

**Adam Hołownia¹, Robert Marek Mróz², Mirosław Kozłowski³,
Elżbieta Chyczewska², Jerzy Laudański³, Lech Chyczewski⁴, Jan Józef Braszko¹**

¹Zakład Farmakologii Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. med. Jan J. Braszko

²Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Chyczewska

³Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: dr hab. med. Jerzy Laudański

⁴Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. med. Lech Chyczewski



Potranslacyjna fosforylacja białka p53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca po radio- i chemioterapii

Posttranslational p53 phosphorylation in non small cell lung cancer cells after radio/chemotherapy

Abstract

Introduction: p53 protein is a critical regulator of cell cycle and apoptosis. Many stimuli change its expression and modify its functions. The aim of our work was to determine stability and chosen posttranslational modification of p53 protein during the treatment of lung cancer.

Material and methods: We investigated levels of poly-ADP-ribose — a marker of cellular DNA damage, DNA ploidy, Ki-67 expression, wild type and mutated p53 protein expression and intensity of phosphorylation of chosen p53 serine sites: C-terminal Ser392, and N-terminal Ser15, and Ser20 in fiberoptic bronchoscopy biopsy samples taken from patients suffering from recurrent squamous cell lung cancer before and after radio/chemotherapy. Analysis was based on results obtained from 23 patients after surgery in I–IIIA clinical stage of the disease.

Results: Therapy lowered the number of G2/M cells, but increased S fraction cell population in about 50%. Therapy increased p53 expression and p53 phosphorylation at Ser392 and Ser20, and these changes correlated with poly-ADP-ribose levels and Ki-67 expression.

Conclusions: Our results indicate that apart from changes in p53 quantity, p53 posttranslational phosphorylation play a role in regulation of neoplastic cells proliferation in response to drugs.

Key words: p53, DNA ploidy, non-small cell lung cancer, cisplatin, vinorelbine

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 241–250

Streszczenie

Wstęp: Jednym z najważniejszych regulatorów cyklu komórkowego i apoptozy jest białko p53. Wiele czynników zmienia ekspresję tego białka i modyfikuje jego funkcje. Celem badań autorów było określenie stabilności i wybranych potranslacyjnych modyfikacji białka p53 w przebiegu terapii raka płuca.

Material i metody: Oceniano zmiany ilości markera uszkodzenia DNA — poli-ADP-rybozy, ploidię DNA, ekspresję antygenu proliferacyjnego Ki-67, ekspresję natywnego i zmutowanego p53 oraz intensywność reakcji fosforylacji wybranych reszt serynowych tego białka, C-końcowej Ser392 i N-końcowych Ser15 i Ser20 w próbkach pobranych w trakcie bronchoskopii chorych na nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca przed radio- i chemioterapią i po niej. Badania objęły 23 pacjentów będących po zabiegu chirurgicznym w stadiach I–IIIA.

Adres do korespondencji: Adam Hołownia, Zakład Farmakologii Klinicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Waszyngtona 15A, 15–274 Białystok, tel.: (085) 745 06 49, faks: (085) 745 06 47, e-mail: holow_sinai@hotmail.com

Praca wpłynęła do Redakcji: 23.07.2007 r.
Copyright © 2007 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wyniki: Terapia obniżyła liczbę komórek będących w fazie G2/M, ale zwiększyła frakcję komórek w fazie S o około 50%. Zwiększyła także ekspresję białka p53 oraz ilość białka fosforylowanego w pozycjach Ser392 i Ser20, a zmiany te korelowały ze zmianami ilości poli-ADP-rybozy i ekspresją Ki-67.

Wnioski: Uzyskane przez autorów wyniki wskazują, że oprócz zmian ekspresji białka p53 jego potranslacyjna fosforylacja uczestniczy w regulacji proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem leków.

Słowa kluczowe: p53, ploidia DNA, niedrobnokomórkowy rak płuca, cisplatyna, winorelbina

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 241–250

Wstęp

Białko p53 jest jednym z najważniejszych białek regulujących progresję cyklu komórkowego i procesy apoptozy [1]. Jego ilość w komórce jest zwykle niewielka, ponieważ jest ono wiązane z białkiem Mdm2 i szybko degradowane w układzie proteosomu [2]. U około 50% osób z chorobami nowotworowymi białko p53 jest zmutowane i bardziej stabilne [3], ale jednocześnie jego efektywność jest obniżona. Regulacja funkcji białka p53 zależy w znacznym stopniu od jego potranslacyjnych modyfikacji, z których jedną z ważniejszych wydaje się fosforylacja reszt serynowych. Wiadomo, że chemioterapia może nasilać fosforylację p53 w pozycji Ser15, co skutkuje zwiększoną stabilizacją tego białka [4, 5]. Białko p53 jest również zmienione w raku płuca, ale nie stwierdzono silnej korelacji między zmianami ekspresji tego białka (zarówno zmutowanego, jak i natywnego) i przebiegiem choroby. Obserwowano jednak istotną poprawę stanu chorych poddanych terapii skojarzonej, w której przebiegu obserwowano nasilenie ekspresji białka p53 [6]. Zmianom ilości białka p53 towarzyszą zmiany jego funkcji, regulowane przez modyfikacje potranslacyjne, z których kluczowe znaczenie mają prawdopodobnie relacje fosforylacji różnych reszt serynowych położonych w okolicy C- i N-końca [1]. Wiadomo, że fosforylacja p53 w okolicy wiązania białka Mdm2 hamuje degradację p53, a fosforylacja C-końcowej Ser392 zmienia przebieg cyklu komórkowego [7, 8]. Białko p53 wchodzi w interakcje z innymi białkami, których zadaniem jest ochrona DNA i zachowanie stabilności genów. Jednym z takich białek jest polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP, PARP-1, EC 2.4.2.30) [9]. Uszkodzenie DNA w przebiegu terapii raka nasila ekspresję PARP i zwiększa ilość poli-ADP-rybozy (PAR) w komórkach nowotworowych, co pozytywnie koreluje z nasileniem reakcji proapoptotycznych [10].

