

# ANALÝZA ZMĚN EXPRESE p53-SIGNÁLNÍCH GENŮ V BUŇKÁCH AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKÉMIE V ZÁVISLOSTI NA PŮSOBNÍ METHOTREXÁTU

## ANALYSIS OF CHANGES IN EXPRESSION OF p53 SIGNALING GENES IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS AFTER METHOTREXATE TREATMENT

HRSTKA R.<sup>1</sup>, MÜLLER P.<sup>1</sup>, VOJTĚŠEK B.<sup>1</sup>, NENUTIL R.<sup>2</sup>, ŠTĚRBA J.<sup>3</sup>, VALÍK D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ZÁKLADNÁ EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

<sup>2</sup>ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

<sup>3</sup>KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, DĚTSKÁ NEMOCNICE, ČERNOPOLNÍ 9, BRNO

<sup>4</sup>ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

**Souhrn: Úvod:** Mechanismy buněčné odpovědi na inhibici DNA syntézy methotrexátem zůstávají stále do jisté míry ne zcela objasněné. V této práci ukazujeme, že při chemoterapii naivních lymfoblastů izolovaných z kostní dřeně od pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií kultivovaných ex vivo s methotrexátem dochází ke změnám hladiny proteinu p53 i exprese některých genů p53 regulujících i regulovaných. **Metody:** Sledovali jsme indukci proteinu p53 a p53 signálních genů po 24 h ex vivo inkubací s methotrexátem u naivních lymfoblastů izolovaných z kostní dřeně. U čtyř pacientů byla provedena imunocytochemická analýza p53 a pomocí cDNA GEArray membrán (www.superarray.com) byly stanoveny změny v expresi genů, které jsou součástí p53 signálních drah. **Výsledky:** Ex vivo experimenty byly prováděny v bezfolátovém mediu, k němuž byl přidán 5-methyltetrahydrofolát na konečnou koncentraci 25 nmol/l, s cílem paralelizovat podmínky lidské plasy. Celkově bylo zjištěno mírné utlumení transkripční aktivity u ex vivo kultivovaných lymfoblastů po podání methotrexátu. U všech čtyř pacientů, u nichž byla imunocytochemicky pozorovatelná p53 indukce, docházelo prokazatelně ke snížení exprese některých genů uplatňujících se při regulaci buněčného cyklu jako jsou CDC2 (cdk1), SP1, NDRG. Naopak v expresi genů apoptotických drah nebyly detekovány žádné signifikantní změny. V případě genů APEX (Ref-1) a ARF (p16<sup>ink4</sup>), jejichž produkty se uplatňují při interakcích s p53, případně ovlivňují jeho expresi a stabilitu, byly po přidavku methotrexátu rovněž detekovány signifikantní změny v expresi. Z genů, jejichž produkty mají schopnost modifikovat p53, bylo prokázáno snížení exprese po působení methotrexátu, případně roskovitinu, především u genu SIRT1. U dvou pacientů (B-ALL) pak docházelo oproti kontrole k výraznému snížení exprese genu ATM, významného transkripčního faktoru negativně regulujícího buněčný cyklus. Dále byly u všech pacientů zaznamenány inter-individuální změny v expresi genů CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 a JNKK2. **Závěr:** Naše výsledky naznačují, že hladina exprese genů se při srovnání B a T typu malignity, i v rámci jednoho typu nemusí přesně shodovat při jinak stejné léčbě za identických podmínek. Determinace změn v expresi p53 signálních genů a indukce samotného proteinu p53 může být důležitou pomůckou při stanovení individuální míry „funkční“ odpovědi na „high-dose“ terapii methotrexátem. Tyto předběžné výsledky by kromě tradičně známého inhibičního vlivu na DHFR měly rozšířit i současné celkové znalosti o působení methotrexátu na buněčné úrovni. Podařilo se nám identifikovat zhruba 11 genů, u kterých docházelo ke změně v expresi u všech sledovaných pacientů. Takto vytipované geny a jejich produkty budou podrobeny další funkční analýze na vhodných modelových systémech s cílem nalézt souvislost mezi expresí daných genů, jimi kódovaných proteinů, typem onemocnění a mechanismem účinku cytostatika.

