olympus xcellence RT software (Olympus, Tokyo, Japan).

DNA microarray analysis

The effects of 12 μM concentrations of simvastatin (corresponding to its IC_{50} value after 24 h [11]), and 17 μM FPP or GGPP on MiaPaCa-2 pancreatic cancer cell gene expression were investigated 24 h post-inoculation; the cells treated with vehicle (methanol <1%) served as control. Simvastatin was selected based on our previous study as the statin most efficiently inhibiting pancreatic cancer out of the clinically used statins [11].

The cells from two parallel cultures (10 cm^2 culture dishes) were lysed in the stage of subconfluency using the RLT lysis buffer supplied in a RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Total RNA was isolated by RNeasy Micro Kit (QIAGEN, USA) according to the procedure for animal cells. The quantity of RNA was measured by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies LLC, USA). The quality of the RNA was analyzed by an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, USA). Those RNA samples that had a RIN (RNA integrity number) above 9 were used for further analysis.

An Illumina HumanWG-6_V3 chip (Illumina, USA) was used for the microarray analysis following the standard protocol. Total RNA (150 ng) was amplified using an Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, USA), and 1.5 μg of the amplified RNA was hybridized on the chips according to the manufacturer's protocol. The analysis was performed in two biological replicates for the FPP, GGPP, and combination treatments, in four biological replicates for the simvastatin treatment, and in eight biological replicates for the control group.

The raw data was preprocessed using GenomeStudio software (version 1.9.0.24624; Illumina, CA, USA), with the beadarray [12] and the limma package [13] of the Bioconductor [14] within the R environment [15]: the transcription profiles were background corrected using a normal-exponential model, quantile normalized, and variance stabilized using base 2 logarithmic transformation. A moderated *t*-test was used to detect differentially expressed transcripts (within limma). Storey's *q*-value ($q < 0.05$; [16]) and a minimally twofold change in expression intensity were required for significantly differentially transcribed genes. Batch effects were accounted for in the statistical model in limma, and eliminated for visualization purposes. The MIAME compliant data has been deposited to the ArrayExpress database (accession number E-MTAB-3263).

Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using the method of Tian et al. [17], and Fisher's exact test on KEGG pathways [18]. We required statistical significance in both tests, with a false discovery rate of $\text{FDR} < 0.001$ in the more sensitive test of Tian, and $\text{FDR} < 0.05$ in Fisher's exact test.

Quantitative real-time PCR

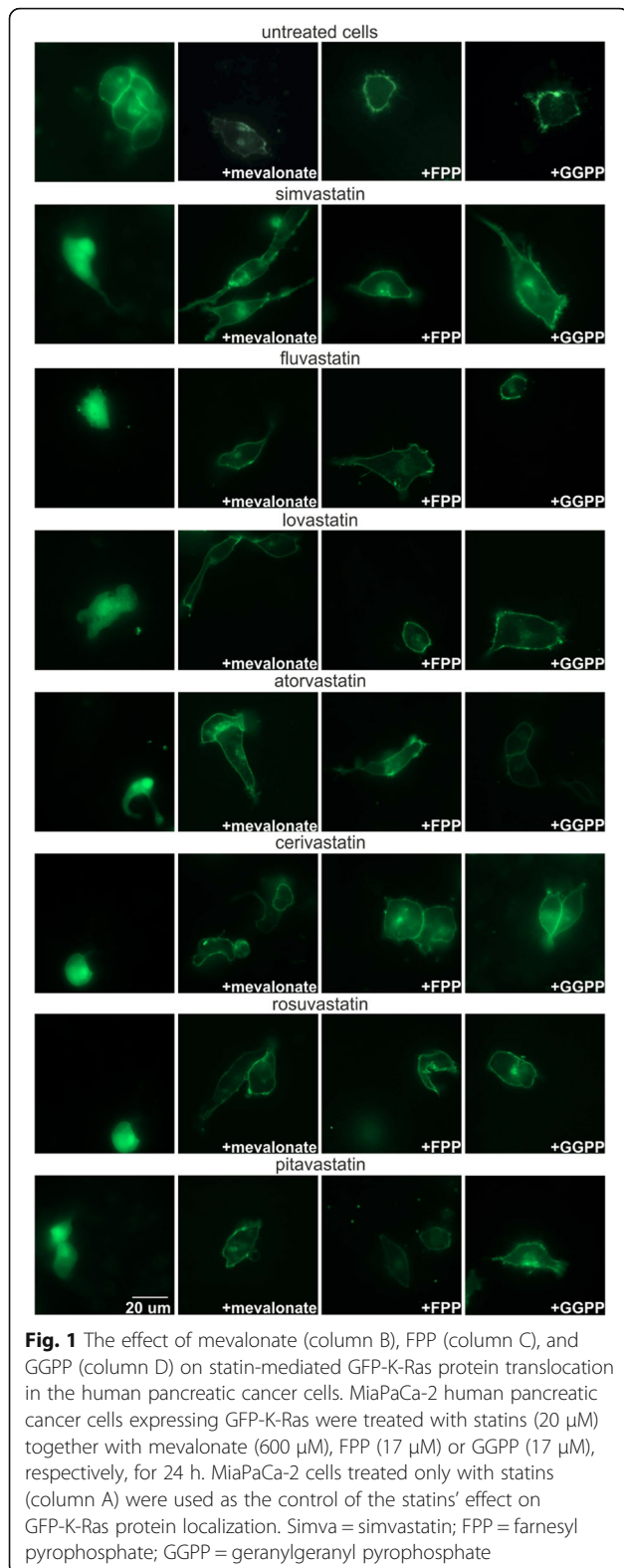
The genes for quantitative real-time PCR analysis were selected to validate DEG and their possible effect on KEGG pathways affected by simvastatin, FPP, and GGPP treatment. This analysis also served to validate changes detected by the microarray technology in general. The RNA derived from the same pool as for microarray experiments was used for quantitative real-time PCR analyses. Reverse transcription was performed with a QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., USA). The RT-PCR was performed with a LightCycler 2.0 System using a LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany), with the results analyzed by the LightCycler software. The resulting crossing point values were normalized using reference genes RPS9, TBP, and GAPDH. Relative fold changes of expression intensity in statin-treated against control samples were computed under assumption of perfect effectivity of PCR amplification. Statistical significance was estimated using Student's *t*-test. All computations were performed within the R environment [15]. The list of amplicons/primers of target and housekeeping genes are provided in Additional file 1: Table S1.

Results

The effect of mevalonate, FPP, and GGPP on statin-mediated GFP-K-Ras protein translocation in the MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells

In our current study, we have confirmed the inhibitory effect of all clinically used statins on K-Ras protein accumulation in the cell plasma membrane (Fig. 1, column A). Pravastatin was not tested, since it failed to inhibit the GFP-K-Ras protein trafficking from the cytoplasm to the plasma membrane in our previous study [11]. This statin-mediated action was completely eliminated by an excess of mevalonate (Fig. 1, column B), indicating that this biologically important effect of statins is due to the inhibition of the mevalonate pathway.

This observation was also corroborated by the same eliminating effects mediated by both FPP and GGPP even at much smaller concentrations (17 μM), although the trafficking of the GFP-K-Ras protein to the plasma membrane was not rescued in all of the treated cells (Fig. 1, columns C and D). We did not observe any apparent differences in these effects between both isoprenoid compounds, confirming the aforementioned statement



that all of the tested statins affected the GFP-K-Ras protein translocation due to isoprenoids depletion caused by HMG-CoA reductase inhibition.

The effect of FPP and GGPP on simvastatin-mediated changes in the gene expression of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells

Overall numbers of genes with significant changes in expression after simvastatin, FPP, or GGPP treatment of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells are listed in Additional file 2: Table S2. There were about 200 genes affected by the simvastatin treatment. The changes in gene expression caused by simvastatin were eliminated by simultaneous addition of FPP with simvastatin, and the gene expression profile of the cells treated concurrently with simvastatin and FPP resembled control untreated cells (Fig. 2). In particular, we observed normalization of expression of KRAS, which is directly related to pancreatic cancer progression, and mevalonate pathway related genes (HMGCS1, MVD, MVK, and PDSS1). FPP per se influenced gene expression of the cells and the genes, whose expression was the most significantly affected by FPP treatment, were largely identical to those affected by the simvastatin treatment. We observed changes in the genes involved in DNA replication (*POLA2*, *POLD4*, *PRIMI*), RAS signaling related genes (*RRAS*, *RHOB*, *RAB17*), and genes of the mevalonate pathway (*MVD*, *HMGCS1*, *HMGCR*). However, the number of the genes affected by FPP was smaller and their change of expression weaker. GGPP alone did not affect gene expression of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells; nevertheless, it eliminated almost all the changes in gene expression caused by simvastatin when the cells were treated simultaneously with GGPP and simvastatin (Table 1).

There were eight carcinogenesis-related KEGG pathways significantly affected by simvastatin treatment (Table 2, see Additional file 3: Table S3 for all affected pathways). Deregulation of these pathways was eliminated by simultaneous treatment of the cells with simvastatin and FPP or GGPP. Only two pathways remained deregulated, namely the DNA replication and cell cycle. Simultaneous treatment of the MiaPaCa-2 cells with simvastatin and GGPP eliminated the effect of simvastatin on DNA replication and cell cycle regulation more prominently than simvastatin in combination with FPP, accounting for better efficacy of GGPP on cancer cell viability [8]. The expression of a large number of genes implicated in DNA replication, cell cycle regulation, and mismatch repair were affected by FPP alone (Table 2). While only marginally significant after treatment by simvastatin, the genes involved in oxidative phosphorylation were significantly upregulated by treatment with FPP, simvastatin and FPP, and simvastatin and GGPP (Table 2, Fig. 3).

Quantitative PCR analysis of selected genes revealed in most of the gene tested satisfactory agreement with the microarray data obtained, thus supporting their validity (Additional file 1: Table S4).

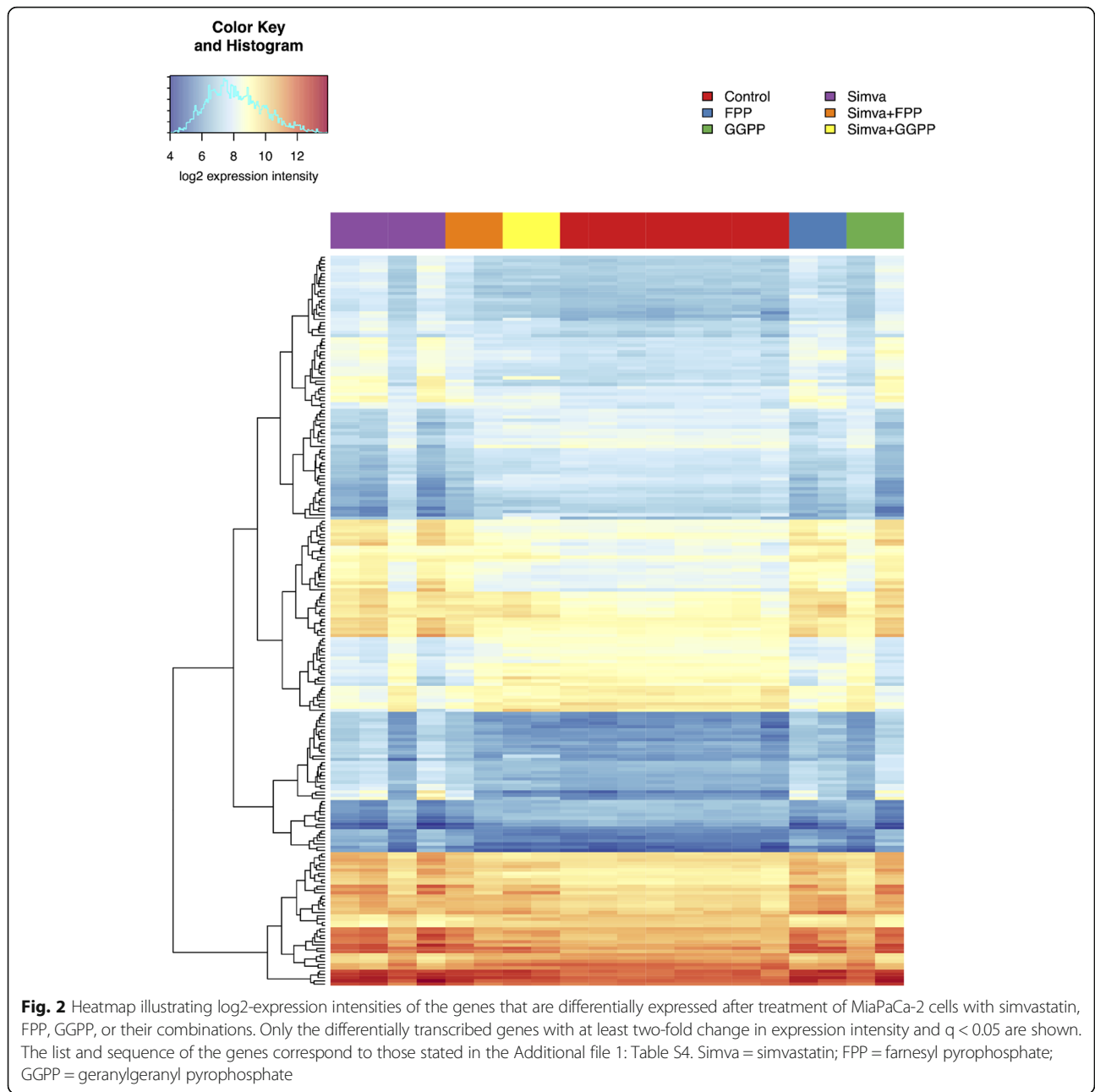


Table 1 Genes with significantly changed expression after simvastatin, FPP, and GGPP treatment of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells

