

P53 HOMOLOGNÍ PROTEINY: JEDNA GENOVÁ RODINA - ROZDÍLNÉ FUNKCE? JEJICH EXPRESE JE ALTEROVÁNA PŘI PŘECHODU Z PREKANCERÓZY DO INVAZIVNÍHO SPINOCELULÁRNÍHO KARCINOMU

P53 HOMOLOGUES PROTEINS: ONE GENE FAMILY-DIFFERENT FUNCTIONS? THEIR EXPRESSION IS ALTERED DURING TRANSITION FROM DYSPLASIA INTO INVASIVE SPINOCELULAR CARCINOMA

REJTHAR, A.¹, NENUTIL, R.², ČEŠKOVÁ, P.³, MÍŠEK, I.³, BERÁNEK, M.³, VOJTĚŠEK, B.³

¹ I. PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY, BRNO

² ÚSTAV PATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BOHUNICE, BIOPTICKÁ STANICE PORODNICE, BRNO

³ ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Východisko: Geny TP73 a TP63 kódují proteiny, jež jsou strukturální a funkční homology proteinu p53, aktivují podobně jako protein p53 rozdílné cílové promotory a mohou indukovat apoptózu nádorových buněk. K prokázání významu těchto proteinů při cervikální karcinogenezi je nutno provést imunohistochemickou analýzu exprese proteinů p73 a p63 a jejich izoform. **Soubor nemocných a metodika:** Imunohistochemická analýza exprese studovaných proteinů byla provedena na souboru 35 dysplazií, 10 karcinomů a 45 normálních tkání. K dané analýze bylo použito monoklonálních a polyklonálních protilátek rozlišujících jak některé cílové epitopy jednotlivých izoform tak epitopy sdílené více izoformami. **Výsledky:** Výsledky dosažené v dané studii prokázaly, že exprese C-terminální izoformy p73 α je v normální tkáni silně omezena a pouze výjimečně (malá část CIN III a sporadické spinocelulární karcinomy) se nachází mimo buňky, které jsou v kontaktu s bazální membránou, zatímco ostatní p73 izoformy jsou exprimovány velmi silně, pravděpodobně v souvislosti s proliferací aktivitou léze. Výsledky získané s protilátkou detekující všechny p63 izoformy ukazují vysokou expresi tohoto proteinu v souvislosti s proliferací aktivitou, bez jednoznačné souvislosti s morfologií léze. **Závěr:** Z námi získaných výsledků vyplývá nutnost analýzy exprese jednotlivých izoform proteinů p73 a p63, která je nezbytná k analýze jejich biologických funkcí a pochopení jejich úlohy na regulaci buněčného cyklu a především při regulaci buněčné diferenciaci a vztahu k bazální membráně u dlaždicového epitelu.

Klíčová slova: cervix, carcinoma, p73, p63,

Abstract: Background: The TP73 and TP63 genes, a structural and functional homologues of p53, activate various p53-responsive promoters and induce tumour cell apoptosis. To clarify the role of these proteins in cervical carcinogenesis, it is necessary to analyse p73 and p63 protein expression using immunohistochemistry. **Patients and methods:** We analysed expression of studied proteins on 35 dysplasia, 10 carcinoma and 45 normal tissues using monoclonal and polyclonal antibodies recognising either target epitope specific to one isoform or target epitope sheared with many isoforms. **Results:** Our results showed that expression of C-terminal isoform p73 α is very limited in normal tissue and only sporadically (small proportion of CIN III and random spinocellular carcinomas) can be found outside of cells that are in contact with basal membrane while the other p73 isoforms are expressed strongly in relation with proliferating activity of the tumour. Results obtained with the antibody recognising the p63 isoforms showed their aberrant expression in connection with proliferation but without any relation to the morphology of the lesion. **Conclusion:** Analysis of expression of different isoforms of p73 and p63 is necessary for understanding of their biological functions, their role in cell cycle and predominantly in the process of cell differentiation and linkage relation to basal membrane of squamous epithelium.

Key words: cervix, carcinoma, p73, p53

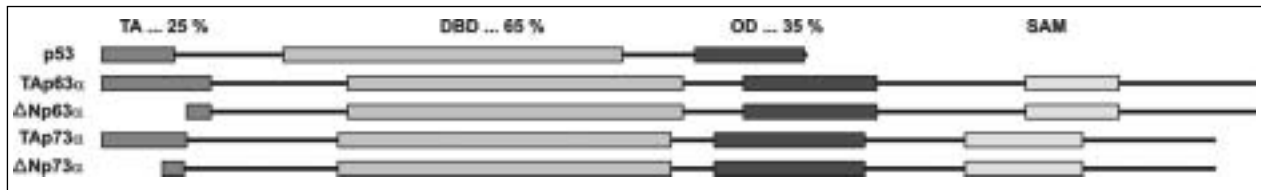
Teoretický úvod

Protein p53 je antionkogen nejčastěji podléhající genetickým změnám nalézáným v lidských nádorech (1, 2). Tento protein je znám jako transkripční faktor, který kontroluje silnou stresovou odpověď buněk integrací „upstream“ signálů vyvolaných různými typy poškození DNA a nevhodných onkogeních stimulů. Protein p53 může být indukován a stabilizován poškozením DNA (3), hypoxií (4), defekty mitotického vřetenka (5) popřípadě aktivací onkogenů nebo virů (6, 7). Aktivovaný protein p53 vyvolává apoptózu, zástavu buněčného cyklu a v některých případech dokonce senescenci (pro přehled (8, 9)). Cílem těchto aktivit proteinu p53 je ochrana organismu proti tvorbě nádorových onemocnění. Ztráta funkce proteinu p53 je