**Klíčová slova:** p53, genová exprese, methotrexát, akutní lymfoblastická leukémie

**Abstract: Background:** Cellular events occurring downstream from the inhibition of DNA synthesis by methotrexate have remained largely unexplored. Here, we show that chemotherapy-naive lymphoblasts isolated from bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia cultivated ex vivo with methotrexate resulted in changes in expression of the p53 protein and in upregulation of several p53-regulating genes. **Methods:** We investigated induction of p53 protein and p53-dependent genes after 24 hour ex vivo incubation with methotrexate in chemotherapy-naive, bone marrow lymphoblasts taken prior to any therapy. To date, we completed immunocytochemical analysis of p53 and determined changes in expression of genes involved in p53-dependent biological pathways in four patients using cellular pathway-oriented GEArray membranes (www.superarray.com) enabling analysis of 112 transcripts. **Results:** Ex vivo experiments were performed with folate-free medium to which 5-methyl tetrahydrofolate was added to the concentration 25 nmol/l to parallel serum conditions. GEArray experiments showed overall decrease of mRNA expression in ex vivo cultivated lymphoblasts after methotrexate treatment. In the fourth patient, also with immunocytochemically observable p53 induction, we observed decrease of expression of several cell cycle-regulating genes such as CDC2 (cdk1), SP1, NDRG (n-myc downstream regulated gene) whereas apoptosis-related genes did not change their expression levels. The APEX (Ref-1) and ARF (p16<sup>ink4</sup>), the p53-upstream signaling genes encoding proteins involved in p53 interactions showed variable expression. Genes encoding transcription regulators ATM (2 patients with B-ALL) and SIRT1 (4 patients) participating in p53 interactions showed significant decrease of their expression. Interindividual differences were also observed in genes involved in p53 pathways such as CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 and JNKK2 gene. **Conclusions:** We have observed variable induction of p53 and expression of p53-controlled genes. This result may imply that a disorder – though classified as B- or T- type malignancy – may not respond identically to otherwise identical treatment under identical conditions. We suggest that assessment of changes in expression of p53-controlled genes and p53 protein status may be a tool to determine an intraindividual rate of „functional“ response to high-dose methotrexate therapy. These preliminary results may broaden our understanding on the mechanism of methotrexate action at the cellular level going beyond the traditional DHFR inhibition effect. We succeeded in identifying about 11 genes where changes in expression were observed in all patients. Those genes and their products will be subject of additional investigations to find out connections between gene expression, their products, type of disease and mechanism of therapy response.

**Key words:** p53, gene expression, methotrexate, acute lymphoblastic leukemia

## Teoretický úvod

V leukemogenezi hrají pravděpodobně zásadní roli chromozomální přestavby, přesto proteiny exprimované jako důsledek těchto translokací nejsou obvykle dostačující k plnému rozvinutí onemocnění. Stejně jako u solidních nádorů je k plnému rozvoji maligního fenotypu krevní buňky nutných více genetických změn a k jejich vzniku může přispívat především genomová nestabilita. Pro vývoj hematologického onemocnění jsou pak nezbytné další mutace, které se vyskytnou jen u malé podskupiny jedinců (1, 2).

Antagonisté kyseliny listové byly při terapii u dětských hemoblastos poprvé použity v roce 1948 (3). Jejich zavedení do klinické praxe významně přispělo ke zlepšení prognózy u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií. Hlavním a doposud nejvíce používaným antifolátem je methotrexát (4-amino, 10-methylpterin). Methotrexát je strukturálním analogem kyseliny listové, která je esenciálním kofaktorem řady kritických reakcí v eukaryotických buňkách. Je silným inhibátorem enzymu dihydrofolátoreduktasy, který se významně podílí na regulaci homeostázy intracelulárních folátů (4, 5). Mechanismus účinku a farmakogenetika antifolátů byly v poslední době shrnuty v řadě přehledných článků (4, 6, 7). Zajímavý se jeví vztah antifolátů k plazmatickým hladinám homocysteinu (7); zdá se, že podávání antifolátů konsistentně zvyšuje hladiny plazmatického homocysteinu.

