

243 Hladiny proteinů STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony v buňkách maligního melanomu.

Adámková L., Boudný V., Součková K., Lauerová L., Sekaninová R., Hošková A., Poláková H., Kovařík J.
Laboratoř buněčných regulací, Masarykův onkologický ústav, Brno

Signální dráha JAK/STAT (Janusovy tyrozinproteinkinázy/ přenašeče signálu a aktivátory transkripce – signal transducers and activators of transcription) je jednou z klíčových signálních kaskád, které zprostředkovávají přenos signálů indukovaných extracelulárními ligandy (např. cytokiny a růstové faktory) z buněčného povrchu do jádra. Odpovědí na externí stimulaci je modulace na ligandech závislých genetických programů, které hrají důležitou roli v základních fyziologických procesech jako jsou například diferenciaci, proliferaci, apoptózu a angiogenezi. Analýza signální dráhy JAK/STAT provedená u širokého spektra primárních nádorů a stabilizovaných buněčných linií odvozených z těchto nádorů naznačuje, že tato dráha může být u maligních buněk často narušena a to na mnoha úrovních. Také již bylo zjištěno, že abnormální signalizace zprostředkovaná JAK/STAT dráhou může ovlivnit vnímavost nádorové buňky na imunoterapeutickou léčbu. Velká pozornost je rovněž věnována negativním regulátorům signální dráhy JAK/STAT. Asi největší a nejdůležitější skupinou inhibitorů jsou supresory cytokinové signalizace (Suppressors of cytokine signaling, SOCS), dalšími negativními regulátory jsou fosfatázy (Protein Tyrosine Phosphatases, PTP) a proteinové inhibitory aktivovaných STATů (Protein Inhibitors of Activated STATs, PIAS).

Intenzivní výzkum na poli signalizace zprostředkované proteiny STAT/SOCS vede stále častěji k závěru, že nesprávná funkce těchto proteinů může mít dramatický dopad na základní procesy probíhající v buňce. Přibývají rovněž důkazy, že patologický přenos signálu nebo pozměněná míra exprese genů STAT/SOCS hraje významnou roli v biologii maligní buňky a v její vnímavosti na imunoterapii. Zvýšení či snížení konstitutivní exprese proteinů STAT, jejich aberantní aktivace (poruchy ve fosforylaci), změny ve struktuře (mutace), ale i alterace ve STAT/SOCS interakcích jsou příčinou patologie těchto signálních procesů v nádorové buňce. Kontinuální signalizace u nádorových buněk může být také způsobena zvýšenou degradací SOCS proteinů nebo umlčením SOCS genů pomocí metylace.

Námi prezentovaná studie byla zaměřena na analýzu funkčních a expresních změn STAT/SOCS proteinů v souvislosti s aktivací této signální kaskády pomocí interferonů u buněk lidského maligního melanomu. Dosud je k dispozici jen málo studií, které podávají informaci o roli signalizace STAT/SOCS v souvislosti s exogenní interferonovou (IFN) léčbou. Některé výsledky však naznačují, že například abnormální hladina proteinu STAT 1 nebo jeho aberantní aktivace pozitivně koreluje se sníženou odpovídavostí nádorových buněk na inhibiční účinek IFN- α .

Ke srovnání indukce SOCS 3 interferony alfa a gama na úrovni proteinu jsme využili 7 primárních buněčných kultur odvozených z metastatických lymfatických uzlin pacientů nemocných melanomem a 2 lidské nenádorové kultury (kožní melanocyty). Exprese proteinu SOCS 3 byla stanovena přímým imunoblotem za použití komerční polyklonální protilátky proti SOCS 3. V primokulturách derivovaných z melanomových pacientů byl SOCS 3 indukován IFN gama u většího počtu vzorků (86%) než po IFN alfa (14%). Nemaligní melanocytové buňky vykazovaly prakticky obdobné výsledky jako jejich nádorové protějšky. Dále jsme použili sbírku 18 stabilizovaných maligních melanomových buněčných linií. SOCS 3 byl indukován IFN gama v 83% případech, indukce po IFN alfa byla zaznamenána na úrovni proteinu v 11%. Závěrem lze říci, že IFN gama indukuje SOCS 3 v mnohem větší míře než IFN alfa, a že jsme dosáhli obdobných výsledků jak na souboru 7 primokultur melanomových pacientů tak i na sbírce 18 stabilizovaných melanomových linií.