Celem badań autorów było określenie zmian ekspresji i funkcji białka p53 spowodowanych przez klasyczną chemo- i radioterapię w odniesieniu do ekspresji markerów uszkodzenia DNA, proliferacji i apoptozy w komórkach niedrobnokomór-

kowego raka płuca (NDRP) oraz podjęcie próby funkcjonalnego powiązania obserwowanych zmian.

Materiał i metody

Materiał do badań

Badania wykonano przy użyciu wycinków z oskrzeli pobranych w czasie bronchoskopii od 23 mężczyzn, byłych palaczy, w wieku 47–71 lat, którzy byli uprzednio operowani z powodu NDRP (tab. 1). Pacjentów przyjęto do kliniki z powodu objawów nawrotowego raka płuca. U wszystkich chorych w badanej grupie nawrót choroby polegał na wznowie miejscowej, stwierdzonej na podstawie badania rentgenowskiego/tomograficznego klatki piersiowej i badania bronchofibero-skopowego potwierdzonego badaniem histopatologicznym wycinka z oskrzeli. Wszyscy chorzy poddani leczeniu znajdowali się w I lub w II stopniu sprawności w skali Zubroda. U wszystkich pacjentów wykonano bronchoskopię przed leczeniem i w trakcie terapii — w 22.–24. dniu ostatniego cyklu terapii składającej się z radioterapii (30-dniowych 2-Gy frakcji do dawki całkowitej 60 Gy) i 4 cykli chemioterapii: cisplatyna/winorelbina (120 mg/m² cisplatyny co 3 tygodnie i 30 mg/m² winorelbiny 1. i 8. dnia każdego 21-dniowego cyklu leczenia). U wszystkich chorych na podstawie badania histopatologicznego potwierdzono raka płaskonabłonkowego, a przedstawione w pracy wyniki pochodzą od pacjentów sklasyfikowanych przed terapią jako NDRP T1-3.N0-3.M0. U chorych objętych badaniami nie stosowano leczenia adjuwantowego po zabiegu operacyjnym.

Bronchoskopia

Przed wykonaniem bronchoskopii wszystkich pacjentów poinformowano o założeniach badania i wyrazili oni świadomą zgodę na swój udział w badaniu. Przed bronchoskopią przeprowadzano wywiad, badanie ogólne, EKG i ocenę parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy. Bronchofibero-skopię wykonywano przy użyciu bronchofiberoskopu Olympus BF-1T30. Do premedykacji używano 0,5 mg atropiny i 5 mg midazolamu (20 min

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów

Table 1. Patient's characteristics

Numer pacjenta <i>Patient number</i>	Wiek (lata) <i>Age (yrs.)</i>	TNM przed resekcją <i>TNM prior to resection</i>	Rodzaj resekcji płuca <i>Type of resection</i>	Miejsce biopsji błony śluzowej oskrzela przed i po radio- i chemioterapii <i>Site of bronchial biopsy before and after radio- and chemotherapy</i>
1	69	T1M2M0	RLB	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
2	67	T1N1M0	RUL	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
3	53	T2N2M0	LP	Ostroga tchawicy <i>Carina</i>
4	49	T3N1M0	LP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
5	68	T2N0M0	RUL	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
6	66	T2N1M0	RP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
7	61	T1N2M0	RP	Ostroga tchawicy <i>Carina</i>
8	71	T2N0M0	LLL	Oskrzele główne lewe <i>Left main bronchus</i>
9	64	T2N1M0	LP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
10	66	T2N1M0	LLL	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
11	66	T2N1M0	RP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
12	57	T2N0M0	RP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
13	71	T1N0M0	RUL	Oskrzele główne prawe <i>Right main bronchus</i>
14	58	T2N1M0	RLB	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
15	70	T1N0M0	LLL	Oskrzele główne lewe <i>Left main bronchus</i>
16	63	T1N0M0	RUL	Oskrzele płatowe <i>Intermediate bronchus</i>
17	47	T2N1M0	RP	Oskrzele główne lewe <i>Left main bronchus</i>
18	63	T1N1M0	LLL	Oskrzele główne prawe <i>Right main bronchus</i>
19	65	T1N1M0	LLL	Oskrzele główne prawe <i>Right main bronchus</i>
20	66	T2N1M0	LP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
21	62	T2N1M0	RLB	Kikut oskrzela <i>Stump</i>
22	62	T2N1M0	LP	Oskrzele główne prawe <i>Right main bronchus</i>
23	65	T2N0M0	RP	Kikut oskrzela <i>Stump</i>

TNM (*tumor nodes metastases*) — klasyfikacja nowotworów; RLB (*right lower bilobectomy*) — usunięcie dwóch dolnych płatów płuca prawego; RUL (*right upper lobectomy*) — usunięcie górnego płata płuca prawego; RP (*right pulmonectomy*) — usunięcie płuca prawego; LP (*left pulmonectomy*) — usunięcie płuca lewego; LLL (*left lower lobectomy*) — usunięcie dolnego płata płuca lewego

przed zabiegiem), a do znieczulenia miejscowego jamy ustnej i gardła używano 10-procentowego roztworu lidokainy. W czasie bronchoskopii od zakwalifikowanych chorych pobierano materiał, utrwalało go w 10-procentowej buforowanej formalinie lub 95-procentowym etanolem i poddawano rutynowym badaniom pod mikroskopem świetlnym, oceniając typ histologiczny, inwazyjność i rozległość nacieczenia nowotworowego. Tkanek do badań ploidii DNA, ilości poli-ADP-rybozy i białka p53 pobierano z tej samej okolicy, co tkanek do badań patomorfologicznych. Pacjenci, u których nie potwierdzono NDRP, zostali wykluczeni z badania. Charakterystykę osób przyjętych do kliniki z powodu nawracającego raka płuca przedstawiono w tabeli 1. Tkanek do badań pobrano od pacjentów przed leczeniem i po terapii skojarzonej: radioterapią (30-dniowych 2-Gy frakcji do dawki całkowitej 60 Gy) i 4 cyklami chemioterapii: cisplatyna/winorelbina (120 mg/m² cisplatyny co 3 tygodnie i 30 mg/m² winorelbiny 1. i 8. dnia każdego 21-dniowego cyklu leczenia) [11].