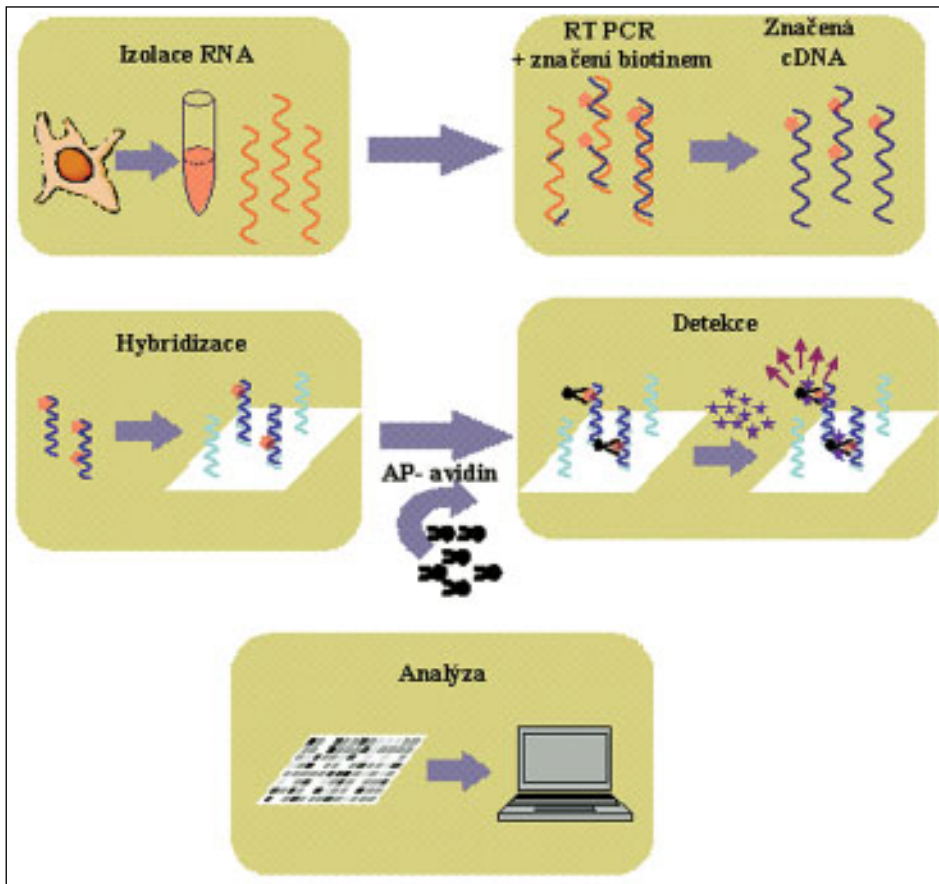
Ačkoli je o antifolátovém účinku methotrexátu známo mnoho, distální účinky folátových antagonistů na buněčné úrovni zůstávají víceméně nejasné. V rámci naší studie předpokládáme, že poškození DNA, vznikající jako následek působení antifolátu, vede podobně jako u řady dalších genotoxických vlivů k aktivaci antionkogenu p53. Jeho aktivace může dále vyústit ve dva diametrálně odlišné distální jevy – apoptózu nebo zástavu buněčného cyklu (8-12). Při terapii zhoubného onemocnění je apoptóza žádoucím konečným efektem. Naopak zástava buněčného cyklu pak může vést k vytvoření časového úseku, v němž může docházet k selekci buněčných forem resistantních na podávanou terapii.

## Materiál a metody

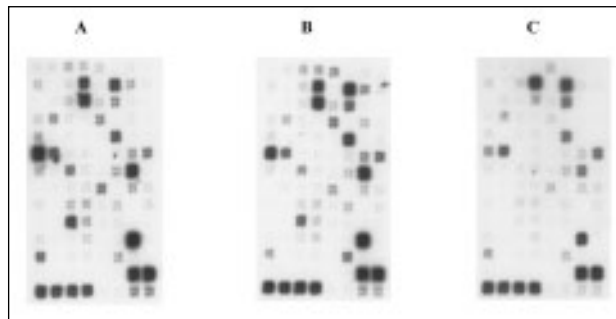
### Klinický materiál

U pacientů léčených na klinice dětské onkologie s diagnózou akutní lymfoblastické leukémie jsme z alikvoty diagnostického vzorku kostní dřeně ihned izolovali naivní maligní blasty pomocí systému Lymphoprep. Blasty byly následně převedeny do bezfolátového media, k němuž jsme přidali 5-methyltetrahydrofolát na konečnou koncentraci 25 nmol/l, abychom paralelizovali podmínky lidské plazmy. Běžná kultivační media totiž obsahují foláty, jednak v různých formách a jednak v cca tisícinásobném přebytku ve srovnání s fyziologickými podmínkami lidské plazmy. Do kultivačního media jsme přidali i) methotrexát na cílovou koncentraci 40  $\mu\text{mol/l}$ , ii) ros-

