

Pregledni članak

ACTA FAC.MED.NAISS.2002; 19 (1), 19-22

Stevo Najman

Institut za biologiju sa humanom genetikom, Medicinski fakultet, Niš

MUTACIJE GENA *TP53* U KARCINOGENEZI

UVOD

Činjenica daje gubitak funkcije gena *TP53* za-beležen u više od polovine humanih kancera čini vrlo značajnim razmatranje uloge ovog gena u kar-cinogenezi. Mutacije gena *TP53* nađene su u skoro svim tipovima humanih kancera, a učestalost varira među različitim tipovima kancera. Ove mutacije su prisutne u kancerima mokraćne bešike, ezofagusa, kostiju, kolona, mozga, cerviksa, jetre, dojki, lar-inksa, pluća, hematopoetskih ćelija, limfoidnog tkiva, ovarijuma, kože, pankreasa, želuca, endometri-juma uterusa, tiroidne žlezde. Posebno su česte mutacije gena *TP53* u kolorektalnim kancerima (oko 70%), kancerima pluća (oko 50%) i kancerima dojke (oko 40%).

Osim mutacija, za mnoge tipove tumora karakteristična je visoka ekspresija gena *TP53*. Njegova prekomerna ekspresija može biti prognostički znak za više kancera, kao što su kancer dojke, ovarijuma, endometrijuma, pluća, ezofagusa, karcinom mokraćne bešike, maligni melanom. Iako se prekomerna ekspresija ili mutirano stanje nalazi kasno u karcinomu kolona, ove njegove karakteristike se zapažaju mnogo ranije u drugim kancerima. Tako npr. p53 se akumulira u oko 30% ranog displa-stičnog tkiva pluća, oko 68% karcinoma pluća i u 80% invazivnih tumora, što može biti dijagnostički marker za ove bolesti.

BIOLOŠKA ULOGA P53

Protein od 53 kDa, kasnije poznat kao p53, prvi put je otkriven kao komponenta kompleksa SV40 u transformisanim ćelijama ovim virusom (1). Kasnije je p53 nađen u različitim transformisanim mišjim ćelijskim linijama, kultivisanim humanim tumorskim ćelijama i u mišjim tumorima indukova-nim hemijski, radijacijom ili virusima. Ulogu p53 u karcinogenezi još više je potencirala činjenica da transfekcija gena *TP53* imortalizuje i transformiše ćelije (2, 3), te da kooperiše sa *ras-om* u indukciji transformacije (4). Zato je p53 prvobitno smatran za onkogeni protein. Postepeno su se redala saznanja da on suprimira onkogenu transformaciju ćelije, a da je njegova transformišuća sposobnost posledica mutacije. Danas je jasno da nemutirani, divlji tip gena *TP53*, vrši negativnu kontrolu ćelijske proliferacije i suprimira ćelijsku transformaciju i tumorogenezu, odnosno da vrši tipičnu ulogu tumor supresornog gena (5, 6, 7).

Delovanje p53 na molekul DNK pokušava se objasniti preko nekoliko mehanizama. Jedan od njih objašnjava delovanje p53 kao transkripcionog faktora za gene koji deluju supresivno na ćelijski rast. Prema drugom objašnjenju njegovo inhibitorno delovanje na transkripciju vrši se preko inhibicije vezivanja **TATA** boks-vezujućih proteina za promotor gena, a postoji i objašnjenje da p53 direktno ometa replikaciju interreagujući sa replikacijskim aparatom.

Protein p53 je multifunkcionalan. Uloga transkripcionog faktora je jedna od njegovih brojnih uloga. Ovu ulogu vrši tako što se tetramer p53 veže za DNK, pri čemu može da aktivira transkripciju gena koji su nishodno od p53 vezujućeg mesta. Protein p53 reguliše transkripciju više gena koji su odgovorni za odvijanje replikacije DNK. Zaustavljanje rasta koje je indukovano aktivacijom p53 pre ili blizu restriktione tačke u kasnom G₁ periodu je udruženo sa smanjenjem transkripcije gena, koji su uključeni u replikaciju DNK i ćelijsku proliferaciju, kao što su geni za histon H₃, ćelijski nuklearni antigen (PCNA), DNK polimerazu alfa i *b-myb*. Za ove regulatorne događaje, p53 mora zauzeti određene konformacione strukture, što je jasno modulirano fosforilacionim stanjem. Vezivanje na DNK, omogućuje njegova oligomerizovana forma. Mutantni p53 ne može da postigne odgovarajuću konformaciju, a sa druge strane formira oligomere sa divljim p53 i na taj način ga blokira.