Fragmentacja guza i barwienie DNA

Nieutralne próbki poddawano mechanicznej fragmentacji na sitach o średnicy 200 μm, a następnie 100 μm (Tissue Grinder Kit, Sigma) i wirowaniu różnicowemu na gradiencie Ficoll (Pharmacia) w celu oddzielenia komórek i fragmentów tkanki.

Badania ploidii DNA

Badania ploidii DNA wykonano w materiale składającym się głównie z jąder komórkowych i całych komórek, które zawieszano w buforze Tris (pH 7,5), zawierającym 20 μg/ml RNazy A i 0,1% Trytonu X-100, a następnie barwiono jodkiem propidyny (PI; 50 μg/ml) [12]. Dwanaście godzin później próby filtrowano przez sita 50 μm (Beckton-Dickinson) w celu usunięcia agregatów i badano na cytometrze przepływowym (Coulter Epics Elite flow cytometer, Coulter Electronics). W każdej próbie wykonywano 10 000 zliczeń przy długości fali 580 nm w skali liniowej do 1024 jednostek, przy minimalnym udziale dubletów. Fluorescencję pików G0/G1 ustawiono na 200. kanale, przy użyciu zdrowych komórek płuc pobranych od innych pacjentów w trakcie rutynowych operacji usunięcia guza. Histogramy fluorescencji DNA analizowano w zakresie ploidii, liczby komórek w fazie S (SPF, *S-phase fraction*) i G2/M, korzystając z programu Multicycle (Phoenix Flow Systems). Wskaźnik DNA (DI, *DNA index*) obliczano jako średnie położenie kanału pików G0/G1 guza podzielonego przez położenie kanału G0/G1 komórek

zdrowych. Histogramy opisywano jako diploidalne, kiedy pik G0/G1 był pojedynczy i symetryczny, a jego współczynnik zmienności (CV, *coefficient of variation*) był mniejszy niż 6. Próby opisywano jako aneuploidalne, kiedy wartość DI pików G0/G1 była większa od 0,8, ale mniejsza od 1,2 i wykazywała zmienną dystrybucję. Za tetraploidalne uznawano próby, których DI mieściło się w granicach 1,8–2,2.

Poli-ADP-ryboza

Ilość PAR oceniano techniką *dot-blotu*, przy użyciu mysich, monoklonalnych przeciwciał IgG przeciwko poli-ADP-rybozie (Clone 10H, Alexis Biochemicals) i przeciwciał wtórnych, związanych z peroksydazą [13]. Równe ilości homogenatu tkanek nanoszono na membrany nitrocelulozowe (Bio-Rad), suszono, zablokowano mlekiem (Bio-Rad) i inkubowano przez noc z pierwszym przeciwciałem (1:500). Kontrole stanowiły niespecyficzne przeciwciała tego samego rodzaju. Po wypłukaniu PBST (*phosphate buffered saline with tween*) i godzinnej inkubacji z wtórnym przeciwciałem (1:1000) *blot* płukano PBST i wywoływano za pomocą zestawu ECL (Amersham). Wielkość i gęstość plam analizowano za pomocą programu Image-Quant.

Ekspresja Ki-67

Ekspresja Ki-67 w tkance zbadano metodą immunohistochemiczną [14] przy użyciu poliklonalnych przeciwciał reagujących z ludzkim Ki-67 (Dako, Glostrup, Denmark). Zastosowano rozcieńczenie przeciwciała 1:500 (ABC Kit, Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Ekspresję Ki-67 oceniono pod mikroskopem jako odsetek pozytywnie zabarwionych jąder komórkowych.

Analiza białka p53

Próby inkubowano w buforze zawierającym 20 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM kwasu etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowego (EGTA), 50 mM fosforanu glicerolu, 1% Trytonu X-100, 10% glicerolu, 1 mM ditiotritolu (DTT, *dithiothreitol*), 1 mM fluorku fenylosulfonylowego (PMSF, *phenylmethanesulfonyl fluoride*), 10 mg/ml leupeptyny i 10 mg/ml aprotyniny, który powodował lizę komórek. Uzyskany homogenat poddawano elektroforezie na 10-procentowym żelu poliakrylamidowym 50 mg białka/próbę i transferowano na nitrocelulozę (BioRad). Błony blokowano 5-procentowym mlekiem w TBST (*tris-buffered saline with tween*) (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) i hybrydyzowano z mysimi, monoklonalnymi przeciwciałami IgG przeciwko natywnemu i zmutowanemu ludzkiemu p53

(Oncogen Research Products). Do detekcji używano zestawu ECL (Amersham). Prążki p53 skanowano i analizowano za pomocą programu Image Quant.

Białko p53 fosforylowane w pozycjach Ser15, Ser20 i Ser392

Białko p53 fosforylowane w pozycjach Ser15, Ser20 i Ser392 oznaczano metodą immunoprecypitacji i SDS PAGE [15]. Tkankę lizowano przez godzinę w zimnym buforze składającym się z 50 mM octanu Tris (pH 7,2), 1 mM PMSF, 1 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), 0,3 M NaCl, 1 mg/ml albuminy surowicy wołowej (BSA, *bovine serum albumin*), 1-procentowego NP-40, 0,2-procentowego NaN_3 , Na_3VO_4 do końcowego stężenia 1 mM i 5 mM NaF, a następnie wirowano 15 000 rpm przez 10 minut. Próby o jednakowej ilości białka (BCA assay kit, Pierce) inkubowano przez godzinę w 4°C z monoklonalnymi przeciwciałami IgG przeciwko ludzkim p53 (klon BP53.12; Oncogen Research Products), wiążącym natywne i zmutowane p53, a następnie dodawano nośniki sefaroza-białko A (Sigma). Reakcje kontrolne wykonywano w tych samych warunkach, ale przeciwciało zastępowano płodową surowicą wołową (FBS, *fetal bovine serum*). Kompleksy odwirowywano 11 000 × g, płukano 3-krotnie buforem do lizy, zawieszano w buforze SDS-PAGE *sample buffer* (BioRad), a próby o równej ilości białka p53 analizowano metodą elektroforezy na 10-procentowym żelu poliakrylamidowym (PAGE). Białko transferowano na nitrocelulozę i hybrydyzowano z króliczymi przeciwciałami wiążącymi białko p53 fosforylowane w pozycjach Ser15, Ser20 lub Ser392. Do detekcji używano systemu ECL.