Obr. 1: Schematické znázornění cDNA GEArray metody zahrnující izolaci RNA, přípravu sond, hybridizaci, chemiluminiscenční detekci a analýzu.



Obr. 2: Ukázka dosažených výsledků u pacienta B1, kdy intenzita jednotlivých tetramerních spotů odpovídá transkripční aktivitě příslušných genů: A) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu; B) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu po přidavku methotrexátu; C) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu po přidavku roskovitinu.



kovitin v koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ , iii) DMSO jako kontrolu. Blasty jsme kultivovali po dobu 24 hod, abychom paralelizovali in vivo podmínky, za nichž je podáván methotrexát pacientům ve schématu „high-dose“ dle protokolu ALL-BFM95.

### Imunocytochemická detekce proteinu p53

Suspenze lymfocytů pro cytospin byla fixována standardním, komerčně dostupným sprejem CYTO-fixation a uchována na temném suchém místě. Před vlastním barvením byla skla promyta v 50% etanolu 30 minut a následně hydratována v destilované vodě 30 minut. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována po dobu 15 minut 3% roztokem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem na pH 7,5). Primární monoklonální protilátka DO1 [myší monoklonální protilátka

rozlišující N-koncovou oblast proteinu p53 (sekvenci aminokyselin 20-SDLWKL-25)] (13, 14) byla aplikována na buňky při teplotě 4 °C přes noc. Po trojném promytí v PBS byla nanesena anti-myši sekundární protilátka značená biotinem a ABC reagensie (Vector Elite ABC kit, Vector) přesně dle návodu a doporučení dodavatelem. Peroxidázová aktivita byla vizualizována kitem DAB+ (Dako, Denmark).

### **Analýza exprese p53 signálních genů**

Expres p53-dependentních genů byla monitorována pomocí technologie cDNA GEArray (SuperArray Bioscience Corporation) (obr. 1, 2). Na rozdíl od metody mikročipových arrays, pomocí kterých je možné analyzovat současně tisíce genů, jsou GEArray testy schopny sledovat expresi jen přibližně stovky genů, avšak jejich výraznou výhodou vzhledem k metodě „microarray“ je podstatně nižší finanční nákladnost, jednodušší technické zázemí, dobrá reprodukovatelnost a snazší vyhodnocování. Další nezanedbatelnou výhodou tohoto metodologického přístupu je možnost si pro vlastní analýzu vytipovat vhodnou skupinu genů, která se vztahuje přímo ke studované problematice. V našem provedení je tato metoda principiálně založena na přípravě cDNA práb značených biotinem, které jsou použity k hybridizaci se sondami umístěnými na membránách, jež představují specifické sekvence jednotlivých genů. Po provedení hybridizace a příslušných promývacích kroků se na biotin váže streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou a následuje detekce založená na chemiluminiscenci. Spoty představující expresi jednotlivých genů pak byly hodnoceny pomocí programu TotalLab a získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k expresi „housekeeping“ genu GAPDH kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu. Zde uvádíme přehled všech p53 -signálních genů, jejichž expres byla touto metodou analyzována.