Exprese proteinu STAT 1 byla vyhodnocena pomocí nepřímého Western blotu s využitím imunoprecipitace a specifických protilátek proti STAT 1. Analýza celkové hladiny STAT 1 u stabilizovaných buněčných linií maligního melanomu i primokultur odvozených z pacientů nemocných melanomem ukázala, že krátkodobá inkubace buněk s oběma interferony nevede ke kvantitativním změnám tohoto proteinu. Nebyl tedy pozorován nijak výrazný rozdíl v intenzitě signálu STAT 1 mezi neovlivněnými a IFN ovlivněnými buňkami.

U všech 7 melanomových pacientů byla pozorována nulová konstitutivní hladina PY701 a vždy poměrně vysoká hladina PS727 STAT 1. U skupiny stabilizovaných melanomových linií jsme detekovali velmi nízkou nebo dokonce nulovou bazální hladinu odpovídající PY701 a relativně vysokou hladinu PS727 STAT 1.

Po použití IFN gama došlo u primokultur ustavených z melanomových pacientů k indukci PY701 STAT 1 u 86% případů, zatímco k fosforylaci S727 docházelo pouze u 29% pacientů. Tyto kultury rovněž odpovídaly silněji na přídavek IFN gama v porovnání s IFN alfa i v případě fosforylace S727. Zvýšení fosforylace na Y701 STAT 1 bylo pozorováno u 78% (IFN alfa), resp. u 89% (IFN gama) stabilizovaných melanomových linií. U jedné melanomové linie jsme nezaznamenali zvýšení fosforylace dokonce ani na jednom z aminokyselinových zbytků. Pro oba nádorové modely platilo, že IFN gama je rozhodně silnějším aktivátorem proteinu STAT 1 než IFN alfa. U dvou primokultur normálních nemaligních buněk (kožních melanocytů) jsme zjistili obdobné fosforylační změny jako u buněk nádorových. Je zajímavé, že kontrolní melanocyty reagovaly zvýšením fosforylace obou konzervovaných aminokyselinových zbytků STAT 1 po přidavku IFN alfa, zatímco po inkubaci s IFN gama došlo ke zvýšení úrovně fosforylace pouze na Y701.

Analýza fosforylačních změn proteinu STAT 1 u stabilizovaných melanomových linií, nikoliv však u metastatických primokultur ustavených z melanomových pacientů, odhalila určité rozdíly v odpovědi na interferonové signály mezi normálními a maligními buňkami i mezi stabilizovanými nádorovými liniemi navzájem. U nádorových buněk se může jednat o patologické změny

související s poruchami ve STAT 1 dependentní signální dráze, takže vyšetření fosforylačního stavu STAT 1 by mohlo posloužit jako jedno z diagnostických kritérií nebo jako pomocný nástroj na výběr pacientů vhodných k imunoterapii.

Literatura

1. Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197 (2), 157-168.
2. Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285 (1-2), 1-24.
3. Kovarik, J., Boudny, V., Kocak, I., Lauerova, L., Fait, V. and Vagundova, M. (2003). Malignant melanoma associates with deficient IFN-induced STAT 1 phosphorylation. *Int J Mol Med* 12, 335-340.
4. Pansky, A., Hildebrand, P., Fasler-Kan, E., Baselgia, L., Ketterer, S., Beglinger, C. and Heim, M.H. (2000). Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha. *Int J Cancer* 85, 720-725.
5. Wong, L.H., Krauer, K.G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M.J., Hersey, P., Tam, N.D., Edmondson, S., Devenish, R.J. and Ralph, S.J. (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 272, 28779-28785.

Práce byla podporována projekty IGA MZ ČR NR/8341-3/2005, GA ČR 301/06/0912 a MZO 00209805.