	Simva (S)	FPP (F)	Overlap (S) and (F)	Simva + FPP	GGPP	Simva + GGPP (SG)	Overlap (S) and (SG)
Upregulated genes (No.)	127	56	34	0	0	5	3
Downregulated genes (No.)	72	14	12	0	0	0	0
Differentially expressed genes (No.)	199	70	46	0	0	5	3

Number of genes differentially transcribed between samples treated with simvastatin (12 μM), FPP (17 μM) or GGPP (17 μM) compared to control samples of untreated cells, as well as for each combination of simvastatin and an inhibitor. Only the transcripts with a minimally two-fold change in expression intensity and $q < 0.05$ were counted. See Fig. 2 and Additional file 1: Table S4 for more details
 Simva simvastatin, FPP farnesyl pyrophosphate, GGPP geranylgeranyl pyrophosphate

Table 2 Signaling and metabolic pathways enriched by genes that change expression intensity after simvastatin, FPP, and GGPP treatment of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells

KEGG Path ID	Path name	Simva	FPP	Simva + FPP	GGPP	Simva + GGPP
hsa03030	DNA replication	+	+	+	-	+
hsa04110	Cell cycle	+	+	+	-	+
hsa03430	Mismatch repair	+	+	-	-	-
hsa00100	Steroid biosynthesis	+	-	-	-	-
hsa03440	Homologous recombination	+	-	-	-	-
hsa04010	MAPK signaling pathway	+	-	-	-	-
hsa00240	Pyrimidine metabolism	+	-	-	-	-
hsa00190	Oxidative phosphorylation	(-)	+	+	-	+

Gene set enrichment analysis (GSEA) performed on KEGG signaling and metabolic pathways reveals the pathways enriched for genes that are differentially transcribed after simvastatin (12 μ M) treatment, and the modulatory effects of FPP (17 μ M) and GGPP (17 μ M) + GSEA FDR < 0.001; - GSEA FDR > 0.001; (-) oxidative phosphorylation was only marginally significant in GSEA analysis by Tian with FDR < 0.05
Simva simvastatin, *FPP* farnesyl pyrophosphate, *GGPP* geranylgeranyl pyrophosphate, *FDR* false discovery rate

Discussion

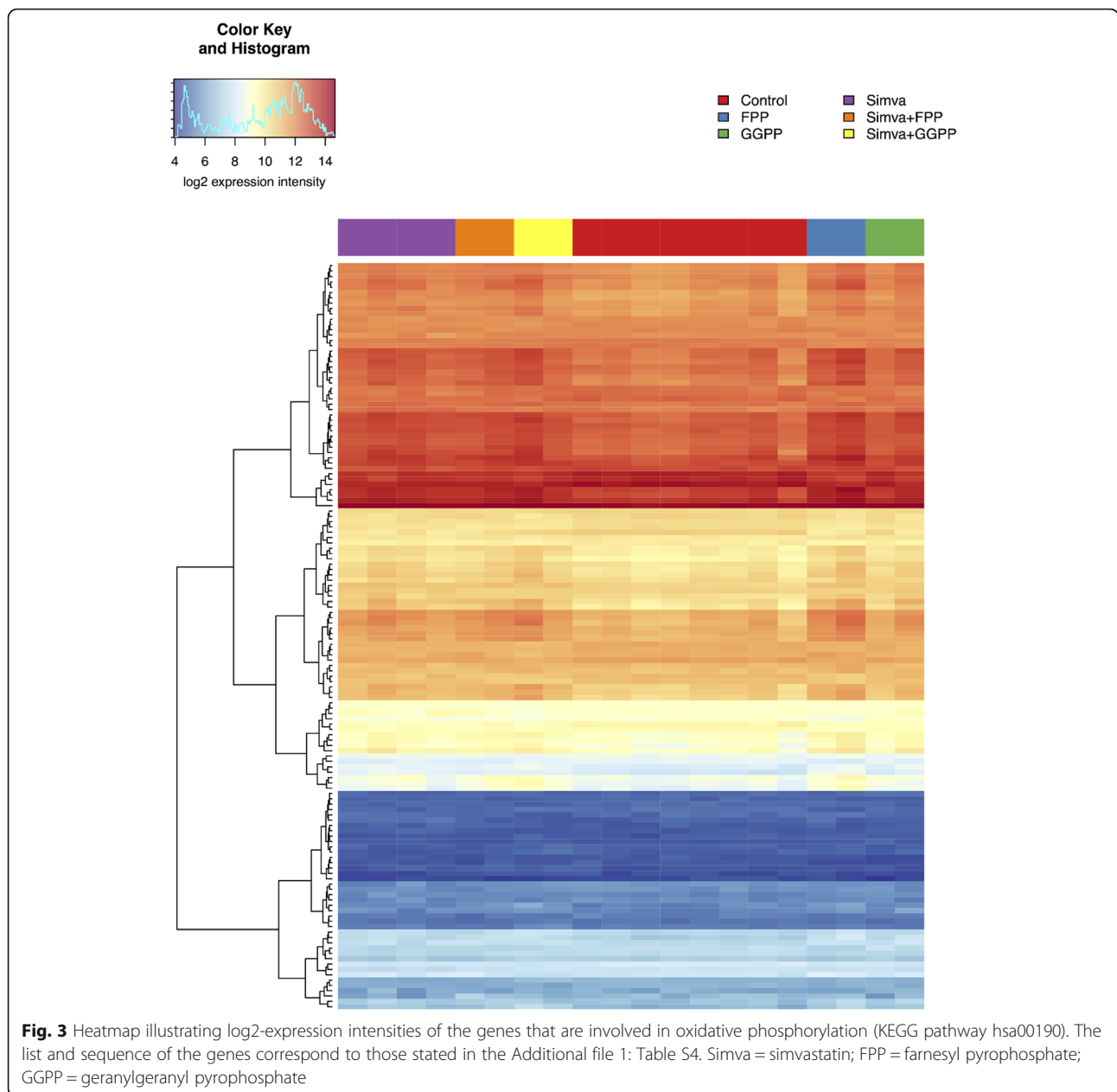
Although prenylated proteins are estimated to constitute ~ 2% of the total mammalian proteome [19] (including key intracellular signaling proteins involved in carcinogenesis [20]), and many pre-clinical and clinical studies have implicated the role of protein prenylation in various human pathologies (such as certain cancers, cardiovascular, and/or neurodegenerative diseases), the therapeutic potential of isoprenoid synthesis inhibitors, including statins, still awaits to be explored in more detail [21]. In fact, various approaches to suppress K-Ras signaling are currently under investigation, although effective treatment is still far from the clinical application [10]. In this respect, it should be noted that statin use has been reported to significantly improve prognosis of pancreatic cancer in several [22–24], although not all clinical studies [25].

Consistent with this data, we previously observed that the inhibitory effects of statins on the viability of pancreatic cancer cells were partially prevented by concomitant addition of mevalonate, FPP, or GGPP, indicating the contribution of isoprenoids for growth and viability of pancreatic cancer cells [11]. Concurrently, Cafforio et al. have shown that the addition of mevalonate, GGPP, or FPP to cerivastatin-treated cells derived from human leukemia and myeloma resulted in complete recovery of both cell viability and proliferation; while no effect was observed by squalene supplementation [26]. However, other studies on the role of FPP and GGPP in the biology of various tumor-derived cells including cervical as well as head and neck squamous cell carcinomas [27], acute myeloid leukemia [28], or colon cancer [29] have produced different results. While in these studies FPP supplementation was shown to have had only a partial effect on statin-induced cancer cell apoptosis, that of GGPP was markedly higher. Even more so, in another in vitro study on human leukemia cells, inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate synthase, leading to GGPP depletion with simultaneous

FPP accumulation, led to enhanced statin-induced apoptosis of leukemia cells, while depletion of both isoprenoids resulted in the vanishing of the apoptotic effect [30] suggesting superiority of GGPP over FPP in the process of apoptosis in this particular model. A similar disparate effect was also demonstrated for colon cancer cells in a study by Agarwal et al., in which addition of GGPP prevented lovastatin-induced apoptosis, whereas FPP, even in high concentrations had no such effect [31]. These data apparently suggest different roles of both isoprenoids in carcinogenesis, and may also explain the discordant effects of these compounds on the gene expression profiles of the pancreatic cancer cells observed in our study.

We also demonstrated, that all the statins (except pravastatin) effectively eliminated the GFP-K-Ras protein trafficking to the cell membrane [11], suggesting that depletion of FPP caused by statin-mediated inhibition of the mevalonate pathway disables proper posttranslational modification and trafficking of the GFP-K-Ras protein. Our data extend previous observations by other researchers demonstrating the inhibitory effect of lovastatin on K-Ras protein translocation in mesothelioma [32] or NIH-3 T3 cells [33]. As proven in our current study, the localization of GFP-K-Ras protein has been effectively rescued with both FPP and GGPP supplementation, which is consistent with their rescue effect on the pancreatic cancer cell viability observed in our previous study [11]. The fact that both FPP and GGPP comparably rescued GFP-K-Ras protein trafficking to the cell plasma membrane (as suggested by Fig. 1) is likely to be the result of the cross-prenylation phenomenon [34]. The K-Ras protein preferentially undergoes farnesylation [34], but may also be geranylgeranylated, as demonstrated in cancer cells treated with farnesyltransferase inhibitors [35, 36].

Although both FPP and GGPP eliminated the block of GFP-K-Ras protein posttranslational modification caused by statins, the gene expression profiles after exposure of



the simvastatin-treated cells to FPP and GGPP differed substantially. Genes whose expressions were most significantly affected by FPP treatment are largely identical with those affected by simvastatin treatment. This similarity was probably caused by the same inhibitory potential of FPP for HMG-CoA reductase, as reported for simvastatin [7, 37]. Nevertheless, this negative feedback was not observed for GGPP (Table 1), consistent with the fact that the excess of GGPP does not have an inhibitory effect on HMG-CoA reductase [38].

The observed data on gene expression in the pancreatic cancer cells treated with statin and isoprenoids might be explained by some complex regulatory activity, which FPP

and GGPP exert on HMG-CoA reductase and other intracellular signaling pathways. These involve transcriptional (via modulation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) transcription factors), posttranscriptional (by accelerating protein acceleration, as described for statins), as well as posttranslational regulation [39]. In particular, changes could be seen in SREBP transcription factor regulated genes such as *MVD*, *FDFT1*, *HMGCS1*, and *LSS*, as well as RAS-related genes *RRAS*, *RAB17*, and *RHOB*. In addition, FPP and GGPP may directly (and specifically for each isoprenoid) influence the expression of Ras and Ras-related proteins [40]. Last but not least, both isoprenoids can directly modulate the activities of certain nuclear

receptors. For instance, FPP can stimulate peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) [41], thyroid, estrogen, and glucocorticoid receptors [42], while GGPP itself has been shown to act as an antagonist of liver X receptor (LXR) [43]. Collectively, all this data demonstrates the multifaceted regulatory system exerted by isoprenoids. With a few exceptions, farnesylation and geranylgeranylation processes are highly substrate specific [19], further accounting for the observed changes in the gene expression profiles observed in our study.

