

MELANOMOVÉ FRAGMENTY A JEJICH KRATKODOBA KULTIVACE JAKO NASTROJ PRO SLEDOVÁNÍ ODEZVY NA CYTOTOXICKÉ LÁTKY S ROZDILNÝM MECHANISMEM ÚČINKU

SHORT-TERM CULTIVATION OF MELANOMA FRAGMENTS AS A TOOL FOR TESTING THEIR RESPONSE TO CYTOTOXIC COMPOUNDS WITH DIFFERENT MODES OF ACTION

ULDRÍJAN S.¹, NENUTIL R.², FAIT V.³, KOTALA V.¹, REJTHAR A.⁴, VOJTIŠEK B.^{1*}

¹ ODDÍLENÍ BUNĚNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE, MASARYKUV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, 656 53 BRNO

² ODDÍLENÍ PATOLOGIE, FN-BRNO, PRACOVÍŠTI PORODNICE, OBILNÍ TRH 11, 656 17 BRNO

³ ODDÍLENÍ CHIRURGIE, MASARYKUV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, 656 53 BRNO

⁴ BIOPTICKÁ STANICE, FN-BRNO, PRACOVÍŠTI BOHUNICE, JIHLAVSKA 20, 639 00 BRNO

Souhrn: Úvod: Antionkogen p53 je transkripční faktor jehož aktivita je vyžadována pro regulaci buněčné odpovědi na stres a poškození DNA. U většiny sporadických lidských nádorů je protein p53 inaktivován bodovými mutacemi, čímž dochází k narušení jeho schopnosti zastavit buněčný cyklus nebo navodit apoptózu v závislosti na vyvolaném poškození DNA. Existuje skupina nádorů exprimujících nemutovanou formu proteinu p53, které však přesto nejsou schopny zastavení buněčného cyklu ani navození apoptózy po vyvolání poškození DNA. Do této skupiny patří melanomy, které jsou zpravidla radiorezistentní a málo odpovídají na terapii s využitím různých druhů cytostatik. **Předmět studia:** Současné terapeutické přístupy pro léčbu pacientů s vysoce rizikovými maligními melanomy zůstávají stále neefektivní, stejně jako hledání nových účinnějších látek pro terapii. Jedním z problémů vývoje a testování takových látek je sledování jejich účinku. Cílem naší práce bylo zavedení metodiky krátkodobých kultivací melanomových fragmentů pro sledování působení látek s potenciálními protinádorovými vlastnostmi. Jako ukazatel možného protinádorového účinku studovaných látek byla zvolena indukce proteinů p53 a MDM2. **Materiál a metody:** Výše jmenované proteiny byly analyzovány pomocí imunohistochemických a imunochemických metod na 6 vzorcích maligního melanomu. **Výsledky:** Inhibitor cyklin-dependentních kináz roscovitine indukuje funkční protein p53 u většiny krátkodobě kultivovaných melanomových fragmentů, zatímco poškození DNA cis- platinou není v daném systému schopno indukci p53 vyvolat. **Závěr:** Krátkodobá kultivace nádorových fragmentů s následným kvantitativním hodnocením biochemických parametrů se jeví být vhodným nástrojem pro hlubší studium účinků cytostatik, případně i pro predikci odpovědi konkrétního nádoru na terapii.

Klíčová slova: Melanom, p53, MDM2, cytotoxický stres, poškození DNA

Abstract: Summary: The tumour suppressor protein p53 is a stress-activated transcription factor the activity of which is required for regulating cellular response to stress and DNA damage. This protein is inactivated in many sporadic human tumours by point mutations in the p53 gene, leading to disruption of its ability to function at DNA damage checkpoint. A subset of tumours expressing wild-type p53 protein exists that are not able to induce G₁-cell cycle arrest allowing DNA reparation or apoptosis in response to DNA damage. Melanoma cells are highly radioresistant, in spite of expressing wild-type p53 protein and they also do not respond to cytotoxic treatment. **Subject:** The current therapeutic protocols available for the treatment of patients with high-risk melanoma remain ineffective. Similarly, the search for new more potent agents has not been successful. The goal of our study was to employ the short term cultivation of melanoma fragments and evaluate this system for testing the response to different potential anticancer drugs. **Material and methods:** We analyzed the p53 and MDM2 proteins using immunohistochemistry and immunochemistry in melanoma fragments cultured in media with addition of roscovitine and cisplatin. **Results:** The inhibitor of cyclin-dependent protein kinases roscovitine is able to induce functional p53 protein in studied melanoma fragments in comparison with the cisplatin acting via DNA damage that is unable to induce the p53 protein. **Conclusions:** Short term cultivation of tumour fragments and evaluation of biochemical parameters show usability of this tool for studying effect of cytotoxic drugs as well as for prediction of particular tumour response to therapy.

Key words: Melanoma, p53, MDM2, cytotoxic stress, DNA damage

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR 4783-3 a výzkumným záměrem MZ ČR č. 000 65 26 97 05

Teoretický úvod

p53 je antionkogen kódující jaderný fosfoprotein o relativní molekulové hmotnosti 53 kDa, který byl poprvé identifikován díky jeho schopnosti interagovat s velkým T antigenem viru SV40 (simian virus 40; 1, 2). Dvacet let po objevení se protein p53 stal jednou z nejintenzivněji studovaných molekul v oblasti onkologického výzkumu. Bylo prokázáno, že fosfoprotein p53 je inaktivován ve více než 50 % lidských nádorů (3), a že inaktivace genu pro p53 homologní rekombinací vede u myši ke zvýšené tvorbě nádorů (4).