W innym układzie — w próbach poddanych lizie i zawierających takie same ilości białka — precypitowano zmutowane białko p53 przy użyciu mysiego przeciwciała przeciw ludzkim zmutowanym p53 (izotop IgG1, klon PAb 240, NeoMarkers), inkubowano łagodnie, wytrząsając przez godzinę i ponownie inkubowano przez 3 godziny z nośnikiem sefarozy G (Sigma). Po odwirowaniu osad płukano i inkubowano z następnym przeciwciałem — monoklonalnym, mysim IgG, wiążącym zarówno zmutowane, jak i natywne ludzkie p53. Kompleksy wiążano za pomocą nośników sefarozowych A, sedymentowano, zawieszano w SDS-PAGE *sample buffer* (BioRad), równoważono zawartość p53 i poddawano elektroforezie w warunkach opisanych wyżej. Żele barwiono barwnikiem Comassie (BioSafe, BioRad) i analizowano ilościowo za pomocą programu Image Quant.

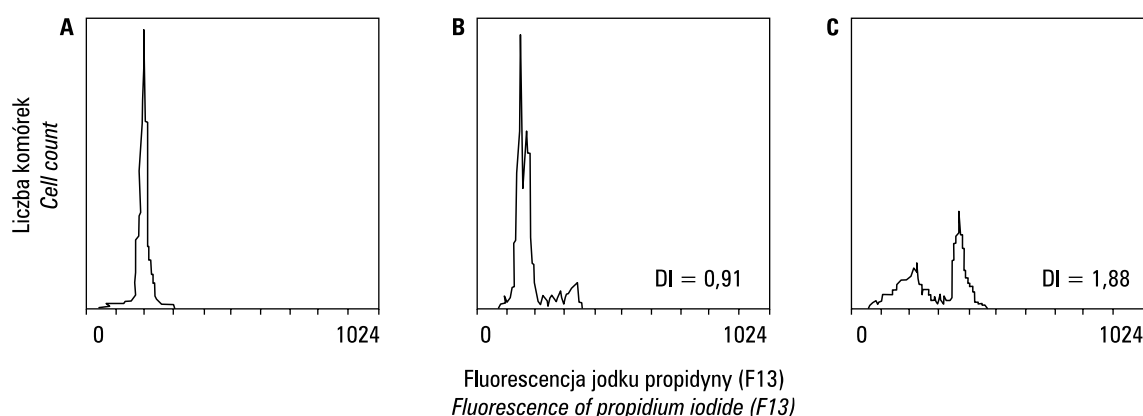
Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano pakiet statystyczny Statistica PL, a także użyto testów dystrybucji Kołmogorowa-Smirnowa oraz Wilcoxa do porównania średnich ekspresji p53 w próbach przed leczeniem i po nim. Test regresji liniowej i korelacji zmian ekspresji p53, p53-Ser15~P, p53-Ser20~P, Ki-67 i PAR obliczano za pomocą testu Pearsona.

Wyniki

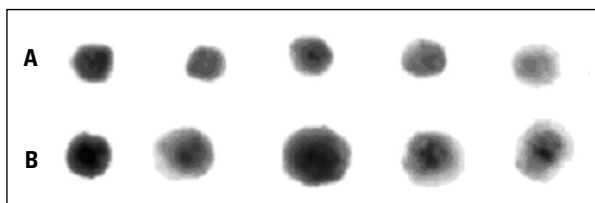
Ploidia DNA i cykl komórkowy

Warunki analizy spełniały 22 histogramy fluorescencji DNA; 4 z nich uznano za diploidalne, 7 za aneuploidalne i 1 za tetraploidalny (ryc. 1A–C).



Rycina 1. Reprezentatywne histogramy fluorescencji DNA komórek nawrotowego niedrobnokomórkowego raku płuca: **A.** Histogram euploidalny; **B.** Histogram aneuploidalny; **C.** Histogram tetraploidalny; terapia nie zmieniła ploidii DNA, ale modyfikowała cykl podziału komórek w ten sposób, że liczba komórek będących w poszczególnych etapach cyklu komórkowego była różna przed terapią i po niej

Figure 1. Representative DNA fluorescence histograms from recurrent squamous cell lung cancer patients; **A.** Euploid; **B.** Aneuploid; **C.** Tetraploid histograms; radiotherapy/cisplatin/vinorelbine treatment altered particular cell cycle fractions but did not change DNA ploidy patterns



Rycina 2. Ilość poli-ADP-rybozy (*dot bloty*) w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca przed terapią (A) i u tych samych pacjentów po radioterapii i leczeniu cisplatyną/winorelbina (B); po terapii ilości poli-ADP-rybozy były większe o około 169% ($p < 0,01$) niż przed terapią

Figure 2. Representative dot-blot spots of poly(ADP-ribose) assay in bronchial biopsy specimens from random recurrent squamous cell lung cancer patients (A) and the same patients treated with radio/cisplatin/vinorelbine (B); mean relative poly(ADP-ribose) content was higher ($p < 0.01$) in group B (by 169%) comparing to group A

Klasyfikacja nie zmieniała się istotnie po leczeniu. Analiza ilościowa cyklu podziału komórek wykazała, że komórki fazy S (SPF, *S-phase fraction*) stanowiły $8,7 \pm 3,4\%$ wszystkich analizowanych komórek, natomiast komórki w fazie G2/M stanowiły frakcję $4,8 \pm 2,9\%$. Odpowiednie wartości SPF i G2/M po terapii wynosiły $13,2 \pm 4,8\%$, (52-procentowy wzrost, $p < 0,05$) i $2,2 \pm 2,1\%$ (54-procentowy spadek, $p < 0,05$). Z uwagi na wysoki stopień zmienności i niewielką grupę pacjentów nie przeprowadzono odrębnej analizy pacjentów euploidalnych i aneuploidalnych.

Ekspresja Ki-67

Ki-67 zidentyfikowano u 13 pacjentów (56,5%) przed terapią i u 12 po terapii (52,2%). Średnia ekspresja Ki-67 przed leczeniem wynosiła $49,5 \pm 17,7$, natomiast po — $33,9 \pm 12,7$.