We also observe an interesting effect of GGPP on those genes involved in the oxidative phosphorylation pathway. It is known that ubiquinone synthesis is blocked by the inhibitory action of statins [44], leading to the lack of ubiquinone in the mitochondria, with a consequent block of oxidative phosphorylation in the statin-treated cells. This, however, cannot be overcome by concomitant addition of GGPP or FPP, due to a lack of isopentenyl-PP (the FPP and GGPP upstream metabolites of the mevalonate pathway), which are also necessary for ubiquinone synthesis (Fig. 4).

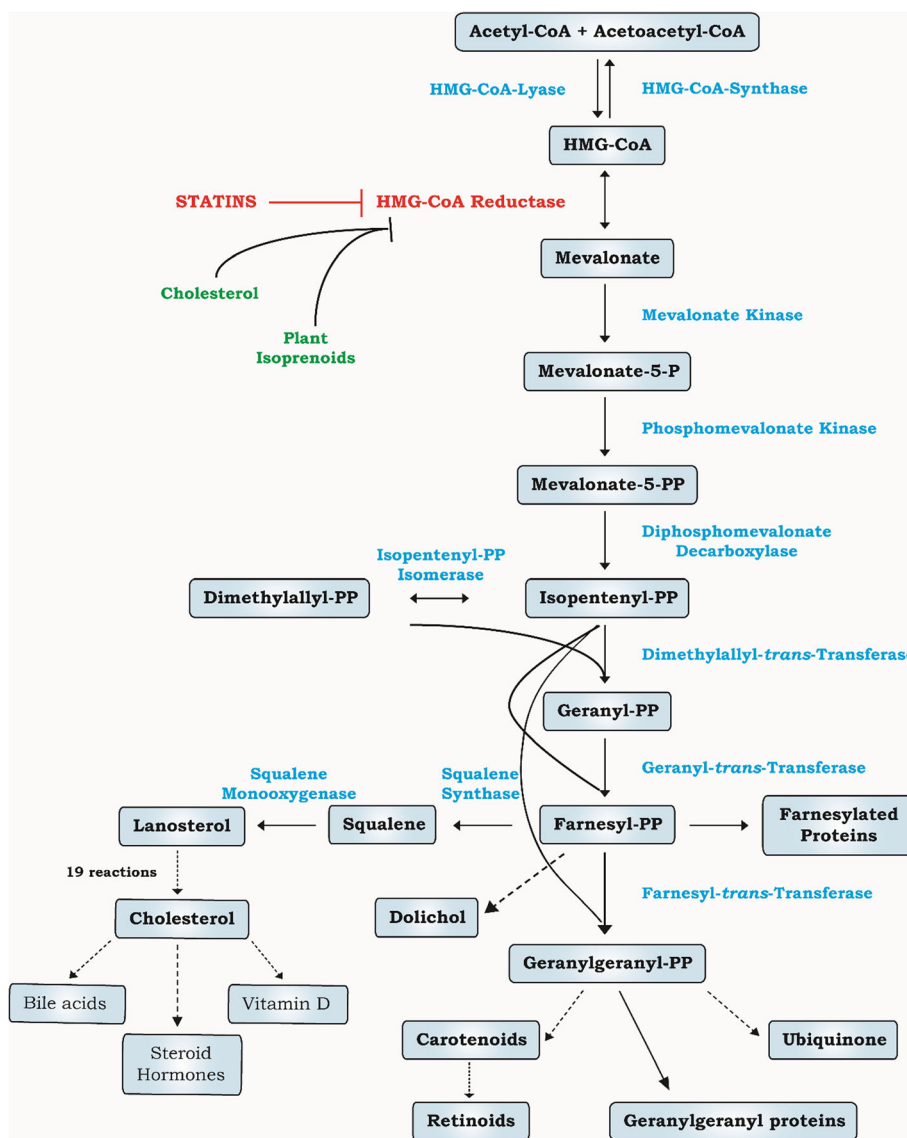


Fig. 4 Scheme of the mevalonate pathway and isoprenoid synthesis. The mevalonate pathway (also known as the isoprenoid pathway) is an essential metabolic pathway in a human body producing a five-carbon building block called isopentenyl pyrophosphate (IPP). IPP is used to make fully functional biomolecules belonging into a large group of isoprenoids. Two intermediates in this pathway, FPP and GGPP, play also an immense role in post-translational modification of signaling proteins involved in a wide array of cellular functions including proliferation, and also carcinogenesis. The whole mevalonate pathway begins with acetyl-CoA, the rate limiting enzymatic step is catalyzed by HMG-CoA reductase (a therapeutic target of statins), whose inhibition leads to depletion signaling isoprenoids. Continuous and dashed lines represent one and multistep reaction, respectively. HMG-CoA reductase can be blocked by statins (in red)

However, the results of the microarray analysis demonstrated that the process of the oxidative phosphorylation was only slightly affected by simvastatin, and was not affected by GGPP; however, the simultaneous treatment of cells with simvastatin and GGPP significantly changed the expression of genes encoding proteins of mitochondrial oxidative phosphorylation (Table 2, Fig. 3). In most of the cancer cell lines, the mitochondrial oxidative phosphorylation system is deficient, and the energy for growth (ATP production) is almost exclusively derived via glycolysis [45]. Whereas expressions of the genes involved in glycolysis were not affected in any of our experiments (data not shown), it seems that the anti-tumor effect of simvastatin on pancreatic cancer cells may also involve the inhibition of the mitochondrial oxidative phosphorylation, a phenomenon also described for simvastatin-treated prostate cancer cells [46].

One limitation of our study is high concentration of statins used. Since the clinical data on chemoadjuvant effects of clinically relevant doses of statins on pancreatic cancer are promising, it is apparent that further studies focused on determination of statins and isoprenoids in blood or even pancreatic cancer tissue might confirm our experimental data. In fact, such analytical methods are currently available [47] and are being used in our current studies [48]. Interestingly, gram doses of statins have already been used to treat cancer patients [49, 50], nevertheless it is certain that further clinical studies are needed to evaluate escalating doses of statins to define the therapeutic windows in oncology settings [51].

Conclusions

Our data indicate that the anticancer effects of statins observed in numerous studies to a large extent are mediated through isoprenoid intermediates of the mevalonate pathway, as they influence expression of genes involved in multiple intracellular pathways.

Additional files

Additional file 1: Table S1. List of primers used for quantitative real-time PCR analyses. **Table S4.** Quantitative RT-PCR analysis of selected genes. (DOCX 18 kb)

Additional file 2: Table S2. Differentially expressed genes after simvastatin, FPP, or GGPP treatment of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells. (XLS 1507 kb)

Additional file 3: Table S3. Gene set enrichment analysis on KEGG pathways affected by simvastatin, FPP, or GGPP treatment of MiaPaCa-2 human pancreatic cancer cells. (XLSX 22 kb)

Abbreviations

FPP: farnesyl pyrophosphate; GFP: green fluorescent protein; GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; LXR: liver X receptor; PPARs: peroxisome proliferator-activated receptors; SREBP: sterol regulatory element-binding protein

Acknowledgements

NA

Funding

The research was supported by the European Social Fund CZ.1.07/2.3.00/30.0060, grants NT13112-4 and RVO-VFN64165/2017 given out by the Czech Ministry of Health, and the grant APV-15-0217 given by the Slovak Research and Development Agency.

Availability of data and materials

The gene microarray data has been deposited to the ArrayExpress database (accession number E-MTAB-3263).

Authors' contributions

HG, SR and ZK performed all in vitro studies, JS, MK and HS performed all the bioinformatics analyses, WCD contributed to genetic analyses, TR and LV were responsible for study design and data interpretation. All authors contributed to writing of the whole manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

NA

Consent for publication

NA

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. ²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic. ³Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Institute of Molecular Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ⁴Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, and 4th Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

Received: 14 July 2017 Accepted: 5 December 2017

Published online: 20 December 2017

References

- Lim S, Sakuma I, Quon MJ, Koh KK. Potentially important considerations in choosing specific statin treatments to reduce overall morbidity and mortality. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):1696–702.
- Ghaneh P, Neoptolemos J. A new approach to managing intraductal papillary mucinous pancreatic neoplasms. *Gut.* 2007;56(8):1041–4.
- Magee T, Marshall C. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell.* 1999;98(1):9–12.
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:541–55.
- Yeganeh B, Wiechec E, Ande SR, Sharma P, Moghadam AR, Post M, et al. Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 2014;143(1):87–110.
- Plemenitas A, Watson JA. Down-regulation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with highly purified liposomal cholesterol. *Eur J Biochem.* 1999;266(2):317–26.
- Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(7):567–85.
- Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS mutant pancreatic cancer: no lone path to an effective treatment. *Cancers (Basel).* 2016;8(4). doi:10.3390/cancers8040045.
- Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2014;111(5):817–22.

10. Mann KM, Ying H, Juan J, Jenkins NA, Copeland NG. KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacol Ther.* 2016;168:29–42.
11. Gbelcova H, Lenicek M, Zelenka J, Knejzlik Z, Dvorakova G, Zadinova M, et al. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(6):1214–21.
12. Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, Tavare S. Beadarray. R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics.* 2007;23(16):2183–4.
13. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics.* 2005;21(9):2067–75.
14. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
15. A language and environment for statistical computing [https://www.r-project.org/]. Accessed 16 Dec 2017.
16. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9440–5.
17. Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ. Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13544–9.
18. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27–30.
19. Nguyen UT, Guo Z, Delon C, Wu Y, Deraeve C, Franzel B, et al. Analysis of the eukaryotic prenylome by isoprenoid affinity tagging. *Nat Chem Biol.* 2009;5(4):227–35.
20. Caraglia M, Budillon A, Tagliaferri P, Marra M, Abbruzzese A, Caponigro F. Isoprenylation of intracellular proteins as a new target for the therapy of human neoplasms: preclinical and clinical implications. *Curr Drug Targets.* 2005;6(3):301–23.
21. Park J, Matralis AN, Berghuis AM, Tسانtrizos YS. Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets. *Front Chem.* 2014;2:50.
22. Khurana V, Sheth A, Caldito G, Barkin JS. Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas.* 2007;34(2):260–5.
23. Lee HS, Lee SH, Lee HJ, Chung MJ, Park JY, Park SW, et al. Statin use and its impact on survival in pancreatic cancer patients. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(19):e3607.
24. H uang BZ, Chang J, Li E, Xiang AH, Wu BU. Influence of statins and cholesterol on mortality among patients with pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;109(5). doi:10.1093/jnci/djw275.
25. Cui X, Xie Y, Chen M, Li J, Liao X, Shen J, et al. Statin use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 2012;23(7):1099–11.
26. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis.* 2005;26(5):883–91.
27. Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, et al. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia.* 2002;4(4):337–46.
28. Xia Z, Tan MM, Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2001;15(9):1398–407.
29. Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, et al. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology.* 1999;117(4):838–47.
30. Dudakovic A, Wiemer AJ, Lamb KM, Vonnahme LA, Dietz SE, et al. Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase induces apoptosis through multiple mechanisms and displays synergy with inhibition of other isoprenoid biosynthetic enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(3):1028–36.
31. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2223–9.
32. Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA, Bitterman P. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 1):1616–22.
33. Chang MY, Jan MS, Won SJ, Liu HS. Ha-ras/Val12 oncogene increases susceptibility of NIH/3T3 cells to lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248(1):62–8.
34. Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(2):110–22.
35. Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez O, James L, Catino JJ, et al. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem.* 1997;272(22):14459–64.
36. Rowell CA, Kowalczyk JJ, Lewis MD, Garcia AM. Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272(22):14093–7.
37. Gardner RG, Hampton RY. A highly conserved signal controls degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a (HMG-CoA) reductase in eukaryotes. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31671–8.
38. Correll CC, Ng L, Edwards PA. Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17390–3.
39. Holstein SA, Hohl RJ. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids.* 2004;39(4):293–309.
40. Holstein SA, Wohlford-Lenane CL, Hohl RJ. Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. *Biochemistry.* 2002;41(46):13698–704.
41. Liliom K, Tsukahara T, Tsukahara R, Zelman-Ferniak M, Swiezewska E, Tigyi G. Farnesyl phosphates are endogenous ligands of lysophosphatidic acid receptors: inhibition of LPA GPCR and activation of PPARs. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(12):1506–14.
42. Das S, Schapira M, Tomic-Canic M, Goyanka R, Cardozo T, Samuels HH. Farnesyl pyrophosphate is a novel transcriptional activator for a subset of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol.* 2007;21(11):2672–86.
43. Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP, et al. Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48702–8.
44. Maltese WA, Aprille JR. Relation of mevalonate synthesis to mitochondrial ubiquinone content and respiratory function in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1985;260:11524–9.
45. Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978;22:190–274.
46. Oliveira KA, Zecchin KG, Alberici LC, Castilho RF, Vercesi AE. Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr.* 2008;40(4):307–14.
47. Kosek V, Stranska M, Fenclova M, Ruml T, Vitek L, Hajslova J. High resolution mass spectrometry based method applicable for a wide range of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibitors in blood serum including intermediates and products of the cholesterol biosynthetic pathway. *J Chrom A.* 2017;1489:86–94.
48. Gbelcova H, Rimpelova S, Ruml T, Fenclova M, Kosek V, Hajslova J, et al. Variability in statin-induced changes in gene expression profiles of pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2017;7:44219.
49. Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, et al. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2(3):483–91.
50. Kim WS, Kim MM, Choi HJ, Yoon SS, Lee MH, Park K, et al. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma. *Investig New Drugs.* 2001;19(1):81–3.
51. de Wolf E, Abdullah MI, Jones SM, Menezes K, Moss DM, Drijfhout FP, et al. Dietary geranylgeraniol can limit the activity of pitavastatin as a potential treatment for drug-resistant ovarian cancer. *Sci Rep.* 2017;7:5410.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