Důležitým bylo rovněž zjištění, že pacienti s Li-Fraumeni syndromem, který se vyznačuje vysokým výskytem nádorových onemocnění, nesou mutaci genu p53 (5).

Protein p53 je účinný inhibitor buněčného růstu, který zastavuje buněčný cyklus v několika bodech a za určitých podmínek aktivuje mechanismy vedoucí k programované smrti buněk (tzv. apoptóze) (6). Tato schopnost proteinu p53 kontrolovat buněčný růst je velmi důležitá pro jeho antionkogenní účinek. Ztráta exprese nebo inaktivace proteinu p53 podstatně zvyšuje riziko vzniku nádorů jak u myši tak i u člověka (7, 8). Velmi důležité

jsou také mechanismy kontrolující aktivitu antionkogenu p53 během normálního buněčného růstu. Je známo, že funkce proteinu p53 není nezbytně nutná pro normální růst, diferenciaci a embryonální vývoj, který může úspěšně proběhnout i v nepřítomnosti proteinu p53 (9). Naproti tomu však má nekontrolovaná aktivace proteinu p53 fatální následky pro vyvíjející se embryo, což ilustruje význam mechanismů kontrolujících aktivitu proteinu p53.

Základním mechanismem, kterým je řízena aktivita proteinu p53, je kontrola jeho stability. V normálních buňkách je protein p53 přítomen v malém množství, protože nově syntetizovaný protein je rychle degradován v proteosomách (10). Stejně jako v případě jiných regulačních proteinů degradovaných v proteosomách, dochází i u proteinu p53 k modifikaci lyzinů vazbou ubiquitinových řetězců (11). Polyubiquitinovaný protein je následně rozlišen aparátem proteosomu.

Jednou z nejdůležitějších složek degrační dráhy proteinu p53 je protein MDM2, který je produktem genu, jehož transkripce je regulována samotným proteinem p53 (12). Stejně jako u jiných cílových genů proteinu p53 se exprese MDM2 zvyšuje po aktivaci p53 různými druhy buněčného stresu. Na rozdíl od produktů jiných genů kontrolovaných p53 však v případě proteinu MDM2 nebylo prokázáno, že by tento protein zprostředkoval jakýkoli přímý efekt proteinu p53 (zastavení buněčného cyklu nebo programovanou smrt buňky) (13, 14). Hlavní úlohou proteinu MDM2 je přímá interakce s proteinem p53 a inhibice jeho aktivity. Protein MDM2 se váže k N-terminální části p53, na které se nachází trans-aktivační oblast, jejíž prostřednictvím protein p53 interaguje se základními komponentami transkripčního aparátu (15). Samotná vazba MDM2 inhibuje normální funkci této oblasti p53 a tím redukuje schopnost proteinu p53 aktivovat genovou expresi (16, 17). Výše popisovaný mechanismus však není jediným, kterým MDM2 kontroluje funkci p53. Bylo prokázáno, že protein MDM2 participuje na procesu degradace p53 (10). Kontrolní mechanismus, jímž MDM2 reguluje protein p53, je nezbytný pro normální vývoj embryí. Tuto skutečnost potvrzuje fakt, že se u myši s genem *mdm2* vyřazeným homologní rekombinací projevuje velmi časná embryonální letalita (18, 19), zatímco myši se současně vyřazenými geny *mdm2* a p53 tuto časnou letalitu nevykazují (20, 21). Význam MDM2/p53 regulační smyčky potvrzují nádorové buňky exprimující transkripčně inaktivní mutované formy proteinu p53. Tyto mutované formy ztratily antionkogenní funkci a tím i schopnost aktivovat expresi MDM2, což vede k akumulaci vysoké hladiny nefunkční formy proteinu p53 (10, 20, 21).

U velké většiny sporadických lidských nádorů je protein p53 inaktivován bodovými mutacemi, které naruší jeho schopnost zastavit buněčný cyklus nebo navodit apoptózu po poškození DNA. Existuje však skupina nádorů, které exprimují nemutovanou formu proteinu p53, ale přesto u nich nedochází k zastavení buněčného cyklu ani k indukci apoptózy po vyvolání poškození DNA. Do této skupiny patří melanomy, které jsou zpravidla radiorezistentní a špatně odpovídají na terapii různými druhy cytostatik. Tato skutečnost potvrzuje názor, že protein p53 může být udržován v nádorových buňkách v neaktivní formě prostřednictvím mutací, které postihují geny signální dráhy regulující odpověď buňky na poškození DNA. Jedním z takových genů, který signalizuje proteinu p53 přítomnost poškozené DNA, je „checkpoint“ kináza Chk2 (22). V nedávné době byla rovněž popsána dráha aktivace nemutované formy proteinu p53 nezávislá na Chk2, která způsobuje defosforylaci Ser-376 na C-konci proteinu p53 a zvýšení jeho funkční aktivity. U většiny melanomových buněčných linií je však tato dráha porušena a defosforylace Ser-376 není vyvolaným poškozením DNA spuštěna (23).