**p53 rodina:** TP53, TP63, TP73

**p53 upstream signální geny:**

Geny ovlivňující expresi a stabilitu p53: BZRP (pBR), CREBBP (CBP), D5S346 (DP1), E2F1 (E2F), EP300 (p300), MDM2, MTBP, NFKB1, NUMB

Geny modifikující p53: ATM, ATR, CCNH (cyclin H), CDK7 (CAK), CHEK1 (Chk1), CHEK2 (Chk2), CREBBP (CBP), CSNK1A1 (CK1), CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, EP300 (p300), HIPK2, KIP2, KIP3, MAP2K4, MAP2K7, MAPK8IP2, PCAF, PML, PRKCA, PRKCB1, PRKCG, PRKCQ, PRKDC (DNA-PK), SIRT1

Geny jejichž produkty se uplatňují při p53 interakcích: APEX (Ref-1), BAP1, BRAP, BRCA1, CDKN2A (p14ARF), E1B-AP5 (E1B55K), E2F1, MDM2, MYC, RASA1 (Ras), RB1 (pRB), TEAD1 (SV40), WRN, WT1

**p53 downstream signální geny:**

Geny regulující buněčný cyklus: ABCB1 (MDR1), ACTA1 (actin), AD022, APR-3, CDC2, CDKN1A (P21Waf1), DAXX, ESR1, FADD, FAF1, GADD45A, GTSE1 (B99), HIF1A, HSPA4 (Hsp70), LRDD, MAP4, NDRG (RTP), PIG8 (E124), PMP22, RELA, REPRIMO, SFN (14-3-3), SP1, STAT5A, TBP, THRA, TNFAIP1, TNFSF6, TP53TGI, TRAF1, TRAF4, TRAF5, WIG1

Regulatory apoptózy: APAF1, BAX, BBC3 (PUMA), BCL2, CASP9 (Caspase-9), CTSD (Cathepsin D), LRDD (PIDD), P53AIP1, PMAIP1 (NOXA), PMP22 (GAS-3), TNF, TNFRSF10B (Killer5/DR5), TNFSF6 (Fas), TP53BP2 (ASPP2)

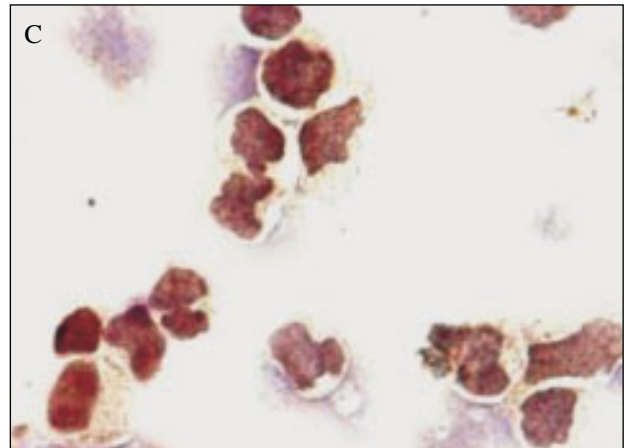
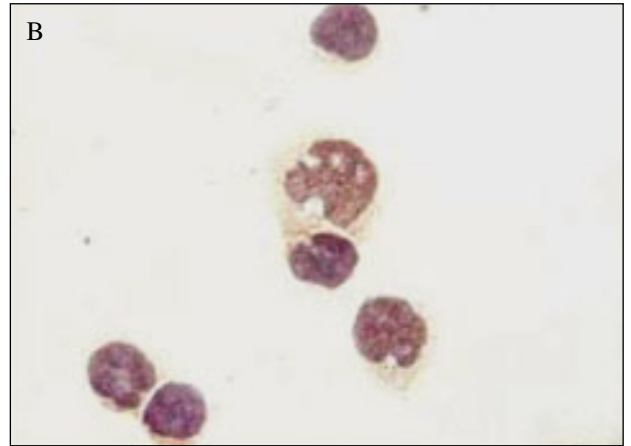
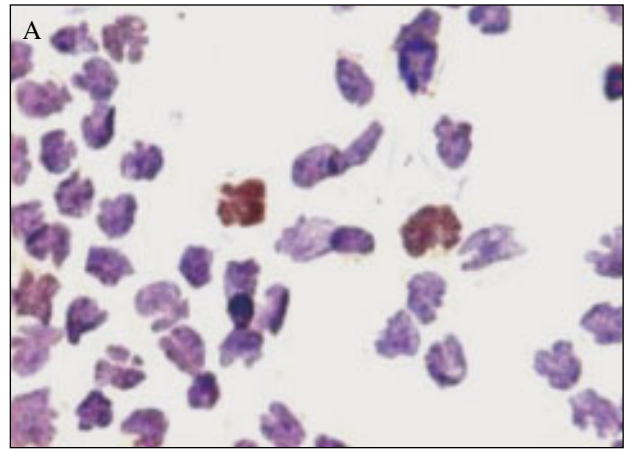
Geny podílející se na DNA opravách: GADD45A, RRM2B (p53R2)