VPLYV STATÍNŮV NA AKTÍNOVÝ CYTOSKELET A BUNKOVÝ CYKLUS PANKREATICKÝCH NÁDOROVÝCH BUNIEK

Soňa Režnáková¹, Silvie Rimpelová², Petra Priščáková¹, Katka Koňariková³,
Vanda Repiská¹, Ladislav Csakó⁴, Helena Gbelcová¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR, helena.gbelcova@fmed.uniba.sk

²Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinárske a biochemické technologie VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ČR

³Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR

⁴Klinika ústnej, čeľustnej a tvárovej chirurgie Lekárska fakulta UK a UN Bratislava, Ružinovská 6, 821 01 Bratislava, SR

Abstrakt

Statíny, inhibitory *de novo* syntézy cholesterolu, vykazujú okrem hypolipidemického účinku celý rad ďalších, so znižovaním hladiny cholesterolu v krvi nesúvisiacich, účinkov. Tieto tzv. pleiotropné účinky statínov majú významnú úlohu v prevencii progresie niektorých ochorení. Ide najmä o účinky protizápalové, imunomodulačné, antioxidantné, proapoptotické, antiproliferačné či účinky brániace endotelovej dysfunkcii. V posledných rokoch je im navyše pripisovaný kanceroprotektívny účinok. Za účelom uplatnenia jednotlivých statínov v chemoadjuvantnej terapii zhubných nádorov je nutné poznať presné molekulárne mechanizmy pleiotropných účinkov statínov. Sledovali sme preto vplyv statínov na cytoskelet a bunkový cyklus pankreatických nádorových buniek.

Kľúčové slová: statíny, pankreas, bunkový cyklus, cytoskelet

Úvod

Statíny (inhibitory HMG-CoA reduktázy) predstavujú dominantnú skupinu látok používaných pri liečbe hypercholesterolémie vďaka ich schopnosti inhibovať *de novo* syntézu cholesterolu, tzv. mevalonátovú dráhu. Koncové produkty mevalonátovej dráhy (izoprénové jednotky inkorporované do sterolových aj nesterolových zlúčenín vrátane cholesterolu, ubichinónu, izopentenyladenínu, geranylgeranyl difosfátu (GGPP) a farnezyldifosfátu (FPP)) sú nepostrádateľné pre rôzne funkcie bunky (1). V dôsledku deplécie uvedených produktov mevalonátovej dráhy majú statíny okrem hypolipidemických účinkov aj radu ďalších pleiotropných biologických efektov. Ide najmä o účinky protizápalové, imunomodulačné, antioxidantné, proapoptotické, antiproliferačné či účinky brániace endotelovej dysfunkcii (2). Historický vývoj úlohy statínov od látok schopných znížiť hladinu cholesterolu k látkam

s protinádorovými účinkami ostatne veľmi prehladne zmapovali Clendening a Penn (3). Kanceroprotektívny účinok statínov je pripisovaný predovšetkým ich vplyvu na prenyláciu proteínov, z pomedzi ktorých GTP-viažuce Ras proteíny významne regulujú množstvo funkcií v bunke vrátane bunkovej proliferácie. Približne v 30 % všetkých zhubných nádorov človeka sa vyskytujú aktivačné mutácie *ras* génov a napríklad u karcinómov pankreasu dosahuje toto číslo 90 % (4). V porovnaní s inými typmi nádorov sú nádory pankreasu významne menej zahrnuté ako do klinického, tak i do základného výskumu, nakoľko chýbajú nové terapeutické postupy pre liečbu nádorov pankreasu (5). Statínmi sprostredkovaná inhibícia farnezylácie Ras proteínu sa zdá byť sľubným podporným prístupom k modifikácii bunkovej proliferácie v nádoroch pankreasu a v nádorových tkanivách vôbec. Antiproliferačný a protinádorový účinok statínov bol popísaný na rozličných

experimentálnych modeloch nádorov, vrátane nádoru pankreasu (6-18) a iných. Je však nutné spomenúť, že nie všetky klinické štúdie preukázali protinádorové účinky statínov (19-22) a závery mnohých štúdií sú vo vzťahu k protinádorovým účinkom statínov protikladné (napríklad pre *in vitro* málo účinný pravastatín) (23,24).

Materiál a metódy

Použité bunkové línie

MiaPaCa-2 – ľudské málo diferencované bunky adenokarcinómu pankreasu s aktivačnou mutáciou v géne kódujúcom K-Ras (G12C) – (ATCC, USA)

BxPC-3 – ľudské málo až stredne dobre diferencované bunky adenokarcinómu pankreasu s divokým typom génu kódujúceho K-Ras a zvýšenou expresiou cyklooxygenázy 2 – (ATCC, USA)

Capan-2 - ľudské dobre diferencované bunky adenokarcinómu pankreasu s aktivačnou mutáciou v géne kódujúcom K-Ras (G12V) – (ATCC, USA)

Testované látky – statíny

Všetkých osem v súčasnosti komerčne dostupných statínov (simvastatín, lovastatín, fluvastatín, pravastatín, atorvastatín, cerivastatín, pitavastatín, rosuvastatín – LKT Laboratories, Inc.) bolo rozpustených v metanole (Sigma, USA), pitavastatín v DMSO a po rozpustení boli skladované pri -20 °C.

Kultivácia buniek

Bunkové línie boli kultivované v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5% CO₂. Na kultiváciu boli použité nasledujúce média:

DMEM (Sigma, USA) obohatené fetálnym sérom (10%, Sigma, USA) pre bunky MiaPaCa-2

RPMI (Sigma, USA) obohatené fetálnym sérom (10%, Sigma, USA) pre bunky BxPC-3

McCoy ((Sigma, USA) obohatené fetálnym sérom (10%, Sigma, USA) a L-glutamínom (1,5 mM, Sigma, USA) pre bunky Capan-2.

Ovplyvnenie jednotlivých bunkových línií statínmi

Bunky boli inokulované na 6-jamkové kultivačné platne a 24 hodín kultivované za optimálnych podmienok. Následne boli 24, 48, 72 hodín pre potreby fluorescenčnej mikroskopie a 24 hodín pre potreby prietokovej cytometrie kultivované v prítomnosti jednotlivých statínov v koncentráciách zodpovedajúcich hodnote IC₅₀ simvastatínu pre jednotlivé bunkové línie (MiaPaCa-2 - 12

µM, BxPC-3 – 26 µM, Capan-2 – 14 µM). Kontrolné bunky boli kultivované v prítomnosti príslušného rozpúšťadla (metanol, DMSO).

Fluorescenčná mikroskopia cytoskeletu

Po ovplyvnení boli bunky fixované 20 minút 4% roztokom formaldehydu v PBS. Po odsatí fixačného roztoku boli bunky premyté 1 ml PBS a následne 20 minút inkubované v roztoku faloidínu (viaže sa na oligo- a polyméry aktínu) konjugovaného s TRITC (tetrametylrodaminizotiokyanát) v PBS v pomere 1:1000. Po odstránení faloidínu boli bunky trikrát premyté roztokom PBS a rovnakým roztokom prevrstvené. Na mikroskopiu bol použitý mikroskop ZEISS (Nemecko).

Prietoková cytometria

Po kultivácii buniek so statínmi boli bunky (1 x 10⁶) centrifugované (300 x g, 5 minút). Sediment bol resuspendovaný v 1 ml PBS a znovu odstredený (300 x g, 5 minút). Sediment resuspendovaný v malom množstve PBS bol doplnený 1 ml ľadového 70% etanolu. Takto pripravená suspenzia buniek bola uskladnená pri -20 °C.

Pre samotnú analýzu bunkového cyklu bola použitá komerčne dostupná súprava Muse™ Cell Cycle a analýza prebehla po farbení reagensiou podľa pokynov výrobcu na prietokovom cytometri Muse™ Cell Analyzer.

Výsledky a diskusia

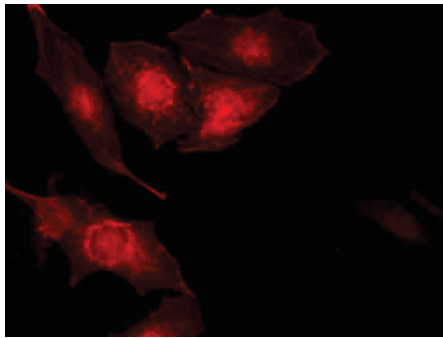
Všeobecne najmenší vplyv na morfológiu a konfluenciu buniek mali pravastatín a rosuvastatín, najväčší cerivastatín a pitavastatín. Tieto výsledky korelujú s údajmi hodnôt IC₅₀ pre jednotlivé bunkové línie publikované Gbelcovou a spol. (25).

Vplyv statínov na cytoskelet buniek

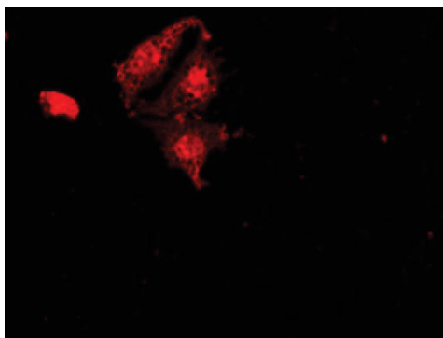
Ilustrácia neporušenej štruktúry aktínových filamentov je na obrázku 1a, štruktúra porušených aktínových filamentov je zachytená na obrázku 1b. K statínom, ktoré cytoskelet testovaných buniek ovplyvnili už po 24 hodinách pôsobenia patria cerivastatín a pitavastatín, po 72 hodinách spôsobili v testovanej koncentrácii uvoľnenie buniek z kultivačného povrchu. Naopak pravastatín v testovanej koncentrácii neovplyvnil aktínový cytoskelet buniek ani po 72 hodinách pôsobenia. U najviac diferencovanej bunkovej línie Capan-2 buniek boli zmeny cytoskeletu pozorované po 24 hodinovej kultivácii s fluvastatínom a pitavastatínom a v menšej miere

so simvastatínom. Po 48 hodinách pôsobenia bol pozorovateľný efekt všetkých statínov okrem pravastatínu a rosuvastatínu. Účinok rosuvastatínu sa prejavil až po 72 hodinách pôsobenia.

Výsledky pozorovania vplyvu statínov na aktívny cytoskelet buniek korelujú s pozorovaniami morfológických zmien buniek po účinku statínov (25).



a.



b.