Poli-ADP-ryboza

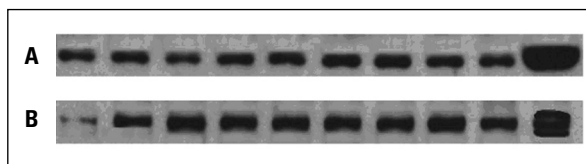
Poli-ADP-rybozę wykryto we wszystkich badanych próbkach, a jej ilość była znacząco zwiększona po terapii. Na rycinie 2 ukazano ilości PAR przed (A) i po (B) leczeniu (*dot-blot*). U pacjentów po terapii wskaźnik PAR był wyższy o około 169% ($p < 0,05$) niż przed nią.

Obecność białka p53

Obecność białka p53 stwierdzono w 23 analizowanych próbkach: 11 przed terapią (ryc. 3) i 12 po terapii. U około 77% pacjentów białko p53 było zmutowane (ryc. 4).

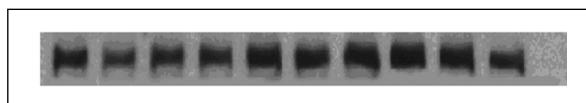
Fosforylacja p53

Obecność białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser392 stwierdzono w 11 analizowanych próbkach (ryc. 5). Terapią zwiększyła relatywną ekspresję



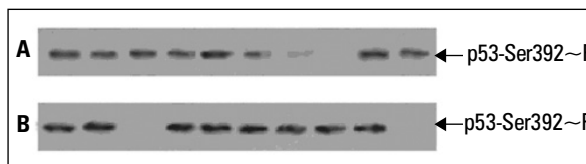
Rycina 3. Ekspresja białka p53 (natywne i zmutowane) w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca przed leczeniem (A) i po radioterapii połączonej z leczeniem cisplatyną i winorelbina (B); białko p53 po immunoprecypitacji poddano elektroforezie na żelu poliakrylamidowym i zabarwiono odczynnikiem Comassie w obecności białka wzorcowego; średnia relatywna ekspresja p53 u pacjentów po terapii była o 61% wyższa ($p < 0,05$) w porównaniu z ekspresją tego białka przed leczeniem

Figure 3. Representative analysis of the p53 protein levels (wild type + mutated) in lung tissue taken from recurrent squamous cell lung cancer patients (in random order) before (A) and after (B) radio/cisplatin/vinorelbine therapy; the p53 protein was immunoprecipitated, run on SDS/PAGE and revealed using Comassie stain; positions of standard p53 protein (LabVision) are shown; mean relative p53 levels were 61% higher after the therapy ($p < 0.05$)



Rycina 4. Ekspresja zmutowanego białka p53 (pAb 240) w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca — białko p53 poddano immunoprecypitacji z przeciwciałem pAb 240, elektroforezie na żelu poliakrylamidowym, a następnie zabarwiono odczynnikiem Comassie; niezależnie od terapii u 77% pacjentów wykryto zmutowaną formę białka p53

Figure 4. Representative picture from determination of mutated p53 protein (pAb 240) in recurrent squamous cell lung cancer patients after radio/cisplatin/vinorelbine therapy; the mutated p53 protein was immunoprecipitated with pAb 240, the precipitate was run on SDS/PAGE and stained with Comassie stain; irrespectively on the therapy most patients (77%) had p53 protein identified as mutated

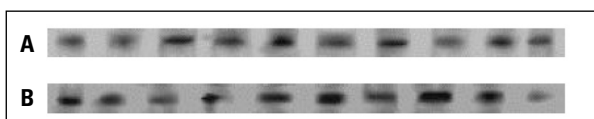


Rycina 5. Analiza ekspresji białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser392 w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów przed terapią (A) i po niej (B); białko p53 poddano immunoprecypitacji i elektroforezie na żelu poliakrylamidowym, a następnie hybrydyzowaniu z przeciwciałem specyficznym dla p53-Ser392~P; po terapii średnia ekspresja p53-Ser392~P była wyższa o 71% ($p < 0,05$)

Figure 5. Immunoprecipitation/Western blot analysis of the p53 protein phosphorylated at Ser392 in recurrent squamous cell lung cancer patients before (A) and after (B) radio/cisplatin/vinorelbine therapy; the p53 protein was immunoprecipitated by monoclonal Ab and the precipitate was analysed on an SDS/PAGE. The transferred bands were hybridised with p53-Ser-392~P Ab and revealed using ECL system; mean relative p53-Ser392~P level was 71% higher after therapy ($p < 0.05$)

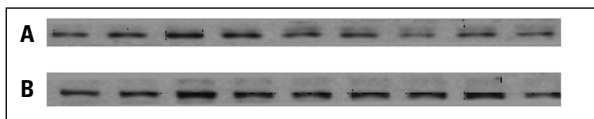
p53-Ser392~P o 71% ($p < 0,05$). Analiza białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser15 wykazała obecność białka u 12 pacjentów przed terapią (relatywna ekspresja $92,7 \pm 41,3$) i u 14 osób po leczeniu (relatywna ekspresja $133,7 \pm 86,8$). Różnica nie była istotna statystycznie (ryc. 6).

W przypadku białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser20 16 pacjentów przed terapią i 18 pacjentów po leczeniu wykazywało ekspresję tego białka. W tej ostatniej grupie ilość p53-Ser20~P była wyższa niż przed terapią o około 57% ($p < 0,05$) (ryc. 7).