Geny kontrolující angiogenezi a tvorbu metastáz: BAI1, SERPINB5 (Maspin), THBS1 (TSP1)

### **Výsledky a diskuse**

Kromě genů TP53, TP63 a TP73, které se souhrnně označují jako tzv. „p53 rodina“ (15), lze analyzované geny vzhledem

**Obr. 3:** Imunocytochemické stanovení ex-vivo indukce proteinu p53 v naivních blastech pomocí monoklonální protilátky DO1: A) indukce p53 před kultivací; B) indukce p53 po 24 h kultivaci v mediu; C) Indukce p53 po 24 h kultivaci v mediu po přidávku methotrexátu.



k jejich postavení vůči p53 rozdělit do dvou skupin, a to na geny p53 regulující (p53 upstream signal/p53 modifiers) a geny p53 regulované (p53 downstream signal/p53 effectors). Expres p53 signálních genů byla monitorována u 3 pacientů (pracovně označených B1 - B3) s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu B (B-ALL) a jednoho pacienta (pracovně označeného jako T) s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu T (T-ALL). U těchto 4 pacientů jsme primárně provedli imunocytochemické barvení a imunochemickou detekci proteinu p53 a zjistili jsme různou úroveň exprese. Příklad imunocytochemické detekce proteinu p53 je uveden na

**Tab.1:** Expres vybraných p53 signálních genů u jednotlivých pacientů. Vlastní exprese daných genů je vyjádřena v procentech vzhledem k expresi „housekeeping“ genu GAPDH. <sup>1</sup>Expres genů u naivních blastů po 24 h kultivaci pouze v mediu, <sup>2</sup>expres genů u naivních blastů po přidavku methotrexátu, <sup>3</sup>expres genů u naivních blastů po přidavku roskovitinu.

Status p53	Unigene ID	GeneBank number	Gen	Pacient B1			Pacient B2			Pacient B3			Pacient T		
				K <sup>1</sup>	Me <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	K	Me	R	K	M	R	K	Me	R
Apoptóza	Hs.87246	NM_014417	<b>BBC3</b>	118	128	82	523	100	184	514	194	259	124	138	102
B-lyk	Hs.318567	NM_006096	<b>NDRG</b>	36	7	20	204	83	69	359	102	268	13	20	3
	Hs.334562	NM_001786	<b>CDC2</b>	21	6	2	11	9	0	83	14	0	29	3	3
	Hs.9460	NM_138473	<b>SP1</b>	25	22	6	486	46	100	314	58	61	20	17	10
Regulace p53	Hs.73722	NM_080649	<b>APEX</b>	16	43	20	80	57	78	50	28	37	32	28	9
	Hs.421349	NM_000077	<b>ARF</b>	54	92	61	378	100	218	183	155	207	33	53	42
	Hs.318381	NM_001892	<b>CSNK1A1</b>	58	30	29	0	21	68	243	83	138	34	19	3
	Hs.73527	NM_001320	<b>CSNK2B</b>	57	60	9	76	31	44	27	16	0	35	11	4
	Hs.110299	NM_145185	<b>MKK7</b>	79	75	82	370	85	143	638	141	153	48	67	36
	Hs.31176	NM_012238	<b>SIRT1</b>	114	106	6	0	10	35	226	40	72	80	12	4
	Hs.397465	NM_022740	<b>HIPK2</b>	85	93	92	113	49	101	304	126	90	59	95	62
	Hs.169476	NM_002046	<b>GAPDH</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

obr. 3. V první fázi jsme ověřovali, zda exprese sledovaných genů není ovlivněna kultivací naivních blastů v mediu. Zjistili jsme, že obecně při kultivaci v proklamovaných podmínkách dochází ke statisticky významným změnám v expresi pouze několika genů.