sledována u většiny typů lidských nádorů, což může být způsobeno přímo vznikem mutací v genu pro p53, to je nejčastější příčina inaktivace p53 (10), poškozením jaderného transportu proteinu p53 (11, 12), ztrátou aktivátoru p14ARF (13) nebo amplifikací proteinu MDM2, který je antagonistou proteinu p53 (14). Důležitost zachování funkční aktivity proteinu p53 jako transkripčního faktoru, a tím schopnosti jeho vazby na DNA, je podporována skutečností, že převážná většina mutací nalezených v genu pro p53 u rozličných lidských malignit buď částečně nebo zcela inaktivuje jeho DNA vazebnou aktivitu (15, 16). Tak jako všechny ostatní transkripční faktory, je protein p53 standardní molekula s konzervativní transkripčně aktivací doménou (TAD), DNA-vazebnou doménou (DVD) a oligo-

Obř. 1: Schematické srovnání struktury proteinů p53, p63 a p73.

Na obrázku jsou schematicky zobrazeny proteiny p53, p73 a p63 ve své proporcionální velikosti. Jsou vyznačeny jednotlivé strukturální domény proteinů a procenta strukturální identity mezi proteinem p53 a homology p73 a p63, je naznačen rozdíl mezi transkripčně aktivními a inaktivními isoformami.



merizační doménou (OD). Člověk i myš nesoucí zárodečné mutace se vyvíjejí normálně, ale vykazují vyšší náchylnost ke vzniku celé řady typů nádorových onemocnění (17, 18). Ztěžto poznatků lze konstatovat, že protein p53 není nezbytný pro normální vývoj organismu, ale má důležitou úlohu při kontrole genetické informace s cílem zabránit přenosu poškozené DNA na nově se tvořící buňky (19).

Vzhledem k tomu, že protein p53 má centrální úlohu v procesu karcinogeneze, byly prováděny rozsáhlé studie hledající homology tohoto proteinu, ale po dobu celých 20 let se nepodařilo tyto homology objevit. Teprve v roce 1997, byl nalezen gen TP73 kódující protein p73 (20) a v roce 1998 gen TP63 kódující protein p63 (21). Gen TP63 byl nalezen několika skupinami, což vedlo k jeho rozlišnému značení (KET, p51A, p51B, p40, p73L a NBP). Z důvodu velké strukturální podobnosti s proteinem p53 oba geny vyvolaly stabilní zájem mnoha laboratoří a to umožnilo získání velkého množství informací o jejich biologických funkcích. Za necelých pět let se podařilo pochopit jak podobnosti mezi p53 a jeho homology tak rovněž překvapivé rozdíly v jejich funkcích. Oba geny homologní s genem pro p53 kódují proteiny, které mají jak zcela nové funkce, odlišné od p53, tak funkce shodné s p53. Když byly tyto homology poprvé objeveny, byly považovány za antionkogenní krácející ve stopách proteinu p53 a podílející se na inhibici nádorové přeměny buněk a na kontrole buněčného cyklu. Tyto poznatky vycházely ze sekvenční homologie těchto proteinů s p53 a především ze shodnosti a zachování funkčních domén u různých organismů. Proteiny p73 a p63 se shodují s 60% aminokyselinových zbytků nalézáných v DNA vazebné oblasti (DVD) proteinu p53 včetně zachování všech DNA kontaktních a strukturálních sekvencí, které jsou nejčastějším místem mutací p53 u nádorů. Příkladem je dokonce zachování teplotně senzitivního zbytku Ala¹⁴³ ze sekvence p53 v sekvencích proteinů p63 a p73. Protein p73 navíc vykazuje 38% homologii s proteinem p53 v oblasti oligomerizační domény (OD) a 29% homologii v oblasti transaktivační domény (TA) (Obrázek 1.). Nezkrácená α forma obou proteinů se vyznačuje přítomností SAM domény, která je důležitá pro interakce s jinými proteiny a je o ní známo, že se vyskytuje u širokého spektra proteinů participujících na vývoji (22, 23).

Struktura genů TP73 a TP63 je mnohem komplexnější vzhledem k jednodušší struktuře genu p53. Lidský gen p53 má pouze jeden promotor kódující jeden protein tvořený 393 aminokyselinami. Tím se liší od genů TP63 a TP73, které využívají přepisů z alternativních promotorů a dávají tak vznik různým formám proteinů. Geny TP63 a TP73 mají dva promotory (P1, P2), které dávají vznik dvěma funkčně diametrálně odlišným proteinům označovaným TAp63, TAp73 (obsahující TA doménu; přepis z P1) a Δ Np63, Δ Np73 (TA doména je deletovaná; přepis z P2). TA proteiny mohou napodobovat transaktivační funkci proteinu p53 *in vitro* v buněčných liniích včetně transaktivační mnoha p53 cílových genů jako jsou p21^{WAF1}, Bax, Mdm2, Gadd45 a 14-3-3 σ (13, 20, 21, 24, 25). Tyto transkripčně aktivní varianty hrají důležitou úlohu rovněž při kontrole buněčného růstu (indukují zástavu růstu) a/nebo při indukci programované buněčné smrti. Δ Np63 a Δ Np73 formy se nacházejí jak u člověka tak u myši a vykazují negativní dominance vůči svým TA variantám a vůči p53 jak *in vivo* (v myším