Druga važna uloga p53 je izgleda mnogo šira i sumarno je opisana kao "čuvar genoma". Ova čuvarska funkcija se ogleda u zaustavljanju replikacije oštećene DNK. Normalne ćelije sa oštećenom DNK se zadrže na kontrolnoj tački na prelazu G₁ u S period ćelijskog ciklusa sve dok se oštećenje ne popravi. Ćelije koje su izgubile gen *TP53* ili sadrže njegovu mutantnu formu, neće biti zadržane na G₁. Normalno p53 vrši monitoring integriteta genoma i funkcioniše kao "molekularni policajac". Ako je DNK oštećena, tada se p53 akumulira i zaustavlja replikaciju DNK i deobu ćelije za vreme dok se DNK ne repariše. Ako su reparacioni mehanizmi neuspešni, p53 okida apoptotični odgovor, a konačan rezultat je smrt ćelije. Ali, ako je p53 izgubljen ili je mutirao, ćelija replikuje leziju na

DNK, ona se zatim prenosi na ćerke ćelije, koje mogu imati prednost u preživljavanju u odnosu na normalne ćelije. Ovakve ćelije su genetički manje stabilne, pa akumuliraju mutacije i preuređenja gena, dovodeći do generisanja malignog stanja koje se onda još pojačava, što se vidi kroz progresiju tumora (8, 9, 10).

Posmatranje uloge p53 kao regulatornog proteina za rast ćelija nameće činjenica da ima kratak poluživot, nuklearnu lokalizaciju i aktivnost transkripcionog faktora, te da je njegova sinteza u ćelijama sa oštećenom DNK pojačana. Da od gena *TP53* zavisi odgovor ćelije na oštećenje DNK, vidljivo je iz činjenice da ćelije koje imaju mutiran ovaj gen ne odgovaraju adekvatno na defekte DNK. Protein p53 u stvari povećava osetljivost na jonizujuće zračenje i antikancerske lekove kao što su 5-fluorouracil, etoposid i doksorubicin. Sa druge strane, odsustvo p53 ili njegove funkcije povećavaju rezistenciju na jonizujuće zračenje i hemoterapeut-ske agense.

Apoptoza je važan nivo kontrole tkivnog homeostazisa koji štiti organizam od posledica prirodne selekcije među ćelijama, a uzrokovana je de-lovanjem p53. Ova funkcija dolazi do izražaja posle izlaganja ćelija radijaciji, citostaticima i generalno, agensima koji oštećuju DNK. Gen *bcl-2* sa anti-apoptotičkom funkcijom je pod nishodnom regulacijom gena *TP53* (11, 12).

GEN *TP53*

Gen *TP53* je mapiran na hromozomu 17 (17p13). Gen sadrži 10 egzona i eksprimiran je u svim telesnim ćelijama, ali u većini tkiva na vrlo niskom nivou ekspresije. Njegov produkt, humani protein je izgrađen od 393 aminokiseline i sadrži 9 serinskih rezidua za potencijalnu fosforilaciju. Jedna od rezidua, serin 316, se fosforiliše ciklin zavisnom kinazom (13). Blizu fosforilacionog mesta je domen preko kojeg se vrši nuklearna trans-lokacija zavisna od signala koji regulišu ćelijski ciklus. Nuklearna lokalizacija je značajna za funkciju p53. U nekim humanim kancerima, defekt funkcije

p53 je posledica njegovog zadržavanja u citoplazmi zbog nesposobnosti da se translocira u jedro ćelije.

Među vrlo različitim životinjskim vrstama postoji prilično velika homologija p53. Tako npr. između proteina žabe *Xenopus-a* i čoveka postoji oko 55% homolognosti, a neki delovi proteina su čak 100% homologni. Karakteristično je da su ovi visokohomologni regioni najčešće pogođeni mutacijama na genu *TP53*, što upućuje na to da ovi regioni imaju posebno značajnu ulogu u regulatornim funkcijama p53.