V roce 1994 byly popsány nové syntetické deriváty purinu olomoucín (2-hydroxyethylamino-6-benzylamino-9-methyl purin) a roscovitín (analog olomoucínu s několikanásobně vyšší účinností než olomoucín) (24), které fungují jako vysoce

aktivní inhibitory cyklin-dependentní kinázy CDK1 (*cdc2*) a příbuzných kináz (CDK2, CDK5, *erk1* a *erk2*) (25) tím, že kompetují o ATP vazebné místo těchto kináz (24, 26, 27). CDK a cykliny se stejně jako p53 podílejí na regulaci důležitých drah řídicích buněčnou proliferaci a apoptózu. Nejnovější studie prokázaly inhibiční účinek olomoucínu a roscovitínu na buněčnou proliferaci u celé řady nádorových buněčných linií (28, 29, 30). Většina těchto buněčných linií rovněž vykazovala známky apoptózy po účinku obou látek. Tyto látky jsou schopny indukovat nemutovanou formu p53 (31) bez současného vyvolání poškození DNA a zdají se proto být vhodnými nástroji terapie.

Současné terapeutické přístupy pro léčbu pacientů s vysoce rizikovými maligními melanomy zůstávají stále neefektivní, stejně jako metody hledání nových účinnějších látek, které by mohly být využity pro terapii (32). Jedním z problémů při vývoji a testování takových látek je sledování jejich účinku. Doposud prováděné studie využívají buněčných linií ustavených z melanomů, které však v průběhu kultivace mění své vlastnosti. Určitou alternativou pro sledování účinku látek s potenciálními protinádorovými vlastnostmi je krátkodobá kultivace melanomových fragmentů v mediu obohaceném o testované látky.

V předkládané práci jsme zavedli metodu krátkodobé kultivace melanomových fragmentů pro testování odpovědi na terapii. Jako ukazatel možného protinádorového účinku jsme zvolili indukci proteinů p53 a MDM2. Zaměřili jsme se na látky s rozdílným mechanismem aktivace p53 – jednak cestou poškození DNA, jednak cestou inaktivace cyklin-dependentních kináz.

Materiál a metody

Použité protilátky

- (a) DO-1 je monoklonální protilátka rozlišující cílový epitop na proteinu p53 (²⁰SDLWKL²⁵; 33, 34)
- (b) SMP-14 je monoklonální protilátka rozlišující protein MDM2 (15)
- (c) MIB1 je monoklonální protilátka rozlišující protein Ki67 (Immunotech)
- (d) PC10 je monoklonální protilátka rozlišující protein PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (35)

Melanomové fragmenty a jejich krátkodobé kultivace

Melanomová tkáň byla získána z diagnostických excizi a zpracována do 15 minut přenesením malých fragmentů (2mm x 2mm x 2mm) do média (Nutrient mix F-10 with L-glutamine, GIBCO BRL), do kterého byly přidány sledované látky (cisplatina (40 μM) a roscovitín (20 μM), DMSO jako kontrola, případně olomoucín (40 μM). Kultivace probíhala po dobu 6 hodin při teplotě 37 °C a pětiprocentní koncentraci CO₂ v atmosféře.

Histologický materiál

Nádorové vzorky byly po ukončení kultivace fixovány 4% pufovaným formaldehydem po dobu přibližně 24 hodin a běžně zpracovány zalitím do parafinu. Byly z nich připraveny kontrolní řezy barvené hematoxylin-eosinem a dále řezy pro imunohistologii.

Imunohistochemická detekce sledovaných proteinů

Rutině připravené vzorky v parafinových blocích byly nakrájeny a přeneseny na silanizovaná skla, řezy odparafinovány a rehydratovány. Odmaskování antigenních epitopů bylo provedeno povařením vzorků po dobu 40 minut při 97 °C v předehřátém 0.01M citrátovém pufru pH 6,0 ve vodní lázni. Po promytí v destilované vodě byly z důvodu zablokování endogenní peroxidázy řezy přeneseny na dobu 20 minut do 3% roztoku H₂O₂ v PBS (fyziologický roztok, pufovaný fosfátem na pH 7,4). Nespecifická vazebná aktivita byla zablokována převrstvením řezů roztokem 5% nízkotučného mléka s 0.01% Tween 20 v TBS (fyziologický roztok pufovaný Tris na pH 7,6).