modelu) tak v transfekovaných lidských buňkách a mohou tak inhibovat jejich antionkogenní funkci. Celá problematika homologů proteinu p53 je komplikována skutečností, že dochází ke vzniku C-koncových sestřihových variant proteinů p73 a p63 (nedochází k přepisu jednoho nebo několika exonů, případně dochází k alternativnímu přepisu). U proteinu p73 byly detekovány C-koncové isoformy p73a (nezkrácená isoforma), p73 β , p73 γ , p73 δ , p73 ϵ , p73 ξ , p73 κ a p73 η , u proteinu p63 to byly tři C-koncové isoformy p63 α (nezkrácená isoforma), p63 β a p63 γ (20, 21, 26, 27). Rozdílný sestřih v C-koncové oblasti dává tedy vznik celé řadě variant proteinů p63 a p73, čímž dochází k dalším regulacím funkcí TA a Δ N forem proteinů. Různé C-koncové isoformy proteinu p73 se liší v transaktivační aktivitě. Obecně se předpokládá a bylo ukázáno, že C-koncové deleční mutantní proteiny p73 α vykazují výrazně vyšší transaktivační schopnost než samotná p73a (28). Existují rovněž funkční rozdíly u obou forem TAp63 α a TAp73 α . Zatímco TAp73 α je velmi účinný v transaktivačních a apoptotických testech, TAp63 α velmi slabý (21). Rozdíly ve funkcích výše uvážených homologů nelze vysvětlit strukturální rozdílností a je nutno provést další strukturálně-funkční analýzy, které by objasnily jakým způsobem změny C-koncové oblasti mohou ovlivnit funkci. Obecně lze říci, že každá z isoform proteinů p73 a p63 kombinující různý N-koncový a C-koncový sestřih vykazují rozdílné transaktivační a protein-protein interakční schopnosti, a tak společně s proteinem p53 vytváří regulační síť, která může velice jemně reagovat na aktuální stav buňky. Gen TP73 se nachází na chromozomu 1p36.33, který podléhá časté ztrátě heterozygoty (LOH) u nádorů prsu, neuroblastomů a celé řady jiných lidských nádorů (20). Výše uvážená skutečnost spolu s funkční podobností p73 a p53 vedla k původnímu označení p73 jako antionkogenu (20). Výsledky genetických studií ukázaly, že p73 není klasický nádorový supresor Knudsonova typu což podle definice znamená, že u něj nedochází ke ztrátě jeho funkce během maligní přeměny buňky. Analýzou 909 primárních nádorů bylo detekováno pouze 5 bodových mutací (29, 30) z čehož dvě bodové mutace byly nalezeny u neuroblastomů (31) a po jedné bodové mutaci u karcinomu prsu (32), karcinomu plic (33) a CNS-nádorů (34). Tím bylo potvrzeno, že ke ztrátě funkce p73 nedochází vznikem mutací. Za epigenetické vysvětlení, které mělo naplnit dvoustupňovou hypotézu (v průběhu maligní přeměny bylo nutno jedním zásahem inaktivovat pomocí LOH pouze přepisovanou alelu) byl původně považován imprinting lokusu genu TP73. Ten je ale spíše neobvyklý, a pokud je přítomen, tak se jeho výskyt liší v různých tkáních, u různých jednotlivců, a v žádném případě nekoreluje s hladinou proteinu p73 (27, 35-37). Je rovněž známo, že v případech karcinomu plic, jícnu a ledvin je specificky aktivována druhá alela genu TP73 (ztráta imprintingu) (38-40). Protein p73 se rovněž liší od proteinu p53 tím, že není inaktivován virovými proteiny, které se běžně podílejí na inaktivaci proteinu p53 (SV40 T antigen, Ad E1B 55 kDa) (41, 42). Rozporný názor existuje u HPV E6, kde je zřejmé, že protein E6 není zodpovědný za degradaci proteinu p73 (43, 44), ale není už tak jasné, zda protein E6 jak vysoce rizikových tak nízkorizikových HPV kmenů může inaktivovat transkripčně aktivní funkci proteinu p73 (45, 46). Zajímavé výsledky byly

získány z celé řady laboratoří analyzujících expresi proteinu p73 z širokého spektra nádorů (nádory prsu, plic, jícnu, žaludku, tlustého střeva, vaječníku, močového měchýře atd.). Tyto potvrzují skutečnost, že nejčastěji identifikovatelná změna spojená s nádorem je zvýšená exprese proteinu p73 a nikoliv ztráta exprese. Tyto výsledky jasně podporují názor, že protein p73 hraje důležitou roli v procesu maligní přeměny buňky.

Lidský gen TP63 se nachází na chromozomu 3p v oblasti, která je často amplifikována u dlaždicobuněčného karcinomu. Limitované výsledky, analyzující výskyt inaktivujících mutací, potvrdily, že mutace nejsou hlavní příčinou inaktivace proteinu p63, ale že mnohem důležitější je zvýšená regulace dominantně negativních forem Δ Np63. Při analýze 47 karcinomů močového měchýře nebyla nalezena bodová mutace v genu TP63 (47). Pouze jediná bodová mutace (Ala148Pro) byla nalezena při analýze 66 různých typů karcinomů, dvě bodové mutace byly nalezeny v genu TP63 při analýze 35 nádorových buněčných linií (48). Některé případy karcinomu plic a dlaždicobuněčného karcinomu v oblasti hlavy a krku, vykazují zvýšenou expresi proteinu p63 spojenou s mírnou amplifikací genu TP63 (49).