Rycina 6. Analiza ekspresji białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser15 w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów przed terapią (A) i po niej (B); białko p53 poddano immunoprecypitacji i elektroforezie na żelu poliakrylamidowym, a następnie hybrydyzowaniu z przeciwciałem specyficznym dla p53-Ser15~P; po terapii ekspresja fosforylowanego białka p53 nie zmieniła się

Figure 6. Immunoprecipitation/Western blot analysis of the p53 protein phosphorylated at Ser15 in recurrent squamous cell lung cancer patients (in random order) before (A) and after (B) radio/cisplatin/vinorelbine therapy; the p53 protein was immunoprecipitated by monoclonal Ab recognizing both wild type and mutated p53 and the precipitate was analysed on an SDS/PAGE and WB; the transferred bands were hybridised with p53-Ser15~P Ab and revealed using ECL system; mean relative p53-Ser15~P levels were similar in both groups



Rycina 7. Analiza ekspresji białka p53 fosforylowanego w pozycji Ser20 w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów przed terapią (A) i po niej (B); białko p53 poddano immunoprecypitacji i elektroforezie na żelu poliakrylamidowym, a następnie hybrydyzowaniu z przeciwciałem specyficznym dla p53-Ser20~P; ekspresja fosforylowanego białka p53 po terapii była wyższa o około 57% niż przed terapią ($p < 0,05$)

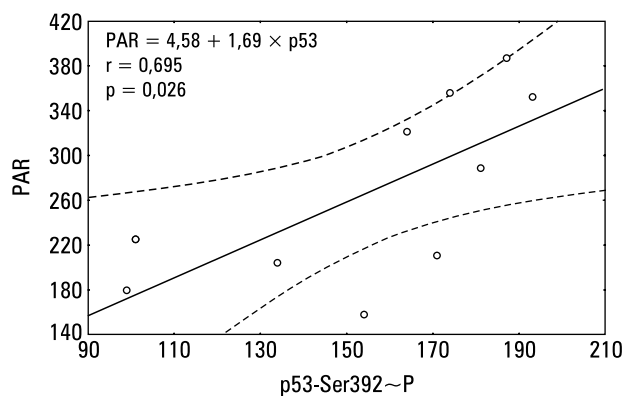
Figure 7. Immunoprecipitation/Western blot analysis of the p53 protein phosphorylated at Ser20 in recurrent squamous cell lung cancer patients (in random order) before (A) and after (B) radio/cisplatin/vinorelbine therapy; the p53 protein was immunoprecipitated by monoclonal Ab recognizing both wild type and mutated p53 and the precipitate was analysed on an SDS/PAGE and WB; the transferred bands were hybridised with p53-Ser20~P Ab and revealed using ECL system; mean relative p53 Ser20~P levels was about 57% higher in group B ($p < 0.05$)

Analiza regresji

Zmiany ilości całkowitego p53 u poszczególnych pacjentów nie korelowały ze zmianami PAR ani ze zmianami p53-Ser392~P. Analiza regresji i korelacji nie wykazała zależności między zmianami p53-Ser392~P i PAR ($r = 0,15$) przed terapią, ale po leczeniu zmiany obu parametrów dobrze korelowały ze sobą ($r = 0,70$; $p < 0,05$; ryc. 8). Zmiany ekspresji białka p53 nie korelowały ze zmianami ilości PAR ani z ekspresją p53-Ser20~P przed leczeniem, ale u chorych po terapii zaobserwowano pozytywną korelację między PAR i ekspresją p53 (ryc. 9) oraz między p53 i p53-Ser20~P (ryc. 9). Stwierdzono również obecność negatywnej zależności między ekspresją Ki-67 i zmutowanego p53 przed terapią ($r = -0,58$), natomiast po leczeniu Ki-67 korelował ujemnie z PAR ($r = -0,62$), p53 ($r = -0,49$), p53-Ser15~P ($r = -0,46$) i p53-Ser20~P ($r = -0,39$) (ryc. 10).

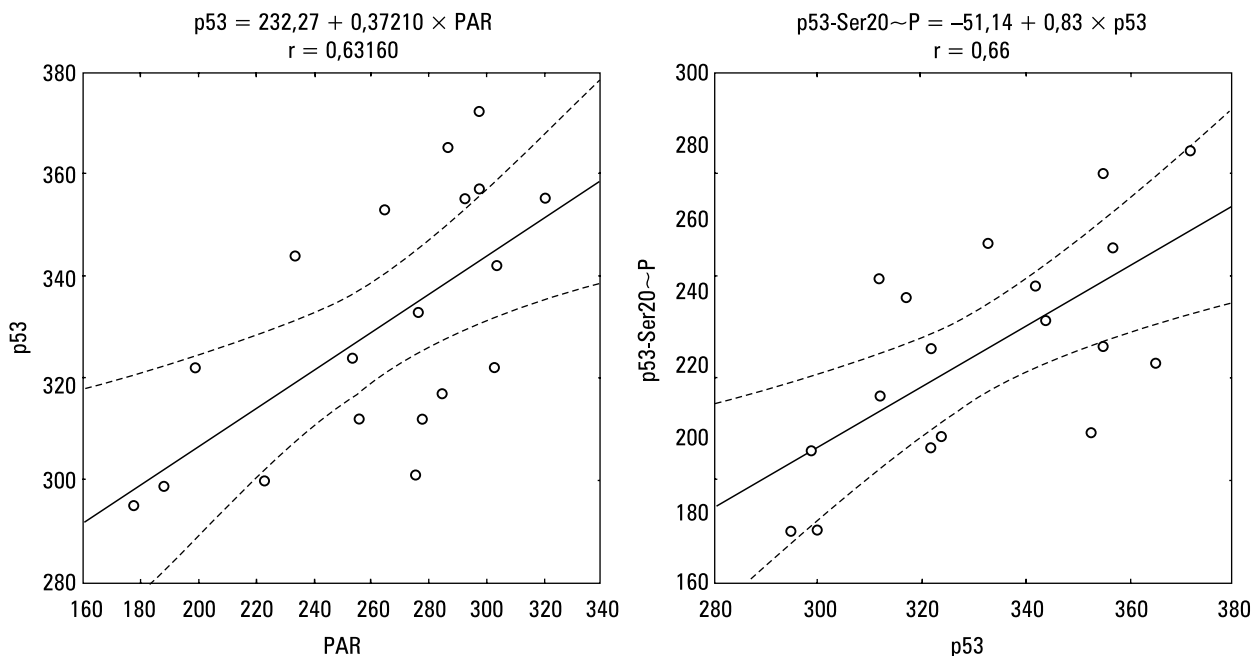
Omówienie

Terapia raka płuca nadal w znacznym stopniu opiera się na niespecyficznym uszkodzeniu DNA komórek guza przez napromieniowanie chorej tkanki i zastosowaniu leków uszkadzających DNA. Jeśli w przebiegu terapii dochodzi do poważnych uszkodzeń DNA, aktywowane zostają procesy samozniszczenia. Apoptozie komórek guza towarzyszy aktywacja szeregu szlaków metabolicznych,