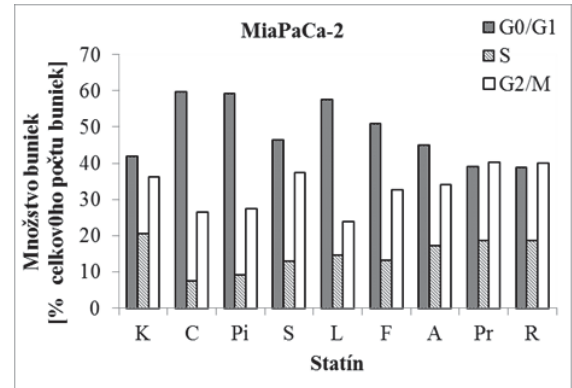
Obr. 1: Vplyv statínov na štruktúru aktívneho cytoskeletu: a) neporušený aktívny cytoskelet, b) porušený aktívny cytoskelet.

Vplyv statínov na bunkový cyklus

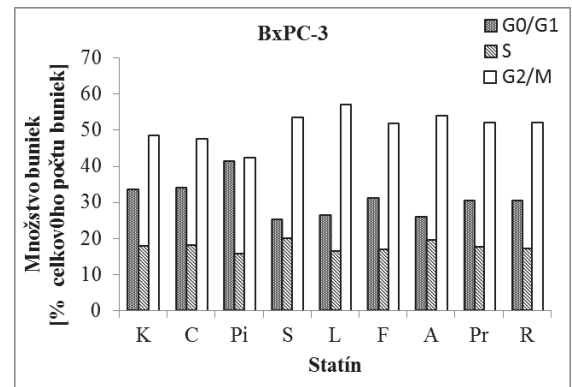
Všetky statíny, okrem pravastatínu viac alebo menej významne ovplyvnili bunkový cyklus, pričom významnosť vplyvu jednotlivých statínov sa líšil medzi jednotlivými bunkovými líniami. Nelíšila sa len významnosť vplyvu, ale aj spôsob,

akým statíny ovplyvnili bunkový cyklus buniek rôznych typov nádorov pankreasu (obrázky 2 a-c). V prípade buniek MiaPaCa-2 mali najvýznamnejší vplyv na bunkový cyklus dva najúčinnšie statíny – pitavastatín a cerivastatín – z obrázku 2a je zrejмый nárast množstva buniek v G0/G1 fáze. Porovnateľný účinok mal aj lovastatín, ktorý je aj komerčne dostupný ako látka synchronizujúca bunky v G1 fáze bunkového cyklu inhibíciou proteazómu (26). So stúpajúcou mierou diferenciácie buniek sa

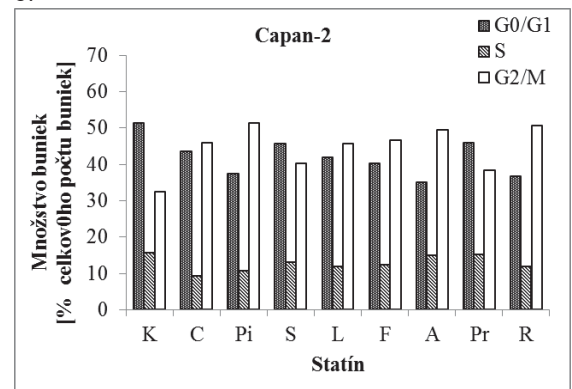
významnosť účinku statínov na bunkový cyklus buniek všeobecne znížila. Zároveň ak sme u viac diferencovaných bunkových línii efekt pozorovali, tak nešlo o nárast množstva buniek v G1/G0 fáze, ako v prípade MiaPaCa-2 buniek ale vo fáze G2/M (obrázky 2b a 2c).



a.



b.



c.

Obr.2: Vplyv statínov na bunkový cyklus buniek:

a) MiaPaCa-2, b) BxPC-3, c) Capan-2.

K - kontrola, C – cerivastatín, Pi – pitavastatín, S – simvastatín, L – lovastatín, F – fluvastatín, A – atorvastatín, Pr – pravastatín, R – rosuvastatín. Koncentrácia statínov - 12µM, doba pôsobenia – 24 hodín.

Záver

Odolnosť jednotlivých nádorových línií odvodených z nádorov pankreasu stúpala s mierou ich diferenciacie, a to konkrétne v poradí MiaPaCa-2, BxPC-3 a Capan-2. Málo účinné statíny pravastatín a rosuvastatín vykazovali v testovaných koncentráciách zanedbateľný účinok na aktínový cytoskelet, ako aj na bunkový cyklus testovaných buniek. Naopak najúčinnšie statíny cerivastatín a pitavastatín sa vo všetkých experimentoch prejavili ako veľmi účinné už po 24 hodinách pôsobenia.

PodĎakovanie

Publikácia bola pripravená vĎaka grantovej podpore VEGA 1/0109/16, KEGA 023UK-4/2016, APVV-15-0217, účelovej podpore na špecifický vysokoškolský výskum (MŠMT č.20-SVV/ 2016) a operačného programu Výskum a inovácie pre projekt: Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave – 2. fáza, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
2. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000; 32: 164-176.
3. Clendening JW, Penn LZ. Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene* 2012; 31(48): 4967-4978.
4. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1998; 53: 549-554.
5. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 2007; 56: 1134-1152.
6. Altwaairgi AK. Statins are potential anticancerous agents (Review). *Oncol Rep* 2015; 33(3):1019-1039.
7. Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, Bernardini N, Collecchi P, et.al. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells. *Br J Cancer* 2005; 93: 319-330.
8. Feleszko W, Jakobisiak M. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1198-1199.
9. Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, Stoner GD, Ruch RJ. Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett* 1996; 109: 217-222.
10. Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H, Matsuzawa Y. Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin andd-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer* 1994; 69:1015-20.
11. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61: 4885-4891.
12. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002; 122: 308-318.
13. Mikulski SM, Viera A, Darzynkiewicz Z, Shogen K. Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1992; 66: 304-310.
14. Muller C, Bockhorn AG, Klusmeier S, Kiehl M, Roeder C, Kalthoff H, Koch OM. Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 1998; 12: 717-723.
15. Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, Pour PM, et al. Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas* 1994; 9: 657-661.
16. Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, Uchida T, et al. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology* 1992; 103: 982-989.
17. Ura H, Obara T, Nishino N, Tanno S, Okanuta K, Namiki M. Cytotoxicity of simvastatin to pancreatic adenocarcinoma cells containing mutant ras gene. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 633-638.
18. Yao CJ, Lai GM, Chan CF, Cheby AL, Yang YY. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lo-

- vastatin and troglitazone. *Int J Cancer* 2006; 118:773–779.
19. Larner J, Jane J, Laws E, Packer R, Myers C, Shaffrey M. 1998. A phase I-II trial of lovastatin for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol*, 21: 579-583.
 20. Kim WS, Kim MM, Choi HJ, Yoon SS, Lee MH, Park K, Park CH, Kang WK. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced Bystric adenocarcinoma. *Incest New Drugs* 2001; 19: 81-83.
 21. Bonovas S, Filioussi K, Tsantes A, Sitaras NM. Use of statins and risk of haematological malignancies: a meta-analysis of six randomized clinical trials and eight observational studies. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 255–262.
 22. Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM. Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2646-3651.
 23. Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, Inada M, Tamura S, Noda S, Imai Y, Matsuzawa Y. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 2001; 84: 886-891.
 24. Bonovas S, Sitaras NM. Does pravastatin promote cancer in elderly patients? A meta-analysis. *CMAJ* 2007; 176: 649–654.
 25. Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Kudla M, Balaž P, Ruml T, Vítek L. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer, *Int J Cancer* 2008, 122: 1214-1221.
 26. Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K. Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:7797-802

VPLYV STATÍNOV NA DIFERENCIÁCIU A PREŽÍVANIE KMEŇOVÝCH BUNIEK

The effect of statins on differentiation and surviving of the stem cells

Soňa REŽNÁKOVÁ, Petra PRIŠČÁKOVÁ, Vanda REPISKÁ, Helena GBELCOVÁ

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, prednosta doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.

SÚHRN

Statíny sú dominantnou skupinou látok používaných pri liečbe hypercholesterolémie vďaka ich schopnosti inhibovať *de novo* syntézu cholesterolu. V poslednom čase sa však hromadia informácie aj o ich schopnosti indukcie, ako aj inhibície diferenciácie kmeňových buniek. Terapia prostredníctvom kmeňových buniek sa v súčasnosti stáva alternatívou riešenia mnohých degeneračných aj nádorových ochorení, ktoré nemožno uspokojivo riešiť štandardnými postupmi. Zároveň však prináša riziko neorganizovaného rastu a delenia buniek, čo môže viesť k formovaniu nádoru. Jednou z možností eliminácie rizika liečby kmeňovými bunkami je súčasná aplikácia statínov. Prinášame preto stručný prehľad pozorovaných účinkov statínov na diferenciáciu a prežívanie kmeňových buniek.

Kľúčové slová: statíny, kmeňové bunky, regeneračná terapia, diferenciácia, proliferácia.

Lek Obzor (Med Horizon), 67, 2018, č. 3-4, s. 115 – 119

SUMMARY

Statins represent a dominant group of substances used in the treatment of hypercholesterolaemia due to their ability to inhibit *de novo* cholesterol synthesis. Recently, ability of statins to induce and/or inhibit stem cell differentiation was observed. Stem cell therapy is alternative treatment for many degenerative and tumor diseases that cannot be satisfactorily treated by standard procedures. However, stem cells based therapy brings also the risk of aberrant proliferation and cell division, which can lead to tumor formation. One of the possible ways of eliminating the risk of stem cells based therapy is the application of statins. Therefore, we prepared a brief review about the effects of statins on differentiation and survival of stem cells.

Key words: statins, stem cells, regenerative medicine, differentiation, proliferation.

Lek Obzor (Med Horizon), 2018, 67(3-4), p. 115-119

Úvod

Statíny sú dominantnou skupinou látok používaných pri liečbe hypercholesterolémie vďaka ich schopnosti inhibovať *de novo* syntézu cholesterolu. V poslednom čase sa však hromadia informácie aj o ich schopnosti indukcie, ako aj inhibície diferenciácie kmeňových buniek. Terapia prostredníctvom kmeňových buniek sa v súčasnosti stáva alternatívou riešenia degeneračných aj nádorových ochorení, ktoré nemožno uspokojivo riešiť štandardnými postupmi. Zároveň však prináša riziko neorganizovaného rastu a delenia buniek, čo môže viesť k formovaniu nádoru. Jednou z možností eliminácie rizika je súčasná aplikácia statínov.

Statíny

Statíny sú selektívne inhibítory 3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A (HMG-CoA) reductázy, kľúčového enzýmu *de novo* syntézy cholesterolu. Ich vplyv na znižovanie hladiny cholesterolu v sére je známy od roku 1976 a od roku 1980 sa začali používať v klinickej praxi (1). Aktuálne je komerčne dostupných 8 statínov: rosu-

vastatín, atorvastatín, simvastatín, pravastatín, fluvastatín, lovastatín, pitavastatín, cerivastatín. Prehľad najčastejšie používaných statínov v Slovenskej republike s uvedením distribučného názvu je v **tabuľke 1**.

Tabuľka 1. Najčastejšie používané statíny v Slovenskej republike.