V předkládané práci jsme shrnuli dosavadní poznatky o rodině strukturálně podobných proteinů p63, p73 a p53 a provedli jsme pilotní studii exprese proteinů p73 a p63 u spinocelulárních karcinomů a dysplazií děložního čípku.

Materiál a metody

Soubor pacientek

Do studie byl zařazen histopatologický parafinový materiál od 45 pacientek s CIN II/III a/nebo s invazivním karcinomem dlaždicových buněk děložního čípku. Studované vzorky byly získány z diagnostických excízií, konizátů, eventuálně z hysterektomií. Tkáňový materiál byl volen tak, aby obsahoval rovněž normální ektocervikální sliznici, která sloužila jako vnitřní kontrola. Histopatologická diagnóza zahrnovala CIN I (5), CIN II (5), CIN III (25), dlaždicobuněčný karcinom (9) a nediferencovaný karcinom (1). Tkáňový materiál byl fixován v neutrálním 4% formaldehydu a zalit do parafinu. Tkáňové řezy byly připraveny o tloušťce 4 μ m a fixovány na elektrostaticky nabitá skla (Superfrost Plus)

Imunohistochemická detekce proteinů p73 α a p63 α .

Rutině připravené vzorky v parafinových blocích byly nakrájeny a přeneseny na silanizovaná skla, řezy odparafinovány v xylenu a rehydratovány. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována po dobu 15 minut 3% roztokem H_2O_2 v PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem na pH 7,5). Odmaskování antigenních epitopů bylo provedeno následovně: (i) pro detekci p73 α proteinu povařením řezů po dobu 40 minut při 97 °C v roztoku 1mM EDTA-NaOH, pH 8,0; (ii) pro detekci p63 α proteinu zahřátím na teplotu 97 °C po dobu 40 minut v citrátovém pufru pH 6,0. Po promytí v PBS (3x5 minut) byly z důvodu zablokování nespecifické vazebné aktivity řezy převrstveny na dobu 15 minut roztokem 5% nízkotučného mléka v TBS (fyziologický roztok pufrovaný Tris na pH 7,6). Primární monoklonální protilátky a polyklonální protilátky byly aplikovány na řezy při teplotě 4 °C přes noc. Po trojnásobném promytí v PBS byla nanášena anti-myší resp. anti-králíčí sekundární protilátka značená biotinem a ABC reagentie (Vector Elite ABC kit, Vector) přesně dle návodu a doporučení dodavatelem. Peroxidázová aktivita byla vizualizována kitem DAB+ (Dako, Denmark). Po promytí v destilované vodě byly řezy dobarveny Gillovým hematoxylinem, dehydratovány, projasněny a zamontovány pro mikroskopické zhodnocení.

Monoclonal antibodies

p73 α -1.1 – monoklonální protilátka rozlišující C-koncovou oblast proteinu p73 α (sekvenci aminokyselin QDLKQGH-DYSTAQQ) (50).

p73-1.1 - monoklonální protilátka rozlišující všechny izoformy proteinu p73 (50)

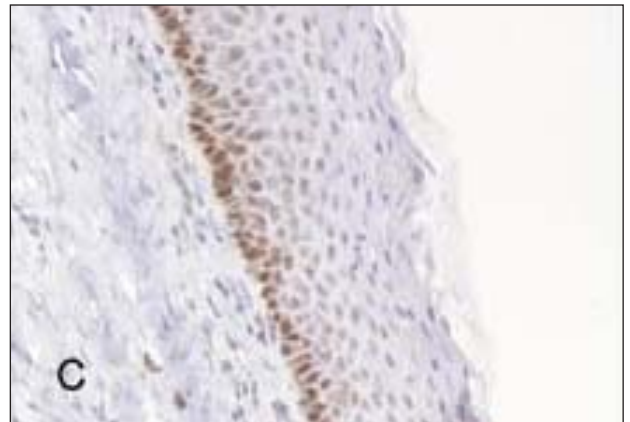
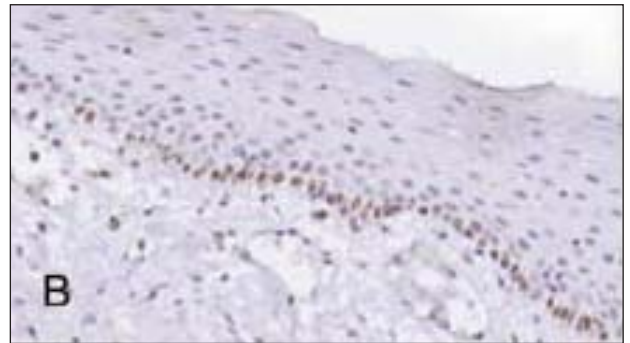
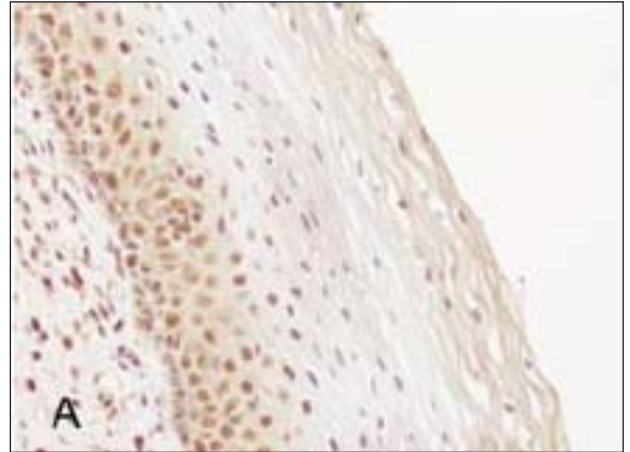
p63 - KN- α králíčí polyklonální protilátka připravená proti sekvenci aminokyselin DFNFDMDARRNKQQRIKEEGE (51)