Při sledování exprese všech studovaných genů u pacienta označeného T jsme zaznamenali po podání methotrexátu resp. roskovitinu výrazné snížení celkové exprese. Při analýze významných změn u jednotlivých genů převažoval trend snižování genové exprese po podání výše uvedených látek. U řady genů se pak exprese nezměnila, avšak je třeba zmínit dvojici genů, u kterých naprosto neočekávaně docházelo v porovnání s ostatními geny ke zvýšení exprese. Jedná se o gen BBC3 – kódující protein Puma uplatňující se při p53-regulované apoptóze, kdy vazbou na Bcl2 umožňuje uvolňování cytochromu c z mitochondrií (16). Druhým silně exprimovaným genem je BAP1 – jedná se o BRCA1 asociovaný protein uplatňující se především při negativní regulaci buněčné proliferace (17). U 4 genů pak byla zjištěna zvýšená transkripční aktivita: ARF, HIPK2, ASPP2, WIG1. Oproti kontrolním lymfoblastům došlo u 3 genů ke zvýšení exprese po přidání methotrexátu a naopak ke snížení exprese po přidavku roskovitinu (JNKK2, FAF1 a TP63). U všech 3 pacientů s B-ALL, stejně jako u pacienta T-ALL byla prokázána výrazně silná exprese genu BBC3, která se ovšem zásadně neměnila ani po přidavku methotrexátu resp. roskovitinu.

Při porovnání zastoupení jednotlivých genů a typu změn v jejich expresi se ukázalo, že jednotliví pacienti se mezi sebou lišili, a to jak kvalitativně v genech, u nichž byla prokázána exprese, tak i kvantitativně v hladině exprese po podání methotrexátu nebo roskovitinu. Předpokládáme, že tento jev je způsoben jednak genetickým pozadím analyzovaných jedinců a především pak charakterem buněčné odpovědi na inhibici cílového enzymu dihydrofolátreduktázy. Existuje totiž celá řada více či méně složitých mechanismů, které se podílejí na udržení homeostázy v metabolismu folátů (5). Řada s tímto spojených procesů vykazuje poměrně velkou míru inter-individuální variability a tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory.

Hlavním cílem naší studie bylo vytipovat geny, jejichž exprese vykazuje společné rysy a mohly by tedy představovat kandidátní geny pro potencionální markery vhodné pro sledování vývoje onemocnění a hlavně odpovědi na terapii. Zaměřili jsme se na hledání těch genů, u nichž docházelo po dávce cytostatika ke změnám exprese u všech pacientů (tab. 1). Z p53 dependentních genů uplatňujících se při regulaci apoptózy nebyl s výjimkou silně exprimovaného genu BBC3 nalezen žádný gen, jehož exprese by byla u všech pacientů obdobná. Oproti tomu se zdá, že geny buněčného cyklu by mohly hrát

mnohem významnější roli, kdy v porovnání s blasty kultivovanými pouze v mediu (s definovanou koncentrací folátu ve formě 5-methyltetrahydrofolátu) prokazatelně u všech pacientů B-ALL docházelo ke změnám v expresi genů CDK1, NDRG a SP1 po působení jak methotrexátu, tak i roskovitinu. Zajímavé poznatky byly získány i při sledování exprese genů, které se uplatňují při interakcích s p53, popřípadě ovlivňují jeho expresi a stabilitu. U genů APEX (Ref-1) a ARF (p16<sup>ink4</sup>) docházelo po přidavku methotrexátu k signifikantní změně exprese, dále pak v případě 2 B-ALL pacientů docházelo po působení methotrexátu ke snížení exprese u genu GAP, který má funkci jako aktivátor p21<sup>RAS</sup>, jenž se uplatňuje při regulaci buněčné proliferace a diferenciace (18). Zbývající, neméně důležitou skupinou, jsou geny, jejichž produkty mají schopnost modifikovat p53. Z těchto genů byla prokazatelně snižovaná exprese po působení methotrexátu, případně roskovitinu, zaznamenána u SIRT1, který se podílí na deacetylaci proteinu p53, čímž ovlivňuje jeho transkripční aktivitu (19). U dvou pacientů (B2 a B3) pak docházelo oproti kontrole k výraznému snížení exprese genu ATM, jehož produkt je významným členem rodiny fosfatidylinositol-3 kináz. Tato kináza má schopnost specificky fosforylovat protein p53 s cílem ho aktivovat a stabilizovat v rámci odpovědi na poškození DNA (20). Dále byly u všech tří pacientů s B-ALL zaznamenány změny v expresi genů CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 a JNKK2.