Takto zablokované řezy byly osušeny, a byly na ně na jednu hodinu při pokojové teplotě aplikovány monoklonální protilátky (DO-1, 0,5 µg/ml, SMP14 1 µg/ml, MIB1 1 µg/ml) ředěné v TBS s 1% obsahem BSA (bovinního sérového albuminu). Po trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS byla na 30 minut nanášena anti-myší sekundární protilátka značená biotinem (Amersham) ředěná 1:200 v roztoku 1% BSA v TBS. Po opakovaném trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS byl na dobu 30 minut aplikován avidin-peroxidázový komplex (Vector-Elite). Peroxidáza byla pak následně detekována pomocí DAB (diaminobenzidin) – použit kit DAB+ (DAKO) podle návodu výrobce. Řezy byly dobarveny hematoxylinem, dehydratovány, průjasněny a zamontovány pro mikroskopické zhodnocení. Všechny vzorky byly zpracovány pro sledovanou protilátku vždy v jednom běhu barvení, s jednotnými časy a ředěním chemikálií. Procenta pozitivních buněk byla počítána vždy v 10 zorných polích při 40násobném zvětšení, počínaje zorným polem s nejvyšší pozitivitou nalezenou v řezu.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a imunobloting

Melanomové biopsie byly lyzovány v NP40 lyzačním roztoku (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH8.0, 5 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM polymethanesulphonyl fluoride) 30 minut na ledu. Proteinová koncentrace byla stanovena metodou BioRad (Bio Rad, USA). Vzorky lyzovaných melanomů byly ředěny v Laemmli roztoku pro elektroforetickou analýzu s následným imunoblotingem. Proteiny byly separovány SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) v 10% gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu s využitím Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell po dobu dvou hodin při 4 °C a 150 mA v blotovacím roztoku (25 mM Tris, 190 mM glycine a 20% metanol).

Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla blokována po dobu dvou hodin v blokovacím roztoku 5% mléka a 0.1% Tween 20 v PBS. Primární protilátky byly nanášeny na tuto membránu v koncentraci 1 µg na 1 ml blokovacího roztoku a inkubovány při 4 °C přes noc. Membrána byla po inkubaci s primární protilátkou promyta třikrát v roztoku PBS obsahujícím 0.1% Tween 20. Po promytí následovala inkubace se sekundární protilátkou (králíčí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, DAKO, Denmark), ředěnou 1:1000 v blokovacím roztoku, při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Peroxidázová aktivita byla vizualizována pomocí ECL kitu (Amersham, UK).

Tabulka I: Imunohistochemická analýza proteinů Ki67, p53 a MDM2 v melanomových fragmentech (% pozitivních buněk)

Případ	kontrola – kultivace v médiu			kultivace s cis-platinou		kultivace s roscovitinem	
	Ki67	p53	MDM2	p53	MDM2	p53	MDM2
M6	50	0	0	0	0	0	0
M9	30	15	8	10	5	40	15
M10	25	20	5	10	10	35	15
M11	70	5	1	1	1	10	1
M13	60	1	20	1	20	1	30
M14	40	5	1	10	5	50	5

Výsledky

Imunohistologie

Jednou z možných metod sledování účinku látek s potenciálními protinádorovými vlastnostmi je imunohistochemická detekce proteinů jejichž exprese v buňce může být těmito látkami ovlivněna. Výsledky naší práce získané imunohistochemickou analýzou krátkodobě kultivovaných melanomových fragmentů jsou shrnuty v Tab. I. Proliferační aktivita (Ki67) spolu s expresí p53 a MDM2

byla sledována pouze v kontrolních vzorcích, kultivovaných v médiu. Proliferace měřená Ki67 kolísala od 25 do 70 %, exprese p53 byla obecně nižší (0-20%), s náznakem inverzní korelace s proliferací aktivitou. Exprese MDM2 převážně korelovala s expresí p53, v případě melanomu M6, neexprimujícího p53, nebyla prokázána ani exprese MDM2. V případě M13 však byla evidentní vysoká exprese MDM2 při nízké hladině p53.

Expresce p53 a MDM2 byla analyzována i u vzorků kultivovaných s přidáním 40 µM cis-platiny a 20 µM roscovitinu. Z hodnot je zřejmá indukce p53 po roscovitinu ve čtyřech ze šesti případů, u fragmentů kultivovaných s cis-platinou zůstává exprese p53 na úrovni srovnatelné s kontrolním vzorkem nebo nižší kromě jednoho případu. Barvení MDM2 opět převážně koreluje s hladinou p53 a je rovněž zřejmá indukce. U případu M6 (s neprokazatelnou expresí p53 a MDM2 v kontrole) k žádné indukci nedošlo, rovněž tak nebyla indukce prokázána u případu M13 s vysokou hladinou MDM2 v kontrole. Obrázek 1 ukazuje případ M9 s výraznou indukcí p53 a MDM2 po roscovitinu, vždy kontrolu (1a, 1d), kultivaci s cis-platinou (1b, 1e) a roscovitinem (1c, 1f) (a, b, c – p53; d, e, f – MDM2). Obrázek 2 ukazuje případ M13 s nízkou hladinou p53 a zvýšenou hladinou MDM2 v kontrole (2a, 2d) a dále kultivaci s cis-platinou (2b, 2e) a roscovitinem (2c, 2f) bez zřejmé změny v expresi obou proteinů (a, b, c – p53; d, e, f MDM2).