Výsledky

Na souboru 45 pacientek se stanovenou diagnózou dlaždicobuněčný karcinom (9), nediferencovaný karcinom (1) a CIN I – CIN III (35), jsme provedli pilotní imunohistochemickou analýzu exprese proteinů p73 α a p63 pomocí námi připravených specifických protilátek. Normální ektocervikální epitel exprimuje protein p63 bazálně a suprabazálně až do 2/3 tloušťky, exprese je jaderná, přítomná rovněž ve stromatu (fibroblasty, endotel) - Obr. 2A. Exprese p73 α je rovněž jaderná, ome-

Obr. 2: Exprese p63 a p73 v normálním dlaždicovém epitelu.

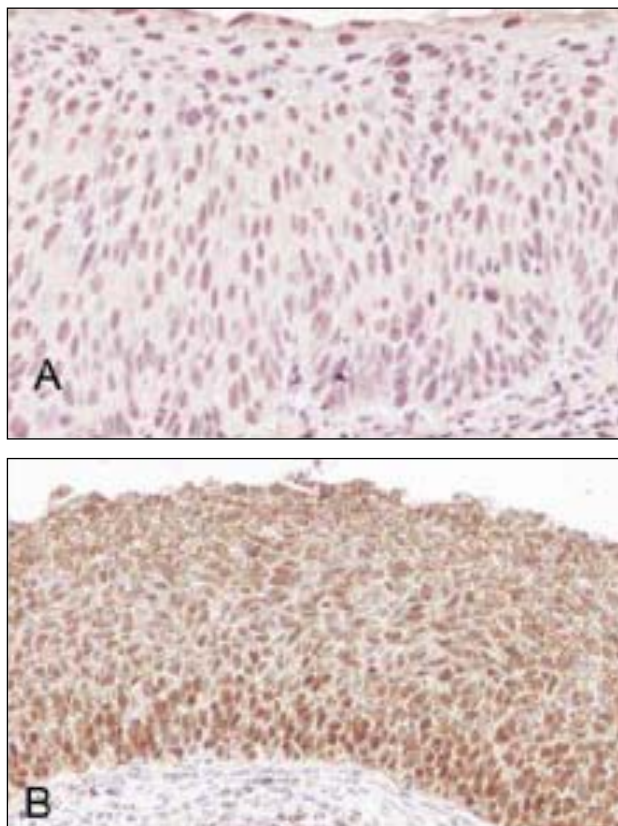
Barvení p63 je nejintenzivnější v parabazálních buňkách dlaždicového epitelu, je však pozitivní i část buněk bazálních a buňky intermediární vrstvy. Rovněž intenzivně se barví stromální buňky (2A). p73 α izoforma (2B) je exprimována pouze v bazální vrstvě dlaždicového epitelu. Barvení protilátkou proti všem izoformám p73 (2C) je ve srovnání s p73 α intenzivnější a vyskytuje se i v parabazálních buňkách.



žená na parabazální vrstvu dlaždicového epitelu (*obr. 2B*). Expresie všech izoform p73 (*obr. 2C*) je širší, jaderná i cytoplasmatická. V dysplastických lézích a nádorech jsme pozorovali konstantní vysokou expresi p63 (*obr. 3A*) a vysokou imunopozitivitu p73 stanovenou pomocí protilátky proti všem izoformám. (*obr. 3B*). Zajímavá je expresie p73 α : imunopozitivita v bazální vrstvě dlaždicového epitelu je zachována v CIN I-II, i v drtivé většině CIN III (32 z 35) - *obr. 4A, 4B*. Ve třech případech CIN III bylo pozorováno rozšíření exprese do parabazálních vrstev. V invazivních karcinomech byla naopak pozorována úplná ztráta exprese p73 α (5 z 10), případně heterogenní barvení s vymizením v části nádoru, a to zejména v oblastech s vysoce infiltrativním růstem (4 z 10) - *obr. 4C*. Pouze v jednom případě bylo u spinocelulárního karcinomu pozorováno dispersní barvení jader na p73 α mimo oblasti přiléhající ke stratumu, analogické expresi p63 nebo ostatních izoform p73.

Obr. 3: Expresie všech izoform p73 a p63 v CIN.

Jak p63 (3A), tak p73 (3B) vykazují v CIN i spinocelulárních karcinomech silnou, prakticky difúzní expresi.