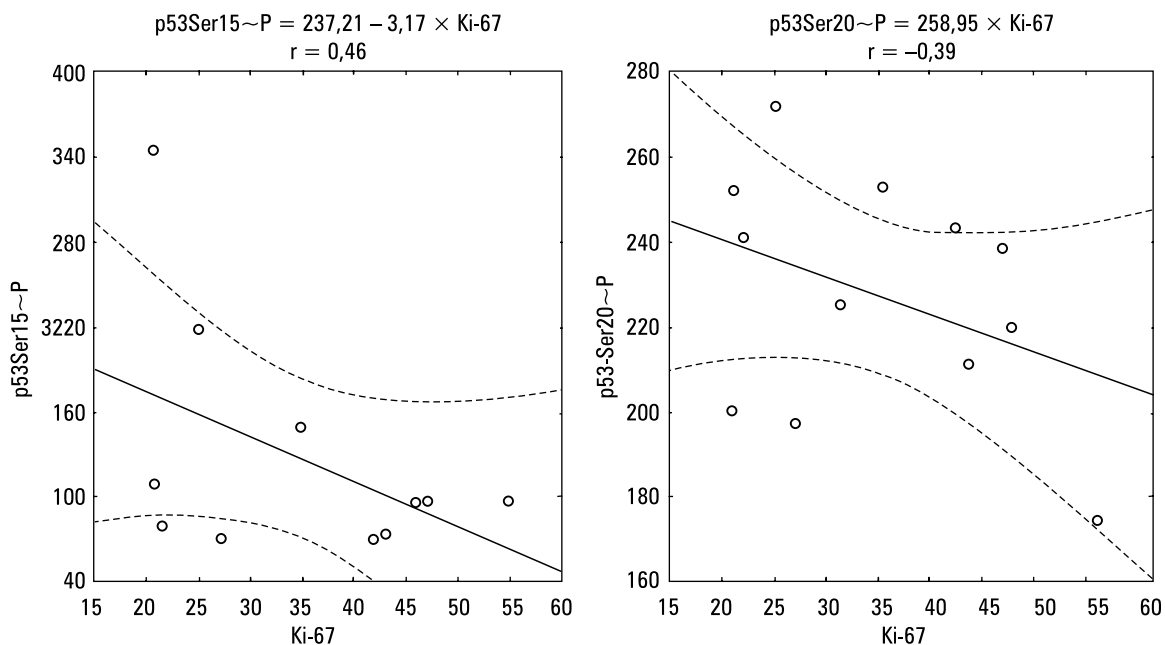
Rycina 8. Analiza regresji i korelacji między zmianami ilości poli-ADP-rybozy (PAR) i zmianami ekspresji p53-Ser393~P w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów po terapii; po radioterapii połączonej z leczeniem cisplatiną i winorelbina zmiany obu parametrów korelowały ze sobą (współczynnik korelacji — $r = 0,70$; $p < 0,05$)

Figure 8. Regression and correlation analyse between poly-ADP-ribose (PAR) levels and p53Ser-393~P levels in recurrent squamous cell lung cancer patients after radiotherapy/cisplatin/vinorelbine evidenced good correlation (correlation coefficient — $r = 0.70$, $p < 0.05$)



Rycina 9. Analiza regresji i korelacji między zmianami ilości p53 i poli-ADP-rybozy (PAR) oraz zmianami ekspresji p53 i p53Ser20~P w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów po terapii; zmiany ekspresji p53 korelowały z PAR ($r = 0,63$; $p < 0,05$) i z p53-Ser20~P ($r = 0,66$; $p < 0,05$)

Figure 9. Regression and correlation analyse between p53 levels and poly-ADP-ribose (PAR) levels in recurrent squamous cell lung cancer patients; there was good correlation of p53 with PAR and with p53-Ser20~P levels after radiotherapy/cisplatin/vinorelbine treatment ($r = 0.63$, $p < 0.05$ and $r = 0.66$, $p < 0.05$ respectively)



Rycina 10. Analiza regresji i korelacji między zmianami ilości Ki-67 i p53-Ser15~P oraz Ki-67 i p53-Ser20~P w komórkach nawrotowego niedrobnokomórkowego raka płuca u pacjentów po terapii; stwierdzono obecność ujemnej korelacji (odpowiednio $r = -0,46$; $p < 0,05$ i $r = -0,39$; $p < 0,05$)

Figure 10. Regression and correlation analyse between Ki-67 and p53-Ser15~P or p53-Ser20~P levels in recurrent squamous cell lung cancer patients evidenced negative correlation ($r = -0.46$, $p < 0.05$ and $r = -0.39$, $p < 0.05$, respectively) after radiotherapy/cisplatin/vinorelbine treatment

w tym — między innymi — reakcji poli-ADP-rybozylacji [10]. Wyniki badań autorów wskazują, że radioterapia połączona z leczeniem cisplatyną i winorelbiną nie zmienia ploidy DNA, chociaż jednocześnie dochodzi do akumulacji PAR, natomiast powoduje akumulację komórek będących w fazie S podziału komórkowego. Również frakcja komórek będących w fazie G2/M jest mniejsza po zastosowanej terapii. Zahamowanie proliferacji jest widoczne także w badaniach antygeny proliferacji Ki-67, co może wskazywać na efektywność terapii.

Białko p53, zwane strażnikiem genomu, jest niezwykle ważnym elementem sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, ale jego funkcja w komórkach nowotworowych jest często inna niż w komórkach zdrowych. Białko to nie funkcjonuje prawidłowo w komórkach guza, ponieważ często ulega mutacji [16]. Stabilizuje to cząsteczkę tego białka, ale może pozbawić je istotnych funkcji. W badaniach autorów ilość białka p53 w komórkach NDRP po leczeniu była znacząco większa niż u chorych przed terapią, jednak w znacznej części białko to było zmutowane. Zatem autorzy podjęli próbę oceny wzajemnych zależności między biochemicznymi wskaźnikami progresji choroby i niektórymi posttranslacyjnymi modyfikacjami białka p53, od których może zależeć jego prawidłowe działanie.