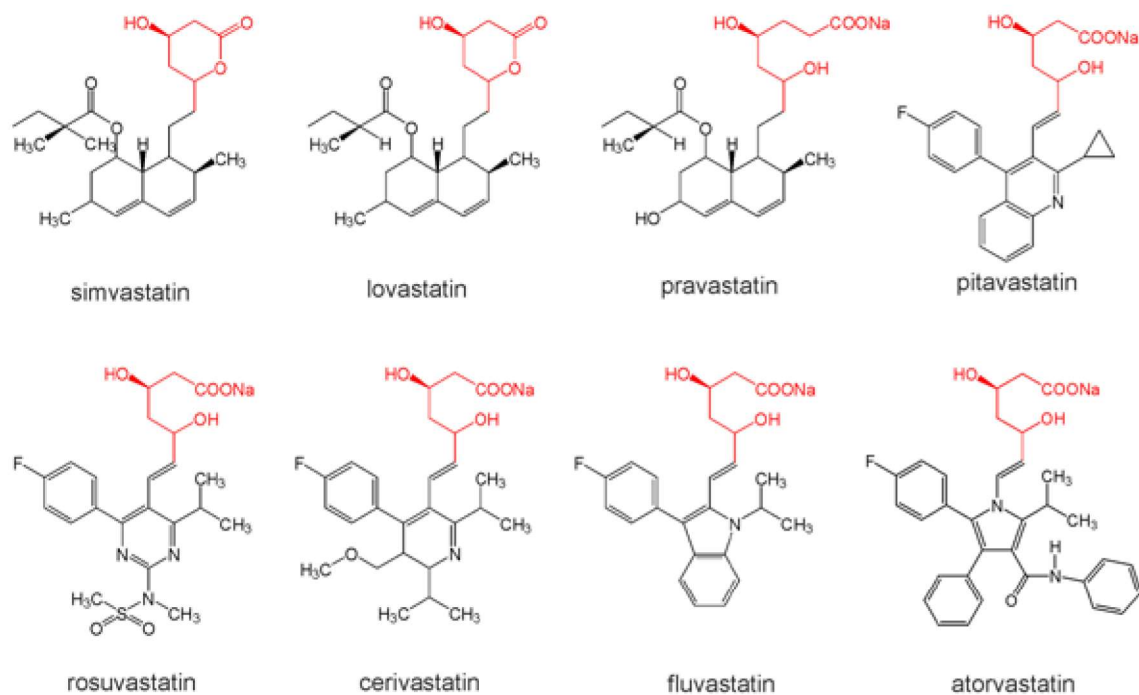
Generický názov	Distribučný názov
Atorvastatín	Atoris Sortis Torvacard Tulip
Fluvastatín	Lescol XL 80
Lovastatín	Mevacor Medostatín
Rosuvastatín	Crestor
Simvastatín	Ratiopharm Simcor Simgal Simvacard Simvastatin Vasilip Zocor

Z hľadiska štruktúry pozostávajú statíny z dvoch základných častí. Prvou je farmakofór (zvýraznená časť na **obr. 1**), ktorý je zodpovedný za biologickú aktivitu statínov, za kompetitívnu inhibíciu HMG-CoA reductázy. Druhú časť molekuly statínov predstavuje systém kruhov s rôznymi substituentami (obr. 1), ktoré sú zodpovedné za rozpustnosť, farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti a mnoho ďalších vlastností statínov nezávislých od inhibície HMG-CoA reductázy. Ide o tzv. pleiotropné účinky statínov, ku ktorým patrí úprava endotelovej dysfunkcie, redukcia oxidačného stresu, pro-

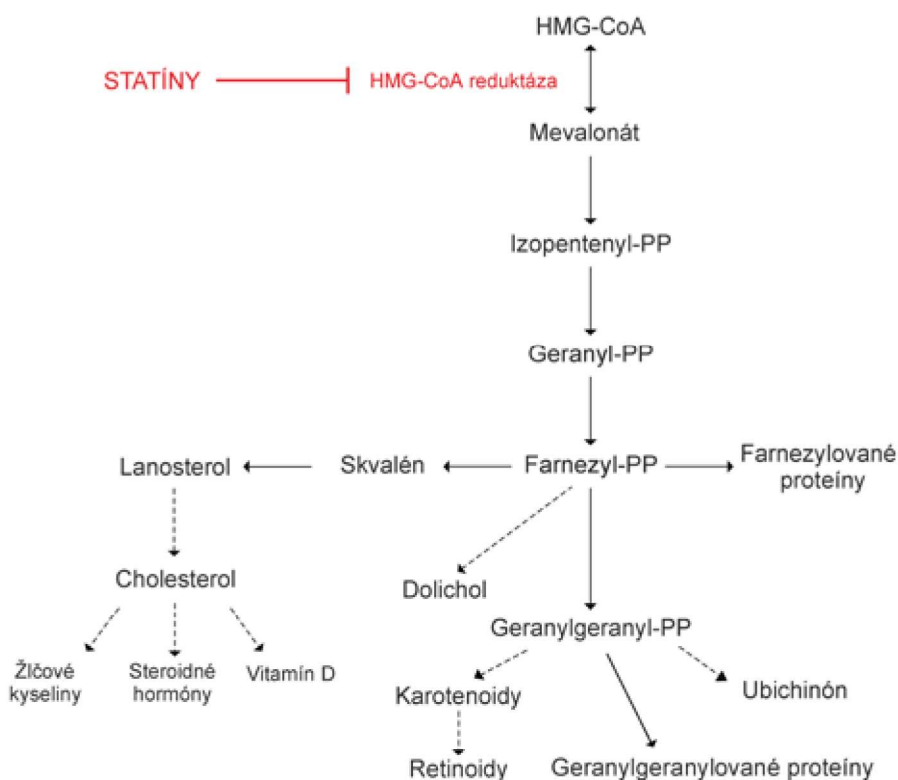
trombolytický účinok, vplyv na funkciu trombocytov, makrofágov a monocytov, protizápalový účinok, stabilizácia aterosklerotického plátu (2), ovplyvňovanie mechanizmov bunkového cyklu, diferenciácie, apoptózy, a tým aj procesu onkogenézy (3) a iné.

Za pleiotropné účinky statínov nie sú zodpovedné len ich rozličné postranné reťazce, ale aj deplécia mnohých, pre fyziologické fungovanie bunky nepostrádateľných molekúl, ktoré sú medziproduktmi, prípadne konečnými produktmi mevalonátovej dráhy (**obr. 2**). Okrem cholesterolu, ktorý je podstatnou zložkou bun-

Obrázok 1. Chemická štruktúra statínov.



Obrázok 2. Mevalonátová dráha.



kových membrán a podieľa sa na tvorbe žľových kyselín, lipoproteínov, steroidových hormónov, je v dôsledku inhibície mevalonátovej dráhy v bunke nedostatok dolicholu, ubiquinónu, izopentenyladenínu, geranylgeranyl pyrofosfátu (GGPP), farnesyl pyrofosfátu (FPP) a iných. Ubichinón sa zúčastňuje na mitochondriálnej respirácii a má dôležitú úlohu v inhibícii peroxidácie lipidov. Pokles jeho hladiny môže viesť k poškodeniu mitochondrií a oxidačnému poškodeniu bunky. Dolichol je dôležitým vychytávačom voľných radikálov v bunkových membránach. Izopentenyladenín je nepostrádateľný pre správnu funkciu tRNA a syntézu proteínov. GGPP a FPP majú významnú úlohu v posttranslačnej modifikácii bunkových proteínov zúčastňujúcich sa na procesoch bunkového delenia a diferenciácie, expresie génov, tvorby cytoskeletu, transportu proteínov a lipidov v bunkách, obrany proti patogénom (4, 5).

Statíny a kmeňové bunky

K ostatným študovaným pleiotropickým vlastnostiam statínov patrí ich schopnosť modulovať biologické charakteristiky a funkcie kmeňových buniek, čo má potenciálne využitie v regeneračnej medicíne. Napríklad pri liečbe akútneho infarktu myokardu je limitáciou pre použitie autológnych kmeňových buniek pokles počtu i funkcií kmeňových buniek pacientov s ischemickou chorobou srdca, *diabetes mellitus* a zlyhaním srdca (11). Ďalším problémom je zhoršené prežívanie podaných kmeňových buniek v prostredí myokardu poškodeného infarktom, ktorý uvoľňuje cytotoxické faktory. Pôsobenie statínov na rôzne charakteristiky kmeňových buniek by mohlo viesť k zefektívneniu liečby kmeňovými bunkami pri súčasnom podávaní statínov (6).

Vplyv statínov na samoobnovovanie a diferenciáciu kmeňových buniek

Presná regulácia pomeru samoobnovovania a diferenciácie kmeňových buniek je kľúčová pre správny priebeh organogenézy, tkanivovej homeostázy a regenerácie. Zvýšenie tohto pomeru v prospech samoobnovovania vedie k degenerácii tkanív, naopak nadmerná proliferácia na úkor diferenciácie indukuje kancerogézu (7). Statíny môžu zvyšovať počet a schopnosť diferenciácie kmeňových buniek. Efekt statínov sa líši v závislosti od druhu kmeňových buniek (8, 9).

Cirkulujúce endotelové progenitorové bunky (EPC) odvodené z kostnej drene sa podieľajú na reendotelizácii poškodených ciev a neovaskularizácii ischemických tkanív. Predstavujú dôležitý reparačný mechanizmus, ktorým organizmus zabezpečuje integritu endotelu. U pacientov s ischemickou chorobou srdca, *diabetes mellitus* a metabolickým syndrómom je významne znížené množstvo cirkulujúcich EPC (10, 11). Statíny inhibujú starnutie EPC a podporujú ich proliferáciu (8). Spomalenie starnutia EPC spôsobuje statínmi sprostredkovaná modulácia proteínov bunkového cyklu, konkrétne „up-regulácia“ cyklínov a „down-regulácia“ inhibítora bunkového cyklu p27Kip1. Tento proces závisí od prítomnosti izoprenoidov (FPP a GGPP) (8). Statíny môžu

odďalovať starnutie kmeňových buniek aj redukciami tvorby voľných kyslíkových radikálov (12). Statíny ďalej zvyšujú diferenciáciu EPC z *ľudských periférnych mononukleárných buniek* a CD34-pozitívnych hematopoetických kmeňových buniek *in vitro* a podporujú diferenciáciu EPC na kardiomyocyty (13).

Obzvlášť pozitívny vplyv majú statíny na proliferáciu **embryonálnych kmeňových buniek (ESC)**. Ich krátkodobá expozícia statínom neinhibuje rast karyotypovo normálnych ľudských ESC. Naproti tomu liečba statínmi inhibuje rast nádorových ESC a ESC s abnormálnym karyotypom. Táto inhibičná aktivita je sprostredkovaná zvýšením expresie apoptických génov. Statíny teda nemajú len protinádorové účinky, ale supresiou rastu a proliferácie abnormálnych ESC zároveň podporujú rast normálnych ESC *in vitro* (14).

Existujú *in vitro* a *in vivo* dôkazy, že statíny potláčajú proliferatívny potenciál a zároveň indukujú diferenciačný potenciál **mezenchýmových kmeňových buniek (MSC)** (15, 16). Simvastatín indukuje diferenciáciu MSC na osteoblasty a zároveň inhibuje diferenciáciu MSC na adipocyty (17). Pôsobením statínov dochádza k zmene morfológie MSC, z vretenovitého tvaru sa menia na veľké sploštené bunky s rozšírenou cytoplazmatickou oblasťou. Statínmi sprostredkovaná redukcia potenciálu MSC diferencovať sa na makrofágy inhibuje zápalové procesy a zvyšuje stabilitu aterosklerotických plátov pacientov s kardiovaskulárnymi chorobami. Statíny pôsobia aj priamo na existujúce makrofágy potlačením ich proliferatívnej aktivity, prípadne indukciou apoptózy existujúcich makrofágov (18). Opísané vplyvy statínov na MSC závisia od použitého statínu, použitého typu MSC, doby expozície a ďalších faktorov.

Nádorové kmeňové bunky (CSC) a nenádorové kmeňové bunky majú mnoho spoločných vlastností, ku ktorým patria samoobnovovací potenciál, vysoká proliferatívna kapacita, vysoká telomerázová aktivita, vysoký pomer objemu jadra k objemu cytoplazmy, možnosť aktivácie rovnakých signálnych dráh. ESC a niektoré ľudské nádorové bunky využívajú rovnaké vzory génovej expresie, ktoré sú v nenádorových somatických bunkách potlačené (19, 20). Statíny inhibujú proliferáciu ESC supresiou ich génov kmeňovosti (14), rovnako môžu suprimovať podobné gény kmeňovosti v CSC, a tým ovplyvňovať rast a metastázovanie nádorových buniek (6).