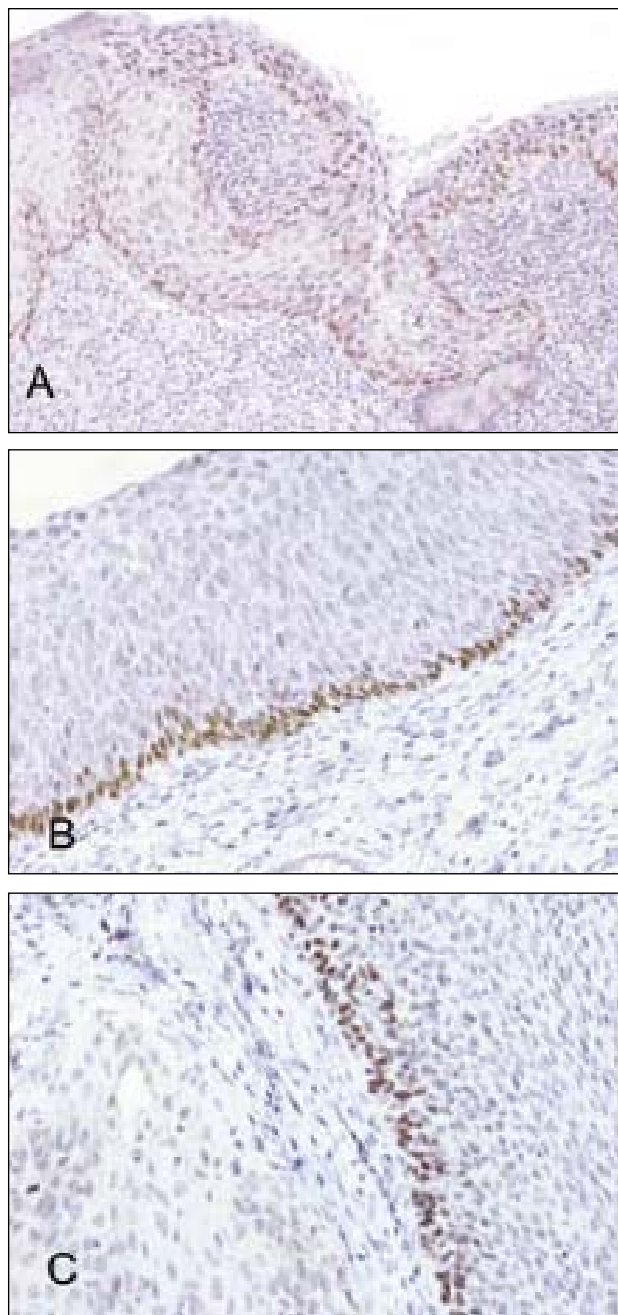


Diskuse

Protein p53 byl středem zájmu onkologického výzkumu od doby, kdy se podařilo prokázat, že ztráta a inaktivace tohoto proteinu přispívá k vývoji velkého množství lidských nádorů. Typickým mechanismem inaktivace proteinu p53 je vznik bodových mutací, z nichž většina se nachází v DNA vazebné doméně, cytoplasmatický výskyt tohoto proteinu a zvýšená expresie virových nebo buněčných proteinů, které mohou interagovat s proteinem p53 a inhibovat jeho funkci. Mnoho funkcí proteinu p53 je zprostředkováno jeho transkripční aktivitou, která může být indukována různými stresovými podmínkami, kdy dochází k akumulaci proteinu p53 především jeho stabilizací nebo posttranslačními modifikacemi C- a N-koncových domén tohoto proteinu. Otázkou času bylo objevení homologů tohoto supresorového proteinu, které by se projevovaly stejnou nebo alespoň obdobnou funkcí.

Obr. 4: Expresie p73a v CIN a spinocelulárním karcinomu.

Na přechodu normálního epitelu (4A vlevo) do CIN III (4A vpravo) je zřejmé, že topika exprese p73a je v CIN III překvapivě zachována. Typický nález v CIN III (4B) vynikne při srovnání s 3A, 3B. Invazivní spinocelulární karcinomy jsou většinou buď p73a negativní, nebo vykazují heterogenní expresi: 4C vlevo negativní část nádoru, 4C vpravo pozitivní část nádoru s typickou „bazální“ expresí.



V této práci jsou uvedeny výsledky analýzy exprese proteinů p73 a p63 homologů proteinu p53 na souboru 35 dysplazií, 10 karcinomů a 45 normálních tkání čípku děložního a provedena jejich vzájemná korelace včetně analýzy vztahu k maligní přeměně dané normální tkáně a analýze jednotlivých izoformem.

Aberantní expresie proteinů p73 a p63 byla detekována již dříve u 40% karcinomů močového měchýře (52), u karcinomů prsu (27), adenokarcinomů a karcinomů kolorekta (53), (54) a také u mnohočetného synchronního karcinomu žaludku. (55). Přestože bylo provedeno mnoho funkčních studií na různých buněčných liniích i nádorech, mechanismus zodpovědný za

tyto změny v expresi obou proteinů doposud nebyl vysvětlen. Situaci kolem analýzy homologů proteinu p53 komplikuje existence celé řady jak transkripčně aktivních tak transkripčně neaktivních izoforem vznikajících alternativními sestřihem. Tyto izoformy se vyznačují různými funkcemi a je překvapující, že většina doposud prováděných studií zabývajících se analýzou těchto homologů v normální a nádorové tkáni, ať již na úrovni proteinové nebo mRNA, nerozlišuje mezi expresí individuálních izoforem. S využitím námi připravených monoklonálních a polyklonálních protilátek, rozlišujících jak jednotlivé izoformy proteinů p73 a p63 tak více izoforem současně, jsme provedli analýzu exprese těchto proteinů v neoplastickém epitelu čípku. Naše výsledky ukázaly, že p73 α izofорма je exprimovaná v normální tkáni a není většinou exprimována ve tkáni nádorové zatímco zbývající izoformy proteinu p73 jsou exprimovány jak v normální tak nádorové tkáni, kde jejich exprese může být zachována nebo dokonce zvýšena. Expese p73 α je zřejmě striktně topicky regulována a omezena na epitelové buňky přiléhající k bazální membráně. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi, které z využitím jak RT-PCR tak imunohistochemické detekce u karcinomů prsu a nádorů orofaciální oblasti ukázaly, že p73 α izoforma se nachází převážně v normální tkáni a její exprese se snižuje u nádorů. Zbývající izoformy lze pak detekovat i ve tkáních nádorových (56), (57). Expese proteinu p63 je na rozdíl od proteinu p73 topicky odlišná a širší - není vázána na epitelové buňky ani na sousedství s bazální membránou. Rovněž expese ostatních izoforem p73 není topicky vázána a v dysplastických lézích, i nádorech se spíše zvyšuje.