Proliferacja komórek ściśle wiąże się z ekspresją antygeny proliferacji Ki-67. Podczas interfazy Ki-67 jest zlokalizowany w jądrze komórki, ale ulega relokalizacji podczas mitozy [17]. Około 50% pacjentów objętych badaniami autorów wykazywało ekspresję Ki-67 i zmniejszała się ona w czasie terapii. Może to być spowodowane reakcją guza na leczenie, należy jednak pamiętać, że niektóre komórki nowotworowe nie wykazują cech apoptozy, co bardzo często wiąże się z poważnymi zmianami mechanizmów naprawczych DNA [18]. W zdrowych komórkach białko p53 indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego i/lub apoptozę i taki mechanizm zapewnia integralność genomu *in vivo* [16]. W czasie uszkodzenia DNA aktywność p53 wzrasta, a białko jest aktywowane poprzez fosforylację przy udziale szeregu kinaz [19]. Okazało się, że fosforylacja miejsc N-końcowych białka p53 zmienia procesy transkrypcji, ale również wpływa na wiązanie Mdm2, który jest katalizatorem degradacji białka [2]. Z kolei fosforylacja (lub acetylacja) reszt serynowych C-końca p53 zmienia jego wiązanie [20–22]. W piśmiennictwie jest coraz więcej danych eksperymentalnych dotyczących posttranslacyjnych modyfikacji białek, ale wciąż brakuje danych klinicznych. Również znaczenie kliniczne aktywacji p53 nie jest jasne. Wydaje się, że zarówno N-końcowe, jak i C-końcowe fosfory-

lacje mogą mieć znaczenie dla przebiegu choroby i efektywności terapii, ponieważ autorzy wykazali, że ilość p53-Ser392~P po terapii uszkadzającej DNA korelowała ze stopniem umieralności komórek. U większości pacjentów badanych przez autorów p53 było białkiem zmutowanym, a mimo to terapia prowadziła do akumulacji tego białka w komórkach. Wydaje się, że pozytywna korelacja zmian ilości p53 fosforylowanego w pozycjach Ser15 i Ser20 z ekspresją p53 może wskazywać na stabilizację aktywowanego p53, natomiast negatywna korelacja aktywowanych białek dodatnich dla Ki-67 z p53-Ser20~P wskazuje najprawdopodobniej na antyproliferacyjny efekt takiej aktywacji.

Wnioski

Prawidłowa funkcja p53 zależy także od polimerazy ADP-rybozy, ponieważ enzym ten nie tylko stabilizuje białko [23], ale także reguluje jego aktywację transkrypcyjną [24]. Obserwacje autorów wskazują na możliwość takiego działania, jednak potwierdzenie tego faktu wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Dane z piśmiennictwa wskazują na posttranslacyjne modyfikacje p53 w trakcie terapii, ale są one niewystarczające [14, 18, 25]. Dlatego też należy przeprowadzić kolejne badania dotyczące tego zagadnienia.

Piśmiennictwo

1. Giaccia A.J., Kastan M.B. The complexity of p53 modulation emerging patterns from divergent signals. *Genes. Dev.* 1998; 12: 2973–2983.
2. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296–299.
3. Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4855–4878.
4. Lee S., Elenbaas B., Levine A., Griffith J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995; 81: 1013–1020.
5. Lian F., Li Y., Bhuiyan M., Sarkar F.H. p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutr. Cancer* 1999; 33: 125–131.
6. Inoue A., Narumi K., Matsubara N. i wsp. Administration of wild type p53 adenoviral vector synergistically enhances the cytotoxicity of anti-cancer drugs in human lung cancer cells irrespective of the status of p53 gene. *Cancer Lett.* 2000; 157: 105–112.
7. Luciani M.G., Hutchins J.R., Zheleva D., Hupp T.R. The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for cyclin A. *J. Mol. Biol.* 2000; 300: 503–518.
8. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. Regulation of p53 Sequence-specific DNA-binding by Covalent Poly(ADP-ribose)ylation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36425–36430.
9. Tong W.M., Cortes U., Wang Z.Q. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1552: 27–37.
10. Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Luo R., Smulson M.E. Poly(ADP-ribose)ylation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 2190–2194.
11. Wozniak A.J., Crowley J.J., Balcerzak S.P. i wsp. Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell-lung-cancer: a Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2459–2465.

12. Nagai S., Chiba W., Ikeda S. I wsp. Flow cytometric analysis of the DNA content of resected non-small cell lung cancer with reference to long-term follow-up. *Gan-To-Kagaku-Ryoho*. 1996; (supl. 2): 130–134.
13. Pfeiffer R., Brabeck C., Burkle A. Quantitative nonisotopic immuno-dot-blot method for the assessment of cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity. *Anal. Biochem*. 1999; 275: 118–122.
14. Valente G., Orecchia R., Gandolfo S. i wsp. Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? *J. Clin. Pathol*. 1994; 47: 109–112.
15. Keller D., Zeng X., Li X. i wsp. The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999; 261: 464–471.
16. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2000; 910: 121–137.
17. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol*. 2000; 182: 311–322.
18. Lakin N.D., Jackson S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18: 7644–7655.
19. Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S. i wsp. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes. Dev*. 1998; 12: 2831–2841.
20. Sakaguchi K., Saito S., Higashimoto Y., Roy S., Anderson C.W., Appella E. Damage-mediated Phosphorylation of Human p53 Threonine 18 through a Cascade Mediated by a Casein 1-like Kinase. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 9278–9283.
21. Zhang Y., Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 2001; 292: 1910–1915.
22. Appella E., Anderson C.W. Signaling to p53: breaking the post-translational modification code. *Pathol. Biol. (Paris)* 2000; 48: 227–245.
23. Unger T., Juven-Gershon T., Moallem E. i wsp. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*. 1999; 18: 1805–1814.
24. Jabbur J.R., Huang P., Zhang W. Enhancement of the antiproliferative function of p53 by phosphorylation at serine 20: an inference from site-directed mutagenesis studies. *Int. J. Mol. Med*. 2001; 7: 163–168.
25. Appella E., Anderson C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem*. 2001; 268: 2764–2772.