Imunobloting

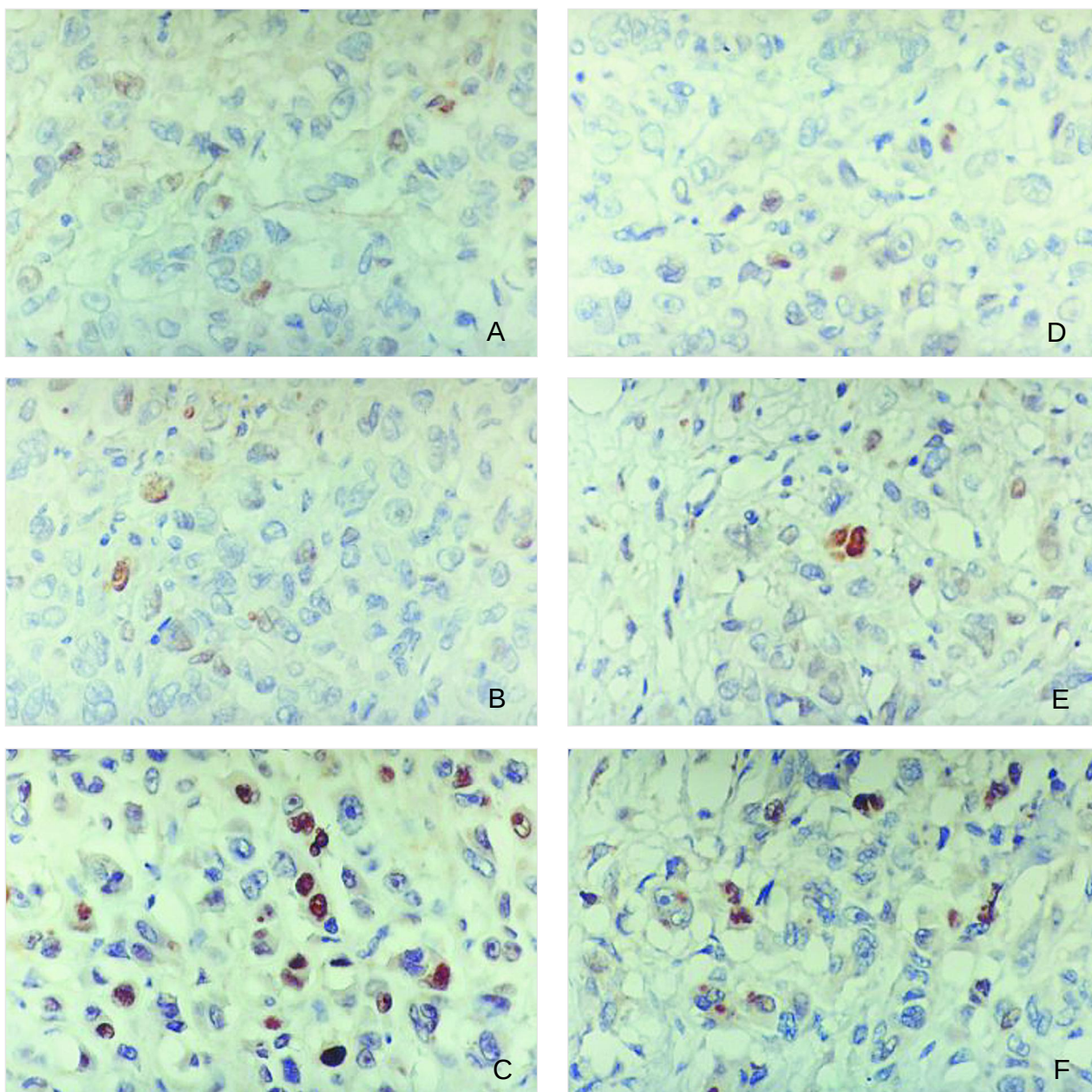
Pomocí imunohistochemické analýzy jsme schopni určit aberantní expresi sledovaných proteinů na úrovni jednotlivých buněk. Tato metoda nám však neumožňuje kvantifikaci změny detekovaných proteinů ani studium jejich vzájemných interakcí popřípadě interakcí s jinými proteiny. Krátkodobě kultivované melanomové fragmenty však poskytují dostatek buněčného materiálu i pro western blotting, imunoprecipitační metody a ELISA testy. Na obrázku 3 je demonstrována analýza proteinu p53 u melanomu M10. Expresce p53 je detekována na všech analyzovaných vzorcích s mírnou indukcí ve vzorku kultivovaném s roscovitinem. Mírná indukce (o 15 %) byla detekována i imunohistochemicky. Jako vnitřní kontrola nasazení stejného množství jednotlivých vzorků byla použita protilátka detekující PCNA.

Diskuse

Terapie pacientů s maligním melanomem postrádá existenci účinných látek, které by byly schopny přinést pozitivní výsledky při léčbě generalizovaného stadia tohoto onemocnění. Byla hodnocena celá řada rozdílných terapeutických přístupů, které byly založeny jak na nespecifické stimulaci imunitního systému nemocného tak na využití kombinované chemoterapie (36). Získané výsledky neprokázaly velké rozdíly v účinnosti použitých terapeutických přístupů a jasně naznačují nutnost hledání nových látek a především metod studia jejich účinku.

V předkládané práci popisujeme nově zavedenou metodu krátkodobě kultivace melanomových fragmentů pro testování látek s potencionálním protinádorovým účinkem, která poskytuje dostatek materiálu nejen pro imunohistochemickou, ale především pro biochemickou analýzu signálních drah odpovědných za rezistenci maligního melanomu k různým typům terapie.