Z námi dosažených výsledků tedy vyplývá, že expese C-terminální izoformy p73 α (Δ Np73 α) je za normálních okolností silně topicky i tkáňově omezena a pouze výjimečně (malá část CIN III a sporadicky spinocelulární karcinomy) se ocitá mimo epitelové buňky, které jsou v kontaktu s bazální membránou. Ostatní p73 izoformy jsou exprimovány velmi silně, možná v souvislosti s proliferací aktivitou léze. Ztráta nebo topicky aberantní expese p73a zřejmě odráží schopnost invaze epitelálních buněk, případně je způsobena změnou jejich vztahu k bazální membráně. Výsledky získané s protilátkou rozlišující p63 ukazují vysokou expresi tohoto proteinu v prekancerózách i nádorech, opět možná v souvislosti s proliferací aktivitou, bez jednoznačné souvislosti s morfologií léze. Zde ovšem nebyla zatím provedena podrobnější analýza pro jednotlivé izoformy.

Práce jednoznačně potvrzuje nutnost vývoje imunoreagencií schopných detekovat jednotlivé izoformy proteinů p73 a p63 a provedení analýzy jejich proteinové exprese na panelu normálních a nádorových tkání různého původu. Ztráta korelace mezi expresí proteinů p73 a p63 ukazuje na skutečnost, že tyto proteiny se nemohou vzájemně nahradit, pokud jeden z nich je inaktivován. Jejich biologické funkce jsou patrně velmi rozdílné a kromě podílu na regulaci buněčného cyklu patrně zahrnují i regulaci buněčné diferenciaci a vztahu k bazální membráně u dlaždicového epitelu.

Poděkování:

Práce byla podporována IGA MZ ČR číslo 6404-3.

Literatura

- Hollstein M., Shomer B., Greenblatt M., Soussi T., Hovig E., Montesano R. and Harris C. C.: Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(1):141-6.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C. C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53.
- Levine A. J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3):323-31.
- 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.
- Cross S. M., Sanchez C. A., Morgan C. A., Schimke M. K., Ramel S., Idzerda R. L., Raskind W. H. and Reid B. J.: A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 1995; 267(5202):1353-6.
- Vousden K.: Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *Faseb J* 1993; 7(10):872-9.
- Wu X., Bayle J. H., Olson D. and Levine A. J.: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; 7(7A):1126-32.
- Kotala V., Uldrijan S., Nenutil R. and Vojtesek B.: Protein p53 a protinádorová terapie. *Klinická onkologie* 2002; 15(3):98-101.
- Uldrijan S., Kotala V. and Vojtesek B.: Regulate stability a aktivitu nádorového supresoru p53. *Chem. Listy* 2002; 96(145-9).
- Vogelstein B., Lane D. and Levine A. J.: Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810):307-10.
- Stommel J. M., Marchenko N. D., Jimenez G. S., Moll U. M., Hope T. J. and Wahl G. M.: A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* 1999; 18(6):1660-72.
- Moll U. M., Ostermeyer A. G., Ahomadegbe J. C., Mathieu M. C. and Riou G.: p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matched pairs of breast cancer biopsies. *Hum Pathol* 1995; 26(12):1293-301.
- Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., McKeon F. and Caput D.: p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; 404(6773):99-103.
- Oliner J. D., Kinzler K. W., Meltzer P. S., George D. L. and Vogelstein B.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358(6381):80-3.
- Pavletich N. P., Chambers K. A. and Pabo C. O.: The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 1993; 7(12B):2556-64.
- Di Como C. J. and Prives C.: Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene* 1998; 16(19):2527-39.
- Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A., Jr., Butel J. S. and Bradley A.: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356(6366):215-21.
- 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. and et al.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250(4985):1233-8.
- Lane D. P.: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6.
- Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J. C., Valent A., Minty A., Chalou P., Lelias J. M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F. and Caput D.: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90(4):809-19.
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dotsch V., Andrews N. C., Caput D. and McKeon F.: p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3):305-16.
- Wang W. K., Bycroft M., Foster N. W., Buckle A. M., Fersht A. R. and Chen Y. W.: Structure of the C-terminal sterile alpha-motif (SAM) domain of human p73 alpha. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001; 57(Pt 4):545-51.
- Chi S. W., Ayed A. and Arrowsmith C. H.: Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *Embo J* 1999; 18(16):4438-45.
- Jost C. A., Marin M. C. and Kaelin W. G., Jr.: p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997; 389(6647):191-4.
- Zhu J., Jiang J., Zhou W. and Chen X.: The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* 1998; 58(22):5061-5.
- De Laurenzi V., Costanzo A., Barcaroli D., Terrinoni A., Falco M., Annicchiarico-Petruzzelli M., Levrero M. and Melino G.: Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* 1998; 188(9):1763-8.
- Zaika A. I., Kovalev S., Marchenko N. D. and Moll U. M.: Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res* 1999; 59(13):3257-63.
- Ueda Y., Hijikata M., Takagi S., Chiba T. and Shimotohno K.: Transcriptional activities of p73 splicing variants are regulated by intervariant association. *Biochem J* 2001; 356(Pt 3):859-66.
- Stiewe T. and Putzer B. M.: Role of p73 in malignancy: Tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ* 2002; 9(3):237-45.
- Levrero M., De Laurenzi V., Costanzo A., Gong J., Wang J. Y. and Melino G.: The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt 10):1661-70.