Vplyv statínov na mobilizáciu kmeňových buniek

Statíny majú vplyv na mobilizáciu EPC a uľahčujú ich transport do miest cievneho poškodenia, ich diferenciáciu na epitelové bunky, a tak zlepšujú reendotelizáciu a neovaskularizáciu (21, 22). Vplyv statínov na mobilizáciu EPC potvrdili aj klinické štúdie. Liečba statínmi zvyšuje mobilizáciu buniek CD34+ po akútnom infarkte myokardu (23), zlepšuje opravu endotelového poškodenia a obmedzuje progresiu aterosklerotických zmien rizikových pacientov. Zaujímavé výsledky priniesla randomizovaná štúdia, počas ktorej porovnávali efekt intenzívnej a štandardnej dávky statínov na mobilizáciu

EPC pacientov po úspešnej perkutánnej koronárnej intervencii. Počet EPC pri prijatí a pri prepustení pacienta bol v oboch skupinách podobný, ale v intenzívne liečenej skupine pacientov bol počet EPC významne vyšší v priebehu sledovania po liečbe. Intenzívna statínová liečba v porovnaní so štandardnou terapiou mobilizuje EPC účinnejšie (23). V prípade pacientov s chronickým kardiálnym zlyhávaním viedla liečba rosuvastatínom v dávke 40 mg denne k zvýšeniu hladín cirkulujúceho vaskulárneho endotelového rastového faktora, zvýšeniu počtu kmeňových buniek v periférnej krvi a zvýšenej schopnosti kmeňových buniek integrovať sa do endotelových štruktúr *in vitro*, spojenej s vyššou vaskularizáciou v biopsiách kostrových svalov (24).

Vplyv statínov na prežívanie kmeňových buniek

Kombinovaná liečba statínmi a MSCs významne znižuje apoptózu kardiomyocytov, redukuje oxidačný stres a potláča expresiu génov kódujúcich zápalové cytokíny v myokarde po akútnom infarkte. To vedie k zvýšenému preživanju MSCs, výraznejšiemu funkčnému zlepšeniu myokardu a zvýšenej kardiovaskulárnej diferenciácii transplantovaných kmeňových buniek. Podávanie statínov preukázateľne vedie k vytvoreniu lepšieho prostredia pre prežívanie a diferenciáciu implantovaných kmeňových buniek (25).

Záver

Na základe uverejnených štúdií sa zdá, že podávanie statínov predstavuje efektívnu metódu uľahčujúcu terapiu kmeňovými bunkami.*

*Ďakujeme Agentúre na podporu výskumu a vývoja za finančnú podporu na riešenie projektu APVV-15-0217 s názvom *Molekulové mechanizmy vplyvu statínov na inhibíciu, proliferáciu a diferenciáciu vybraných kmeňových a nádorových buniek a ich aplikácia v regeneračnej medicíne*.

Literatúra

1. ENDO, A., KURODA, M., TANZAWA, K.: Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*, 2, 1976, s. 323 – 326.
2. SORRENTINO, S., LANDMESSER, U.: Nonlipid-lowering effects of statins. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 6, 2005, s. 459 – 466.
3. SVOBODA, M., VYSKOČIL, J., NOVÁKOVÁ, J.: Statiny v onkológii. *Klin Farmakol Farm*, 19, 2005, s. 155 – 159.
4. GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S.: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 6257, 1990, s. 425 – 430.
5. TAVINTHARAN, S., ONG, C., JEYASEELAN, K., SIVAKUMAR, M., LIM S., SUM, C.: Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: A possible role in statin-induced hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol*, 2, 2007, s. 173 – 179.
6. XU, H., YANG, Y.J., YANG, I., QIAN, H.Y.: Statins and stem cell modulation. *Ageing Res Rev*, 1, 2013, s. 1 – 7.

7. LIU, J., SATO, C., CERLETTI, M., WAGERS, A.: Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Curr Top Dev Biol*, 92, 2010, s. 367 – 409.
8. ASSMUS, B., URBICH, C., AICHER, A., HOFMANN, W.K., HAENDELER, J., RÖSSIG, L.: HMG-CoA Reductase Inhibitors Reduce Senescence and Increase Proliferation of Endothelial Progenitor Cells via Regulation of Cell Cycle Regulatory Genes. *Circulat Res*, 9, 2003, s. 1049 – 1055.
9. SUZUKI, G., IYER, V., CIMATO, T., CANTY, J.M., Jr.: Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD133⁺ and cKit⁺ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle. *Circulat Res*, 2, 2009, s. 255 – 264.
10. PARK, A., BARRERA-RAMIREZ, J., RANASINGHE, I., PILON, S., SY, R., FERGUSSON, D., et al.: Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Reports*, 3, 2016, s. 327 – 339.
11. VASA, M., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., ADLER, K., URBICH, C., MARTIN, H., et al.: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulat Res*, 1, 2001, s. E1 – E7.
12. HAENDELER, J., HOFFMANN, J., DIEHL, J.F., VASA, M., SPYRIDOPOULOS, I., ZEIHNER, A.M., et al.: Antioxidants Inhibit Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase and Delay Replicative Senescence of Endothelial Cells. *Circulat Res*, 6, 2004, s. 768 – 775.
13. RUPP, S., BADORFF, C., KOYANAGI, M., URBICH, C., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., et al.: Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells. *Basic Res Cardiol*, 1, 2004, s. 61 – 68.
14. GAUTHAMAN, K., MANASI, N., BONGSO, A.: Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells *in vitro* but not normal human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol*, 6, 2009, s. 962 – 973.
15. BAEK, K.H., LEE, W.Y., OH, K.W., TAE, H.J., LEE, J.M., LEE, E.J., et al.: The Effect of Simvastatin on the Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *J Korean Med Sci*, 14, 2005, s. 438 – 444.
16. KUPCSIK, L., MEURYA, T., FLURY, M., STODDART, M., ALINI, M.: Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *J Cell Mol Med*, 11 – 12, 2009, s. 4465 – 4473.
17. LI, X., SONG, Q.S., WANG, J.Y., LENG, H., CHEN, Z.Q., LIU, Z.J., et al.: Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, 4, 2011, s. 396 – 403.
18. IZADPANAH, R., SCHÄCHTELE, D.J., PFNÜR, A.B., LIN, D., SLAKEY, D.P., KADOWITZ, P.J., et al.: The impact of statins on biological characteristics of stem cells provides a novel explanation for their pleiotropic beneficial and adverse clinical effects. *Am J Physiol Physiol*, 8, 2015, s. C522 – C531.
19. BUDAJ, M., POLJAK, Z., HULÍN, I., MLADOSIEVIČOVÁ, B.: Nádorové kmeňové bunky. *Lek Obzor (Med Horizon)*, 9, 2012, s. 320 – 324.
20. ILMER, M., VYKOUKAL, J., RECIO BOILES, A., COLEMAN, M., et al.: Two sides of the same coin: stem cells in cancer and regenerative medicine. *FASEB J*, 7, 2014, s. 2748 – 2761.

-
21. WALTER, D.H., RITTIG, K., BAHLMANN, F.H., KIRCHMAIR, R., SILVER, M., MURAYAMA, T., et al.: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 25, 2002, s. 3017 – 3024.
22. SCHROETER, M.R., HUMBOLDT, T., SCHÄFER, K., KONSTANTINIDES, S.: Rosuvastatin reduces atherosclerotic lesions and promotes progenitor cell mobilisation and recruitment in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*, 1, 2009, s. 63 – 73.
23. LEONE, A.M., RUTELLA, S., GIANNICO, M.B., PERFETTI, M., ZACCONI, V., BRUGALETTA, S., et al.: Effect of intensive vs standard statin therapy on endothelial progenitor cells and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: Statins for regeneration after acute myocardial infarction and PCI (STRAP) trial. *Int J Cardiol*, 3, 2008, s. 457 – 462.
24. ERBS, S., BECK, E.B., LINKE, A., ADAMS, V., GIELEN, S., KRÄNKEL, N., et al.: High-dose rosuvastatin in chronic heart failure promotes vasculogenesis, corrects endothelial function, and improves cardiac remodeling – Results from a randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Int J Cardiol*, 1, 2011, s. 56 – 63.
25. YANG, Y.J., QIAN, H.Y., HUANG, J., LI, J.J., GAO, R.L., DOU, K.F., et al.: Combined Therapy With Simvastatin and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Increases Benefits in Infarcted Swine Hearts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 12, 2009, s. 2076 – 2082.

Do redakcie došlo 5. 3. 2018.

Adresa pre korešpondenciu:

MUDr. Petra Priščáková
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4
811 08 Bratislava
e-mail: petra.priscakova@fmed.uniba.sk

Odolnosť mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od adipocytov k antiproliferačným účinkom statínov

Soňa Reznáková, Petra Priščáková, Peter Búran, Vanda Repiská, Helena Gbelcová

sona.reznakova@gmail.com

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Abstrakt

Statíny predstavujú dominantnú skupinu látok používaných pri liečbe hypercholesterolémie, vďaka ich schopnosti inhibovať mevalonátovú dráhu, prostredníctvom ktorej dochádza k *de novo* syntéze cholesterolu. V dôsledku deplécie medziproduktov mevalonátovej dráhy majú statíny okrem hypolipidemických účinkov aj mnoho ďalších pleiotropných biologických efektov, ktoré hrajú významnú úlohu v prevencii progresie niektorých ochorení. Okrem iného bol statínom pripisovaný kanceroprotektívny účinok, pričom ich antiproliferačný účinok bol preukázaný na rôznych typoch nádorov *in vitro* i *in vivo*. V ostatnom čase sa navyše začínajú hromadiť informácie o schopnosti statínov indukovať, ako aj inhibovať diferenciáciu kmeňových buniek. A keďže terapia prostredníctvom kmeňových buniek prináša riziko neorganizovaného rastu a delenia buniek a následného formovania nádoru, súčasná aplikácia statínov sa zdá byť jednou z možností eliminácie tohto rizika. Sledovanie vplyvu statínov na proliferáciu a diferenciáciu kmeňových buniek je preto predmetom nášho štúdia.

Kľúčové slová: statíny, kmeňové bunky, proliferácia, WST test

Úvod

Statíny sú selektívne inhibítory 3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A (HMG-CoA) reductázy, kľúčového enzýmu *de novo* syntézy cholesterolu. V súčasnosti je komerčne dostupných osem statínov (obr. 1) a predstavujú dominantnú skupinu látok používaných pri liečbe hypercholesterolémie. V dôsledku deplécie medziproduktov mevalonátovej dráhy, ku ktorým patria cholesterol, ubiquinolín, izopentenyladenín, geranylgeranyldifosfát, farnezyldifosfát atď., majú statíny okrem hypolipidemických účinkov aj mnoho ďalších pleiotropných biologických efektov, ktoré hrajú významnú úlohu v prevencii progresie niektorých ochorení. Ide najmä o účinky protizápalové, imunomodulačné, účinky brániace endotelovej dysfunkcii, antioxidantné, proapoptotické či antiproliferačné účinky (Bellosta a kol., 2000; Gauthaman a kol., 2009; Lacerda a kol., 2014). V istom období bol statínom navyše pripisovaný kanceroprotektívny účinok. Následne boli za účelom uplatnenia statínov v chemoadjuvantnej terapii zhubných nádorov intenzívne študované molekulárne mechanizmy ich pleiotropných účinkov. Antiproliferačný účinok statínov v onkológii bol pozorovaný na rozličných experimentálnych modeloch nádorov (Giordano a kol., 2012; Viola a kol., 2012; Lee a kol., 2014; Salis a kol., 2014; Yilmaz a kol., 2014; Altwairgi, 2015; Torres a kol., 2015), vrátane nádoru pankreasu (Kusama a kol., 2001; Kusama a kol., 2002; Bocci a kol., 2005; Gbelcová a kol., 2013; Yao a kol., 2013). Nie všetky klinické štúdie však preukázali protinádorové účinky statínov a závery mnohých štúdií sú vo vzťahu k protinádorovým účinkom statínov protikladné (Kawata a kol., 2001; Bonovas a Sitaras, 2007).

V ostatnom čase sa hromadia informácie o schopnosti statínov indukovať, ako aj inhibovať diferenciáciu kmeňových buniek (Izadpanah a kol., 2015), presný mechanizmus tohto ich účinku však zatiaľ nie je známy. Terapia prostredníctvom kmeňových buniek sa v súčasnosti stáva alternatívnou riešením niektorých degeneračných i nádorových ochorení, ktoré nie je možné uspokojivo riešiť štandardnými postupmi. Zároveň však prináša riziko neorganizovaného rastu a delenia buniek, čo môže viesť k formovaniu nádoru (Goldtwaite, 2006; Stratton a kol., 2009). Jednou z možností eliminácie rizika je súčasná aplikácia statínov. Z tohto dôvodu je potrebné štúdium vplyvu statínov na biologické vlastnosti, spôsoby regulácie delenia ako i génov zapojené do diferenciácie kmeňových buniek.