Počet analyzovaných případů je malý pro skutečně efektivní statistické srovnání, které však nebylo cílem této práce. Rozdíly v indukcí p53 a MDM2 po cis-platině a roscovitinu jsou nicméně evidentní a naznačují, že u většiny krátkodobě kultivovaných melanomových fragmentů lze zřejmě indukovat přinejmenším částečně funkční p53 pomocí inhibitorů cyklin- dependentních kináz. Naproti tomu se nám ve studované skupině melanomů nepodařilo prokázat indukci proteinu p53 pomocí cis-platiny vyvolávající poškození DNA. Získané výsledky podporují názor, že u maligního melanomu



Obr. 1: Melanom s výraznou indukcí p53 a MDM2 po roscovitinu (případ M9).

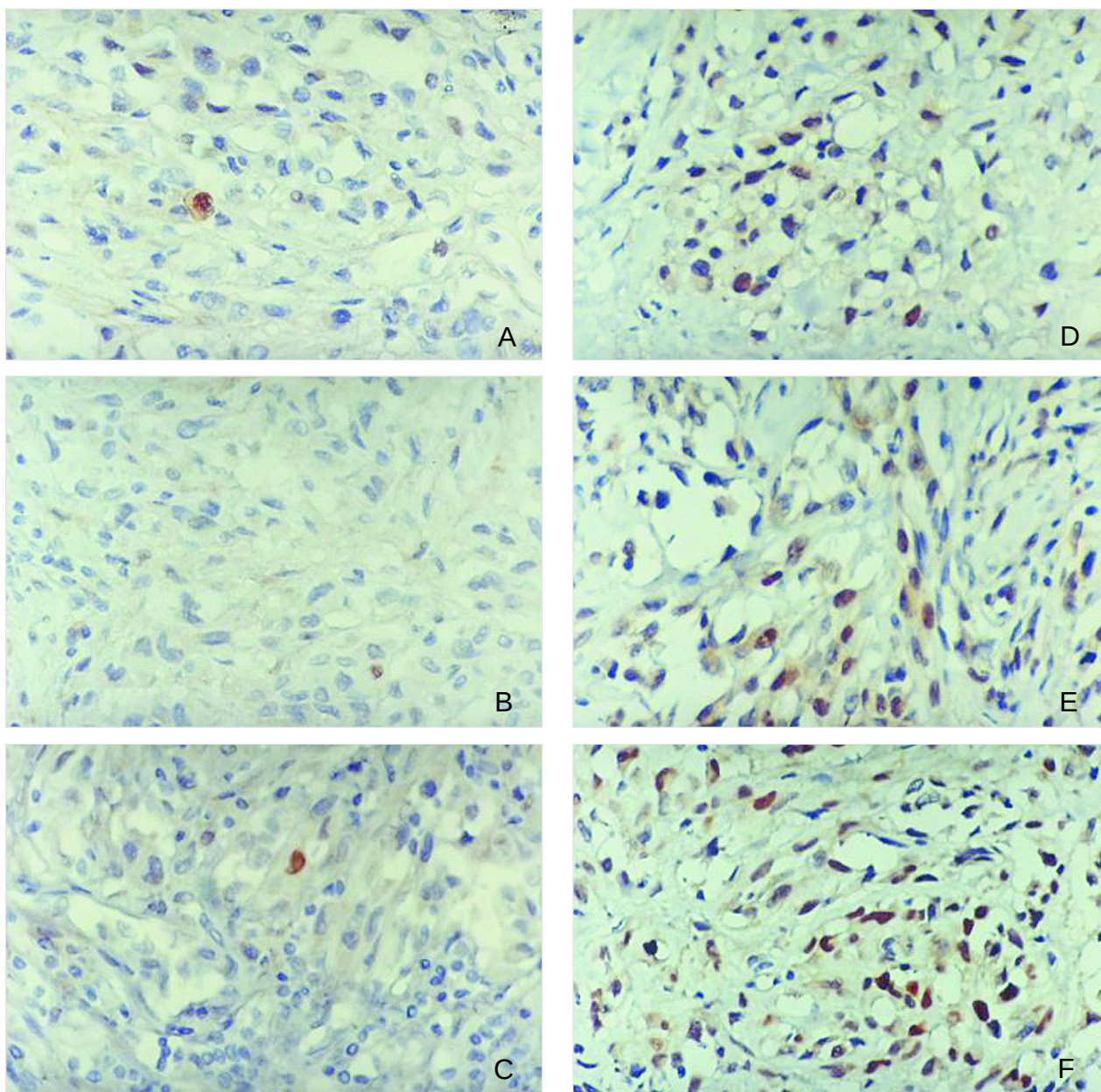
Kontrola vykazuje nízkou expresi p53 (1a) i MDM2 (1d). Expres p53 (1b) i MDM2 (1e) je srovnatelná s kontrolou po kultivaci s cis-platinou. Expres p53 (1c) i MDM2 (1f) je zvýšená po kultivaci s roscovitinem.

s nemutovanou formu proteinu p53 pravděpodobně dochází k mutacím, které inaktivují signální dráhy spojené s poškozením DNA a zodpovědné za aktivaci proteinu p53 (22). Tento předpoklad potvrzuje i radiorezistence některých buněčných linií ustavených z maligních melanomů (23). Zvýšení hladiny proteinu p53 po působení radiace a látek vyvolávajících poškození DNA nevedlo k zastavení buněčného cyklu ani nebyla vyvolána buněčná smrt. Je tedy zřejmé, že u těchto linií nedochází po poškození DNA k aktivaci proteinu p53, ale pouze ke zvýšení hladiny nefunkční formy tohoto proteinu.