31. Ichimiya S., Nimura Y., Kageyama H., Takada N., Sunahara M., Shikshikura T., Nakamura Y., Sakiyama S., Seki N., Ohira M., Kaneko Y., McKeon F., Caput D. and Nakagawara A.: p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 1999; 18(4):1061-6.
32. Han S., Semba S., Abe T., Makino N., Furukawa T., Fukushima S., Takahashi H., Sakurada A., Sato M., Shiiha K., Matsuno S., Nimura Y., Nakagawara A. and Horii A.: Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25(2):194-8.
33. Ikawa S., Nakagawara A. and Ikawa Y.: p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999; 6(12):1154-61.
34. Lomas J., Bello M. J., Arjona D., Gonzalez-Gomez P., Alonso M. E., de Campos J. M., Vaquero J., Ruiz-Barnes P., Sarasa J. L., Casartelli C. and Rey J. A.: Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129(1):88-91.
35. Kovalev S., Marchenko N., Swendeman S., LaQuaglia M. and Moll U. M.: Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ* 1998; 9(11):897-903.
36. Nomoto S., Haruki N., Kondo M., Konishi H. and Takahashi T.: Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 1998; 58(7):1380-3.
37. Tsao H., Zhang X., Majewski P. and Haluska F. G.: Mutational and expression analysis of the p73 gene in melanoma cell lines. *Cancer Res* 1999; 59(1):172-4.
38. Cai Y. C., Yang G. Y., Nie Y., Wang L. D., Zhao X., Song Y. L., Seril D. N., Liao J., Xing E. P. and Yang C. S.: Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis* 2000; 21(4):683-9.
39. Mai M., Qian C., Yokomizo A., Tindall D. J., Bostwick D., Polychronakos C., Smith D. I. and Liu W.: Loss of imprinting and allele switching of p73 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 1998; 17(13):1739-41.
40. Mai M., Yokomizo A., Qian C., Yang P., Tindall D. J., Smith D. I. and Liu W.: Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58(11):2347-9.
41. Reichelt M., Zang K. D., Seifert M., Welter C. and Ruffing T.: The yeast two-hybrid system reveals no interaction between p73 alpha and SV40 large T-antigen. *Arch Virol* 1999; 144(3):621-6.
42. Wienzek S., Roth J. and Döbelstein M.: E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* 2000; 74(1):193-202.
43. Marin M. C., Jost C. A., Irwin M. S., DeCaprio J. A., Caput D. and Kaelin W. G., Jr.: Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol Cell Biol* 1998; 18(11):6316-24.
44. Balint E., Bates S. and Vousden K. H.: Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* 1999; 18(27):3923-9.
45. Prabhu N. S., Somasundaram K., Satyamoorthy K., Herlyn M. and El-Deiry W. S.: p73beta, unlike p53, suppresses growth and induces apoptosis of human papillomavirus E6-expressing cancer cells. *Int J Oncol* 1998; 13(1):5-9.
46. Park J. S., Kim E. J., Lee J. Y., Sin H. S., Namkoong S. E. and Um S. J.: Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer* 2001; 91(6):822-7.
47. Park B. J., Lee S. J., Kim J. I., Lee C. H., Chang S. G., Park J. H. and Chi S. G.: Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60(13):3370-4.
48. Osada M., Ohba M., Kawahara C., Ishioka C., Kanamaru R., Katoh I., Ikawa Y., Nimura Y., Nakagawara A., Obinata M. and Ikawa S.: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 1998; 4(7):839-43.
49. Hibi K., Trink B., Patturajan M., Westra W. H., Caballero O. L., Hill D. E., Ratovitski E. A., Jen J. and Sidransky D.: AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10):5462-7.
50. Ceskova P., Nenutil R., Bray S., Svitakova M., Babcanova S., Uldrijan S. and Vojtesek B.: New monoclonal antibodies recognizing the p53 tumour suppressor protein homologue p73. *Folia Biol* 2001; 47(6):211-4.
51. Nylander K., Vojtesek B., Nenutil R., Lindgren B., Roos G., Zhanxiang W., Sjöstrom B., Dahlqvist A. and Coates P. J.: Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198(4):417-27.
52. Chi S. G., Chang S. G., Lee S. J., Lee C. H., Kim J. I. and Park J. H.: Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. *Cancer Res* 1999; 59(12):2791-3.
53. Sun X. F.: p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8(1):165-70.
54. Liu L., Cui X., Sakaguchi T., Sasaki M., Suda T. and Hatakeyama K.: Expression of p73 in colorectal carcinoma: clinicopathological relevance. *J Int Med Res* 2001; 29(4):297-303.
55. Tannapfel A., Schmelzer S., Benicke M., Klimpfinger M., Kohlhaw K., Mossner J., Engeland K. and Wittekind C.: Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001; 195(2):163-70.
56. Brooks L. A., Sullivan A., O'Nions J., Bell A., Dunne B., Tidy J. A., Evans D. J., Osin P., Vousden K. H., Gusterson B., Farrell P. J., Storey A., Gasco M., Sakai T. and Crook T.: E7 proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2002; 86(2):263-8.
57. Faridoni-Laurens L., Bosq J., Janot F., Vayssade M., Le Bihan M. L., Kaghad M., Caput D., Benard J. and Ahomadegbe J. C.: P73 expression in basal layers of head and neck squamous epithelium: a role in differentiation and carcinogenesis in concert with p53 and p63? *Oncogene* 2001; 20(38):5302-12.