

239 Lidský nádorový supresor p53 zastavuje růst a indukuje diferenciaci ptačích monoblastů.

Navrátilová J.¹, Horváth V.^{1,2}, Kozubík A.^{1,2}, Šmarda J.¹

1) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

2) Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

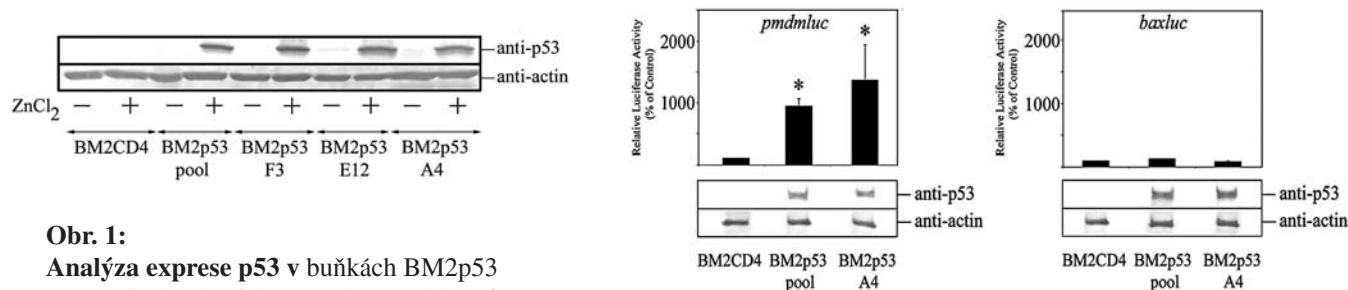
Úvod

Nádorový supresor p53 dokáže ovlivnit osud potenciálně maligních buněk tím, že buď navodí jejich smrt apoptózou, aktivuje jejich diferenciální potenciál nebo zastaví jejich proliferaci [1]. Během tvorby nádoru proto často dochází k ztrátě nebo mutaci p53. I když k inaktivaci p53 dochází u hematopoietických malignancí méně často než u solidních nádorů [2], cílená exprese p53 stimuluje diferenciaci řady leukemických buněk – např. L12-pre-B buněk, erytroleukemických buněk K562, promyelocytů HL-60, monoblastů U937 i myeloblastů M1/2 [3-8]. V této práci jsme navodili ektopickou expresi cDNA kódující lidský protein p53 v ptačích monoblastech transformovaných onkogenem *v-myb* (BM2) a vyhodnotili jeho účinek na proliferaci, diferenciaci a programovanou buněčnou smrt.

Výsledky

Inducibilní exprese cDNA kódující lidský p53 v ptačích buňkách

Kuřecí monoblasty transformované onkogenem *v-myb* (BM2) jsme transfekovali plazmidem pMT-p53-CD4. Tento plazmid obsahuje cDNA lidského genu p53 začleněnou pod kontrolou metalothioneinového promotoru. V transfekovaných buňkách lze proto navodit expresi p53 přidáním těžkých kovů, např. $ZnCl_2$. Izolovali jsme 16 nezávislých klonů buněk BM2p53, které cízородou cDNA stabilně začlenily do svého genomu. Inducibilní expresi p53 jsme v těchto buňkách stimulovanými ionty zinku ověřili SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou následovanou westernovým přenosem (obr. 1). Jako negativní kontrolu jsme použili derivát buněk BM2, které byly stabilně transfekovány vektorem pMT-IRES-CD4 postrádajícím sekvenci p53 (BM2CD4) [9].



Obr. 1:

Analýza exprese p53 v buňkách BM2p53

SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a westernovým přenosem

Obr. 2: Lidský p53 transaktivuje expresi reportérského genu z promotoru genu *mdm-2*, ale ne genu *bax* v buňkách BM2p53. Buňky byly přechodně transfekovány luciferázovými reportéřskými plazmidy elektroporací. Relativní luciferázová aktivita nalezená v buněčných extraktech byla normalizována podle účinnosti transfekce. Hladina proteinu p53 v transfekovaných buňkách byla kontrolována SDS-polyakrylamidovou elektroforézou a westernovým přenosem.