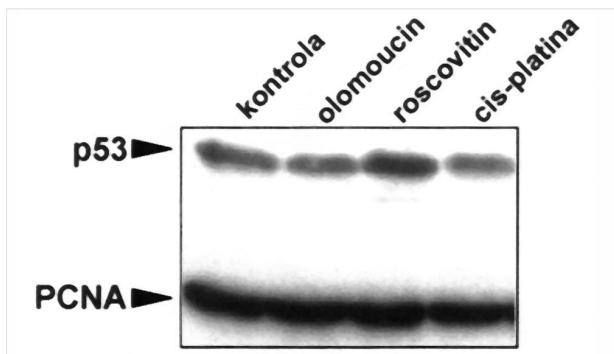
Nalezení látek schopných aktivace nefunkční nemutované formy proteinu p53 exprimované maligními melanomy nezávisle na poškození DNA, je jedním z cílů onkologického výzkumu. Mezi látky nevyvolávající poškození DNA, přesto ale indukující zvýšenou expresi funkčního proteinu p53, patří

inhibitor cyklin dependentních kináz roscovitin (31). Naše výsledky potvrzují jeho schopnost indukovat protein p53 v melanomových fragmentech kultivovaných v médiu s obsahem 20 μ M roscovitinu. Na rozdíl od 40 μ M cis-platiny, roscovitin indukuje zvýšenou expresi proteinů p53 a MDM2, jak bylo prokázáno imunohistochemickými metodami.

V případě melanomu M6 nebyla detekována exprese p53 ani MDM2. Lze předpokládat, že gen pro p53 je deletován nebo není přepisován (obě možnosti jsou v současné době studovány), a proto není tvořen funkční protein p53, který je podmínkou exprese MDM2. Naproti tomu nedochází k indukcí proteinu p53 v případě M14 s vysokou hladinou MDM2, zřejmě z důvodu poškození autoregulační smyčky a nadbytku MDM2, který je schopen udržet nízkou hladinu p53. Zvýšená hladina MDM2 může být způsobena amplifikací genu *mdm2* (37, 38). V tomto případě nemůže být dosaženo zvýšené



Obr. 2: Melanom s nadměrnou expresí proteinu MDM2 (případ M13). V kontrole je minimální exprese p53 (1a), zatímco exprese MDM2 je vysoká (1d). Po kultivaci s cis-platinou se nemění exprese p53 (1b) ani exprese MDM2 (1e). Stejně tak po kultivaci s roscovitinem zůstává hladina p53 stále nízká (1c) a hladina MDM2 vysoká (1f).



Obr. 3: Analýza exprese proteinu p53 u melanomu M10. Z obrázku je patná mírná indukce proteinu p53 po kultivaci s roscovitinem. Kultivace s cis-platinou nevede k detekovatelné změně exprese proteinu p53. Protilátka detekující protein PCNA byla použita pro kontrolu nasazení stejného množství jednotlivých vzorků.

exprese funkčního p53 proteinu ani s využitím roscovitinu. Oba výše popisované případy budou dále studovány, protože nám skýtají možnost nalezení nových drah regulace p53 v závislosti na poškození DNA.

Výsledky získané imunoblottingem naznačují, že je nutné využít citlivějších metod pro detekci aberantní exprese p53, s jejichž pomocí bychom měli být schopni analyzovat posttranslační modifikace a vzájemné proteinové interakce. V následujících studiích využijeme metodu ELISA, která nám navíc umožní přesnější kvantifikaci sledovaných změn proteinu p53.

Využití kultivace melanomových fragmentů pro testování účinku látek, které mohou být vhodné pro nové terapeutické přístupy, se jeví být velkým přínosem. Tyto fragmenty mohou být rovněž využity pro studium vzájemných interakcí proteinu p53 a MDM2, případně vlivu posttranslačně modifikovaných forem proteinu p53 na odpověď pacientů na zvolený způsob terapie. Pokud se podaří prokázat, že stupeň fosforylace

proteinu p53, popřípadě vzájemná interakce p53 a MDM2, mají vztah k rezistenci melanomů na různé typy terapie, bude možno využít kombinace látek vyvolávajících rozdílnou indukci funkčních forem p53 pro účinnější terapii (39). Krátkodobá kultivace nádorových fragmentů, s následným kvantitativním hodnocením biochemických parametrů (indukce, posttranslační modifikace vybraných proteinů,

vzájemné proteinové interakce, ubiquitinace p53 atd.), se nám jeví být vhodným nástrojem pro hlubší studium účinků terapie cytostatiky, případně i k predikci odpovědi konkrétního nádoru na danou terapii. Na rozdíl od buněčných linií nebo primokultur ustavených z maligních nádorů, není tato metoda doprovázena problémy spojenými se změnami vlastností těchto buněčných kultur v průběhu kultivace.