## Závěry

Pomocí cDNA GEArray byly porovnány expresní profily maligních naivních blastů u jednotlivých pacientů po inkubaci s methotrexátem a/nebo roskovitinem, neboť stanovení změn v expresi p53 signálních genů může pomoci při stanovení míry intra-individuální odpovědi na high-dose terapii methotrexátem. Tyto předběžné výsledky by kromě tradičně známého inhibičního vlivu na DHFR měly rozšířit současné celkové znalosti o působení methotrexátu na buněčné úrovni. Podářilo se nám identifikovat celkem asi 11 genů, u kterých docházelo ke změně v expresi u všech sledovaných pacientů. V případě, že bude docházet k expresi těchto genů i u dalších pacientů, mohou sloužit jako potenciální markery onemocnění. Takto vytipované geny a jejich produkty budou podrobeny další funkční analýze na vhodných modelových systémech s cílem nalézt souvislost mezi expresí daných genů, jimi kódovaných proteinů, typem onemocnění a mechanismem účinku cytostatika. Získané výsledky by se pak mohly stát podkladem pro cílenou terapii.

*Práce byla podporována grantovými projekty IGA MZ ČR NC7104-3, NC7131-3 a MZO 00209805.*

## Literatura

1. Hunger S. P. and Cleary M. L.: What significance should we attribute to the detection of MLL fusion transcripts? *Blood* 1998; 92(3):709-11.
2. Falini B. and Mason D. Y.: Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002; 99(2):409-26.
3. Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D. and al. e.: Temporary remission of acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* 1948; 238(787-93).
4. Kraljinovic M. and Moghrabi A.: Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics* 2004; 5(7):819-34.
5. Demlová R., Radina M., Sterba J. and Valík D.: Folate: fyziologie, metabolismu a mechanismu resistance na jejich antagonisty. *Klinická onkologie* 2004; 17(6):185-89.
6. Zhao R. and Goldman I. D.: Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003; 22(47):7431-57.
7. Valík D., Radina M., Sterba J. and Vojtesek B.: Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2004; 5(8):1151-62.
8. Lane D. P.: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6.
9. Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A. and Jacks T.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362(6423):847-9.
10. Lowe S. W., Ruley H. E., Jacks T. and Housman D. E.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74(6):957-67.
11. Nelson W. G. and Kastan M. B.: DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14(3):1815-23.
12. Graeber T. G., Osmanian C., Jacks T., Housman D. E., Koch C. J., Lowe S. W. and Giaccia A. J.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379(6560):88-91.
13. Vojtesek B., Bartek J., Midgley C. A. and Lane D. P.: An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992; 151(1-2):237-44.
14. Stephen C. W., Helminen P. and Lane D. P.: Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* 1995; 248(1):58-78.
15. Ceskova P., Valík D. and Vojtesek B.: What we currently know about the structure and function of the p53 homologue - p73 protein: facts, hypotheses and expectations. *Folia Biol (Praha)* 2003; 49(1):1-8.
16. Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W. and Vogelstein B.: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7(3):673-82.
17. Jensen D. E., Proctor M., Marquis S. T., Gardner H. P., Ha S. I., Chodosh L. A., Ishov A. M., Tommerup N., Vissing H., Sekido Y., Minna J., Borodovsky A., Schultz D. C., Wilkinson K. D., Maul G. G., Barlev N., Berger S. L., Prendergast G. C. and Rauscher F. J., 3rd: BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 1998; 16(9):1097-112.
18. Friedman E., Gejman P. V., Martin G. A. and McCormick F.: Nonsense mutations in the C-terminal SH2 region of the GTPase activating protein (GAP) gene in human tumours. *Nat Genet* 1993; 5(3):242-7.
19. Vaziri H., Dessain S. K., Ng Eaton E., Imai S. I., Frye R. A., Pandita T. K., Guarente L. and Weinberg R. A.: hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001; 107(2):149-59.
20. Khanna K. K., Keating K. E., Kozlov S., Scott S., Gatei M., Hobson K., Taya Y., Gabrielli B., Chan D., Lees-Miller S. P. and Lavin M. F.: ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 1998; 20(4):398-400.