Lidský protein p53 aktivuje transkripci z promotoru genu *mdm-2* v ptačích buňkách

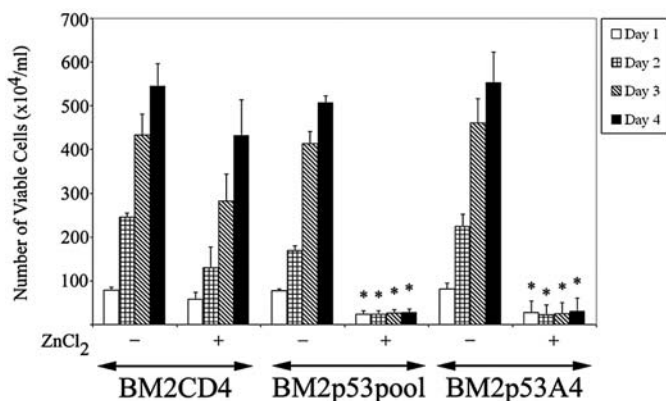
Abychom ověřili, že lidský p53 funguje v ptačích buňkách, otestovali jsme jeho transkripčně aktivační schopnost v přechodně transfekovaných buňkách BM2p53 s využitím reportéřských systémů *pmdmluc* a *baxluc* [10,11]. Míra aktivity luciferázy v extraktech buněk BM2p53 transfekovaných plazmidem *pmdmluc* byla významně vyšší než v extraktech kontrolních buněk BM2CD4 a buněk BM2p53 transfekovaných plazmidem *baxluc* (obr. 2). Tyto výsledky naznačují, že lidský p53 transaktivuje expresi genu *mdm-2*, ale ne *bax* v ptačích buňkách BM2p53.

Lidský p53 zastavuje růst ptačích buněk ve fázi G2 buněčného cyklu

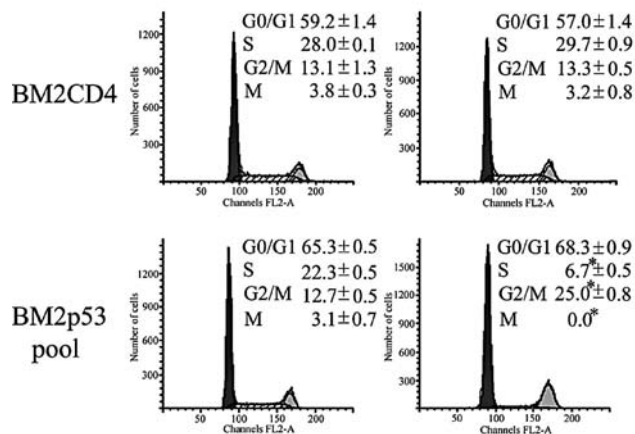
Průběh růstových křivek zřetelně ukázal, že proliferace buněk BM2p53 je zpomalena ve srovnání s buňkami BM2CD4 (obr. 3). Tento protirůstový účinek p53 jsme ověřili analýzou buněčného cyklu. Buňky BM2CD4 a BM2p53 jsme vystavili 48-hodinovému působení iontů zinku. Následně byly buňky fixovány, obarveny propidium jodidem a stanoven obsah jejich DNA průtokovou cytometrií. Frekvence buněk v S-fázi se snížila z 22.3% u neovlivněných buněk BM2p53 a 29.7% u buněk BM2CD4 ovlivněných $ZnCl_2$ na 6.7% u zinkem ovlivněných buněk BM2p53 cells. Deficit buněk BM2p53 v S-fázi byl kompenzován nárůstem počtu buněk ve fázi G2/M (obr. 4). Analýzou frekvence mitóz v jednotlivých vzorcích jsme neprokázali vliv p53 na M-fázi. Z těchto výsledků vyvozujeme, že lidský p53 zastavuje růst buněk BM2p53 ve fázi G2 buněčného cyklu.

Lidský protein p53 neovlivňuje programovanou buněčnou smrt ptačích buněk BM2p53

Abychom zjistili, zda exogenní p53 dokáže vyvolat apoptózu buněk BM2p53, vystavili jsme je působení iontů zinku po dobu 6 hodin. Následně jsme měřili míru přítomnosti fosfatidylserinu (PS) na buněčném povrchu průtokovou cytometrií s využitím anexinu V. Frekvence anexin-pozitivních buněk BM2p53 ovlivněných zinkem byla stejná jako frekvence anexin-pozitivních buněk BM2CD4 cells ovlivněných zinkem (1.3%) a žádnou významnou odlišnost jsme nezaznamenali rovněž u kontrolních buněk BM2CD4 (2.3%) a BM2p53 (0.9%) kultivovaných za nepřítomnosti zinku. Pouze u pozitivní kontroly, tj. buněk BM2CD4 ovlivněných induktorem apoptózy se frekvence anexin-pozitivních buněk významně zvýšila (10.6%). Ani dalšími testy se nám v nich nepodařilo prokázat znaky apoptózy, jako tvorbu apoptotických tělísek nebo fragmentaci DNA v buňkách BM2p53. Tyto výsledky ukazují, že exprese p53 nepostačuje pro iniciaci apoptózy buněk BM2p53, což koreluje s nedostatečnou schopností lidského p53 aktivovat transkripci z promotoru pro-apoptotického genu *bax* v buňkách BM2p53 (obr. 2).