Literatura

1. Lane D.P., Crawford L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701), 1979, 261-263.
2. Linzer D.I., Levine A.J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1), 1979, 43-52.
3. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015), 1991, 49-53.
4. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr., Butel J.S., Bradley A.: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356(6366), 1992, 215-221.
5. Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F. Jr., Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A., Friend S.H.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250(4985), 1990, 1233-1238.
6. Bates S., Vousden K.H.: p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 6(1), 1996, 12-18.
7. Evans S.C., Lozano G.: The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Mol Med Today* 3(9) 1997, 390-395.
8. Attardi L.D., Jacks T.: The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci* 55(1), 1999, 48-63.
9. Choi J., Donehower L.A.: p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci* 55(1), 1999, 38-47.
10. Kubbutat M.H., Vousden K.H.: Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 4(6), 1998, 250-256.
11. Varshavsky A.: The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22(10), 1997, 383-387.
12. Trbusek M., Vojtesek B.: Protein MDM-2 a nádorová onemocnění. *Klinická onkologie* 5, 1998, 144-146.
13. Marston N.J., Crook T., Vousden K.H.: Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function. *Oncogene* 9(9), 1994, 2707-2716.
14. Reinke V., Lozano G.: The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis in vivo. *Oncogene* 15(13), 1997, 1527-1534.
15. Picksley S.M., Vojtesek B., Sparks A., Lane D.P.: Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;—fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* 9(9), 1994, 2523-2529.
16. Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69(7), 1992, 1237-1245.
17. Oliner J.D., Pieterpol J.A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362(6423), 1993, 857-860.
18. Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A., Bradley A.: Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378(6553), 1995, 206-208.
19. Montes de Oca Luna R., Wagner D.S., Lozano G.: Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378(6553), 1995, 203-206.
20. Ashcroft M., Vousden K.H.: Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18(53), 1999, 7637-7643.
21. Ashcroft M., Kubbutat M.H., Vousden K.H.: Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19(3), 1999, 1751-1758.
22. Darbon J.M., Penary M., Escalas N., Casagrande F., Goubin-Gramatica F., Baudouin C., Ducommun B.: Distinct Chk2 activation pathways are triggered by genistein and DNA-damaging agents in human melanoma cells. *J Biol Chem* 275(20), 2000, 15363-15369.
23. Satyamoorthy K., Chehab N.H., Waterman M.J., Lien M.C., El-Deiry W.S., Herlyn M., Halazonetis T.D.: Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell Growth Differ* 11(9), 2000, 467-474.
24. Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer, L.: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 224(2), 1994, 771-786.
25. Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P., Blow J.J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243(1-2), 1997, 527-536.
26. Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H.D., Morgan D.O., Meijer L., Vesely J., Kim S.H.: Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins* 22(4), 1995, 378-391.
27. Meijer, L.: (1996) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. In *Progress in Cell Cycle Research (Meijer, L., Guider, S. and Tung H.Y.L. Eds.)* Vol.1, 351-63, Plenum Press, New York.
28. Iseki H., Ko T.C., Xue X.Y., Seapan A., Hellmich M.R., Townsend C.M. Jr.: Cyclin-dependent kinase inhibitors block proliferation of human gastric cancer cells. *Surgery* 122(2), 1997, 187-194.
29. Buquet-Fagot C., Lallemand F., Montagne M.N., Mester J.: Effects of olomoucine, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinases, on cell cycle progression in human cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 8(6), 1997, 623-631.
30. Mgbonyebi O.P., Russo J., Russo I.H.: Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 59(8), 1999, 1903-1910.
31. David-Pfeuty T.: Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene* 18(52), 1999, 7409-7422.
32. McClay E.F., McClay M.E., Monroe L., Baron P.L., Cole D.J., O'Brien P.H., Metcalf J.S., Maize J.C.: The effect of tamoxifen and cisplatin on the disease-free and overall survival of patients with high risk malignant melanoma. *Br J Cancer* 83(1), 2000, 16-21.
33. Vojtesek B., Bartek J., Midgley C.A., Lane D.P.: An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 151(1-2), 1992, 237-244.
34. Stephen C.W., Helminen P., Lane D.P.: Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* 248(1), 1995, 58-78.
35. Waseem N.H., Lane D.P.: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96 (Pt 1), 1990, 121-129.
36. Kirkwood J.M., Agarwala S.S.: Adjuvant systemic therapy. In: Cutaneous melanoma, Balch C.M., Houghton A.N., Sorber A.J. and Soong S. (eds), p. 451. Quality Medical Publishing: St Louis, MO.
37. Takami K., Inui H., Nagayama K., Watatani M., Yasutomi M., Kurahashi H., Mori T., Takai S.I., Nishisho I.: Low Grade Amplification of MDM2 Gene in a Subset of Human Breast Cancers without p53 Alterations. *Breast Cancer* 1(2), 1994, 95-102.
38. Gunther T., Schneider-Stock R., Hackel C., Kasper H.U., Pross M., Hackelsberger A., Lippert H., Roessner A.: Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. *Mod Pathol* 13(6), 2000, 621-626.
39. Blaydes J.P., Craig A.L., Wallace M., Ball H.M., Traynor N.J., Gibbs N.K., Hupp T.R.: Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 19(34), 2000, 3829-3839.