Materiál a metódy

Od tukového tkaniva odvodené mezenchymálne kmeňové bunky (ATCC - PCS-500-011) boli kultivované v bazálnom médiu pre tieto bunky určenom (ATCC® PCS-500-030™) doplnenom

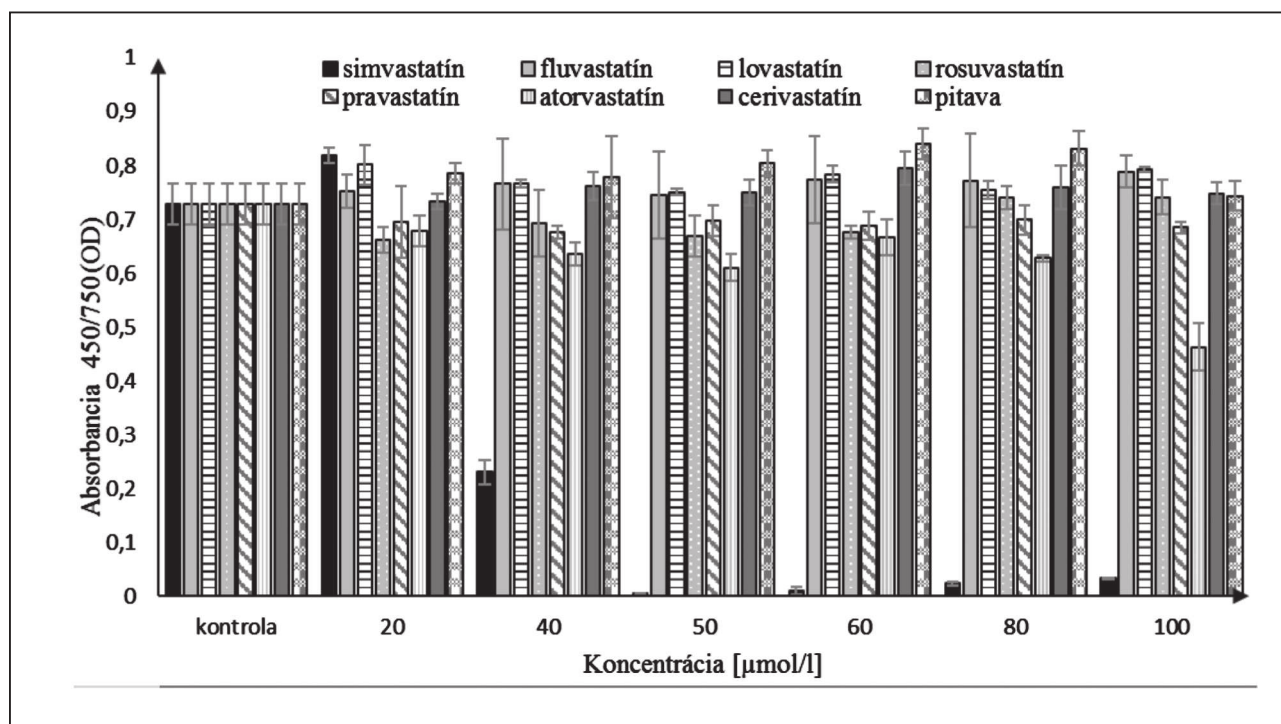
sérom a komerčne dostupným roztokom rastových faktorov (ATCC® No. PCS-500-040) podľa odporúčaní dodávateľa. Bunky boli kultivované v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5% CO₂. Všetky statíny (Merck) boli čerstvo rozpustené v metanole do koncentrácie 10 mmol/l.

Bunky (pasáž 8) boli nasadené na 96-jamkové platničky v množstve 3500 buniek na jamku. Po 24 hodinách boli do média pridané statíny v konečnej koncentrácii 20, 40, 50, 60, 80 a 100 µmol/l, resp. metanol (rozpúšťadlo) ako kontrola. Po ďalších 24 hodinách bolo médium odstránené a na stanovenie vplyvu statínov na proliferáciu buniek bol použitý WST-1 proliferačný kit (Sigma-Aldrich) podľa pokynov výrobcu. WST-1 reagentia bola pridaná v množstve 5 µl / 100 µl kultivačného média. Po 3,5 hodinách bola pomocou spektrofotometra odmeraná absorbanca pri 450 a 780 nm – metabolicky aktívne bunky menia WST-1 reagentiu na farebný produkt, ktorého absorbanca je priamoúmerná množstvu živých buniek.

Výsledky

Žiadny zo statínov, okrem simvastatínu, po 24 hodinách pôsobenia významne neovplyvnil proliferáciu mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od tukového tkaniva (obr.1). Hodnotu IC₅₀ nie je možné ani odhadnúť, nakoľko je vyššia ako 100 µmol/l, čo bola najvyššia testovaná koncentrácia. Mierny antiproliferačný účinok bol pozorovaný v prípade atorvastatínu s koncentráciou 100 µmol/l (obr.1).

Simvastatín v koncentrácii 20 µmol/l spôsobil po 24 hodinách zníženie množstva buniek viac ako o polovicu, čiže za hodnotu IC₅₀ je možné považovať hodnotu nižšiu ako 20 µmol/l. Vo vyšších testovaných koncentráciách s ohľadom na chybu merania spôsobil simvastatín smrť takmer všetkých buniek (obr.1).



Obr. 1 Vplyv statínov na proliferáciu MSC odvodených od tukového tkaniva po 24 hodinách pôsobenia.

Diskusia

Odolnosť mezenchymálnych kmeňových buniek odvodených od adipocytov kultivovaných *in vitro* k antiproliferačným účinkom statínov je v porovnaní s účinkami statínov na proliferáciu nádorových buniek až zarážajúca. Napríklad hodnoty IC₅₀ jednotlivých statínov po 24 hodinách pôsobenia na rôzne typy pankreatických nádorových buniek sa pohybujú do 60 µmol/l, vo väčšine prípadov do 30 µmol/l (tab.1) (Gbelcová a kol., 2008).

Tab.1: Hodnoty IC₅₀ statínov po 24 hodinách pôsobenia na nádorové bunky pankreasu

	IC ₅₀ (μmol/l) po 24 hodinách		
	CAPAN-2	MiaPaCa-2	BxPc-3
rosuvastatín	39	36	56
pravastatín	27	29	39
atorvastatín	22	27	37
fluvastatín	21	26	29
lovastatín	16	13	33
simvastatín	14	12	26
cerivastatín	12	10	22

Zatiaľ čo antiproliferačný účinok statínov na rôzne typy nádorov bol opísaný v tisícoch štúdií, vplyv statínov na diferenciáciu rôznych typov kmeňových buniek v desiatkach, vplyv statínov na prežívanie kmeňových buniek po vystavení statínom bol publikovaný len v niekoľkých prácach. Navyše zvolené vlastnosti nie sú študované u všetkých statínov súčasne. Izadpanah R a kol., napríklad pozorovali významné zvýšenie času zdvojenia mezenchymálnych kmeňových buniek vplyvom pravastatínu a atorvastatínu už v koncentráciách 30-60 μmol/l (Izadpanah a kol., 2015).

Záver

Otázka účinku statínov na kmeňové bunky izolované z podkožného tukového tkaniva je viac než aktuálna nielen z dôvodu ľahkého prístupu ku tkanivu a jednoduchému izolačnému postupu. Ďalším dôvodom je, že veľa ľudí, ktorí statíny užívajú z indikácie hypercholesterolémie, trpí súčasne obezitou. Pozorovanie, že tieto bunky odolávajú antiproliferačným účinkom statínov pozorovaných na nádorových bunkách, je preto pozitívne vnímané. Ďalším cieľom je vylúčiť účinky genotoxické.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: „Centrum translačnej medicíny“, (ITMS 26220220021), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a “BIOMEDIRES” (ITMS 26210120041), podporenými zo zdrojov Operačného Programu Výskum a Inovácie ERDF a EU sources. Finančne prispeli aj Lesy SR.

Referencie

- Altwaigri AK (2015): Statins are potential anticancerous agents (review). *Oncol Rep.* 33(3): 1019–1039.
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A (2000): Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med.* 32(3): 164–176.
- Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, Bernardini N, Collecchi P, Del Tacca M, Danesi R (2005): Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells. *Br J Cancer.* 93(3): 319–330.
- Bonovas S, Sitaras NM (2007): Does pravastatin promote cancer in elderly patients? A meta-analysis. *CMAJ.* 176(5): 649–654.
- Gauthaman K, Manasi N, Bongso A (2009): Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells *in vitro* but not normal human embryonic stem cells. *Br J Pharmacol.* 157(6): 962–973.
- Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J. (2008): Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *International Journal of Cancer.* 122(6):1214-1221.
- Giordano A, Romano S, Monaco M, Sorrentino A, Corcione N, Di Pace AL, Ferraro P, Nappo G, Polimeno M, Romano MF (2012): Differential effect of atorvastatin and tacrolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302(1): 135–142.
- Goldtwaite C (2006): Are Stem Cells Involved in Cancer? | [stemcells.nih.gov](https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter9.htm). Stem Cell Information., https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter9.htm
- Izadpanah R, Schächtele DJ, Pfnür AB, Lin D, Slakey DP, Kadowitz PJ, Alt EU (2015): The impact of statins on biological characteristics of stem cells provides a novel explanation for their pleiotropic beneficial and adverse clinical effects. *Am J Physiol Physiol.* 309(8): C522–C531.

- Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, Inada M, Tamura S, Noda S, Imai Y, Matsuzawa Y (2001): Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer*. 84(7): 886–891.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Inoue M, Nakamura H (2002): 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology*. 122(2): 308–317.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H (2001): Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors. *Cancer Res*. 61(12): 4885–4891.
- Lacerda L, Reddy JP, Liu D, Larson R, Li L, Masuda H, Brewer T, Debeb BG, Xu W, Hortobágyi GN, Buchholz TA, Ueno NT, Woodward WA (2014): Simvastatin Radiosensitizes Differentiated and Stem-Like Breast Cancer Cell Lines and Is Associated With Improved Local Control in Inflammatory Breast Cancer Patients Treated With Postmastectomy Radiation. *Stem Cells Transl Med*. 3(7): 849–856.
- Lee SJ, Hwang JW, Yim H, Yim HJ, Woo SU, Suh SJ, Hyun JJ, Jung SW, Koo JS, Kim JH, Seo YS, Yeon JE, Lee SW, Byun KS, Um SH (2014): Synergistic effect of simvastatin plus NS398 on inhibition of proliferation and survival in hepatocellular carcinoma cell line. *J Gastroenterol Hepatol*. 29(6): 1299–1307.
- Salis O, Bedir A, Gulden S, Okuyucu A, Kulcu C, Alacam H (2014): Cytotoxic Effect of Fluvastatin on MCF-7 Cells Possibly Through a Reduction of the mRNA Expression Levels of *SGK1* and *CAV1*. *Cancer Biother Radiopharm*. 29(9): 368–375.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA (2009): The cancer genome. *Nature*. 458(7239): 719–724.
- Torres CG, Olivares A, Stoores C (2015): Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol Rep*. 33(5): 2235–2244.
- Viola G, Grobelny P, Linardi MA, Salvador A, Dall'Acqua S, Sobotta Ł, Mielcarek J, Dall'Acqua F, Vedaldi D, Basso G (2012): Pitavastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, induces phototoxicity in human keratinocytes NCTC-2544 through the formation of benzophenanthridine-like photoproducts. *Arch Toxicol*. 86(3): 483–496.
- Yao S, He H, Gutierrez DL, Rezai Rad M, Liu D, Li C, Flanagan M, Wise GE (2013): Expression of Bone Morphogenetic Protein-6 in Dental Follicle Stem Cells and Its Effect on Osteogenic Differentiation. *Cells Tissues Organs*. 198(6): 438–447.
- Yilmaz A, Menevse S, Konac E, Alp E (2014): The DNA methyl transferase inhibitor, 5 -aza-2-deoxycytidine, enhances the apoptotic effect of Mevastatin in human leukemia HL-60 cells. *Hum Exp Toxicol*. 33(4): 414–423.