Obr. 3: p53 zastavuje proliferaci buněk BM2. Buňky byly kultivovány za přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti ZnCl₂ (-) 4 dny. Počet živých buněk byl stanoven denně pomocí hemocytometru a barvení eosinem.



Obr. 4: p53 zastavuje proliferaci buněk BM2 ve fázi G2 buněčného cyklu. Po dvoudenní kultivaci byly buňky fixovány, obarveny propidium jodidem a analyzovány průtokovou cytometrií. Frekvence buněk v M fázi byla vyhodnocena mikroskopickou analýzou alespoň 400 cytocentrifugovaných a obarvených buněk.

Lidský p53 indukuje diferenciaci ptačích monoblastů BM2

Vliv lidského p53 na řízení diferenciaci monoblastů BM2 jsme zloumali několika přístupy: analýzou morfologie buněk světelnou mikroskopií, měřením aktivity nescifických esteráz a myeloperoxidáz, sledováním fagocytické aktivity, stanovením relativní exprese diferenciacního markeru CD11b a měřením nitro-buněčného pH. Všechny tyto parametry prokázaly, že exogenní p53 indukuje monocytickou diferenciaci ptačích monoblastů.

Závěr

Nádorový supresor p53 dokáže ovlivňovat buněčný cyklus, programovanou buněčnou smrt a diferenciacní stav mnoha buněčných typů. Ektopická exprese p53 úspěšně obnovila schopnost buněk zpomalit buněčný cyklus, diferencovat se nebo odumřít apoptózou u mnoha leukemických buněčných linií. V této práci jsme exprimovali lidský protein p53 v kuřecích monoblastech transformovaných onkogenem *v-myb*. Zjistili jsme, že i tento protein, jehož sekvence aminokyselin je pouze z 53% homologní se svým ptačím protějškem, může podstatně změnit morfologii a fyziologii těchto buněk. Lidský p53 zastavil proliferaci ptačích monoblastů ve fázi G2 buněčného cyklu a indukoval jejich monocytickou diferenciaci. Naše výsledky proto dokazují, že mezidruhové rozdíly ve struktuře molekul p53, promotorů/enhancerů a kofaktorů v ptačích a lidských buňkách jsou kompatibilní s funkcemi p53, které řídí buněčný cyklus a diferenciacní procesy. Nádorový supresor p53 úspěšně zajistil tyto své funkce i za přítomnosti aktivního onkoproteinu *v-Myb*. Další z funkcí p53, tj. schopnost navodit apoptózu, jsme však v monoblastech BM2 neprokázali. Z toho vyplývá, že signální dráhy řízené p53, které ovlivňují programovanou buněčnou smrt a procesy diferenciaci/proliferace jsou vzájemně nezávislé.

Tato práce byla podporována grantem 301/06/0036 GAČR a výzkumným záměrem MSM 0021622415 MŠMT.

Citace

- Levine, A.J. (1997) Cell 88: 323-331.
- Shiohara, M. et al (1994) Blood 84: 3781-3784.

SIGNÁLNÍ MECHANISMY V PATOFYZIOLOGII NÁDORŮ

3. Banerjee, D. et al. (1995) Cell Growth Differ 6: 1405-1413.
4. Chylicky, K., et al. (2000) Cell Growth Differ 11: 561-571.
5. Feinstein, E. et al. (1992) Oncogene 7: 1853-1857.
6. Johnson, P. et al. (1993) Mol Cell Biol 13: 1456-1463.
7. Matas, D. et al. (2004) Cell Growth Differ 11: 458-467.
8. Shaulsky, G. et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 8982-8986.
9. Smarda, J. et al. (1993) Gene 137: 145-149.
10. Friedlander, P. et al. (1996) Mol Cell Biol 16: 4961-4971.
11. Zauberman, A. et al (1993) EMBO J 12: 2799-2808.