RASPROSTRANJENOST MUTACIJA GENA *TP53*

U ćeliji može izostati funkcija p53, ako je gen *TP53* mutiran, eliminisan iz ćelije delecijom ili zbog delovanja inhibitora kao što su produkt gena *MDM₂* ili protein *E₆* papiloma virusa.

Preko 50% humanih kancera ima mutacije *TP53* (13) i one predstavljaju najčešće genetske pro-mene nađene u kancerima. Među mutacijama ovog gena neke su posebno česte. U karcinomima su najčešće misens point mutacije. S druge strane, u sarkomima su najčešće delecije, insercije i preuređenja gena, a point mutacije su vrlo retke. U nekim sarkomima su nađene amplifikacije onkogeno *MDM₂*, čiji produkt inaktivira p53. Mutacije su različito distribuirane po tkivima. Tako npr. u oko 53% kancera jetre u područjima endemičnim za hepatit B i izloženost aflatoksinu B, sreće se mutacija u kodonu 249.

Mutacije p53 mogu biti i germinativne. Primer je Li-Fraumeni sindrom koji se javlja vrlo često u nekim porodicama. Mnogi članovi ovih porodica imaju misens i nonsens mutacije u jednom od alela *TP53*, a karakteriše ih sklonost ka osteosarkomima, adrenokortikalnim karcinomima ili kancerima mozga, često vrlo rano tokom života (10, 14, 15). Iako se mutacije *TP53* često nalaze u kanceru kolona, ovaj tip kancera nije prevalentan u pomenutim porodicama, što ukazuje na to da germinativne mutacije čine ipak neka tkiva podložnijim za kasnije somatske mutacije od drugih tkiva, ili da neka tkiva imaju dodatne regulatome mehanizme za regulaciju ćelijske proliferacije.

Postoje najmanje tri fenotipska efekta mutacija *TP53*. Jedan je gubitak funkcije što je posledica misens mutacije koja ukida sposobnost p53 da blokira ćelijsku deobu ili ćeliju vraća u normalan iz transformisanog fenotipa. Protein p53 može zbog mutacije da stekne novu funkciju da indukuje tumorski fenotip ili da prevlada normalnu supresornu funkciju p53, što se ponekad zove dominantni negativni efekat. Ovaj efekat može biti objašnjen time da je mutantni protein manje podložan degradaciji od normalnog (16).

TIPOVI MUTACIJA P53

Tumori pluća sadrže bazne tranzicije i trans-verzije, ali tumori kolona primarno imaju tranziciju baza C→T. Dinukleotidi CpG su vrlo česta mesta mutacija. Ovo nameće pitanje da li obrasci tkivno-specifične metilacije C u CpG dubletima može biti od značaja za tip mutacija. Naime, zna se da metilacija C u CpG mestima pokazuje veću stopu mutiranja nego na mestima sa nemetilisanim C. Ovo

takođe usmerava pažnju i na vezu pogođenih tkiva i tipa karcinogena. U tom svetlu se mogu videti podaci da više od polovine hepatocelularnih karcinoma (HCC) u područjima izloženim aflatoksinu B₁ imaju transverziju G→T u trećoj poziciji kodona 249, što za posledicu ima zamenu arginina serinom (17). Ovo takođe može biti demonstrirano izlaganjem humanih hepatocita aflatoksinu u ćelijskoj kulturi. Ali, ako su tkiva HCC uzeta od pacijenata, koji žive u područjima slabo izloženim aflatoksinu, onda se u genu *TP53* retko javlja transverzija G→T, ali su mutacije nađene u drugim regionima gena. Iako je

očigledno da različiti karcinogeni mogu uzrokovati promene na različitim mestima u genu, krajnji rezultat je uvek inaktivacija p53 (18).

Posebno je visoka učestalost transverzije G→T u genu *TP53* u humanim kancerima, čija se etiopatogeneza vezuje za pušenje duvana, kao što su kanceri pluća i ezofagealni karcinomi. Benzopiren (BP), koji je komponenta duvanskog dima proizvodi incidencu od oko 70% transverzija G→T u in-dukovanim karcinomima kože miša. Sličnu frekvenciju mutacija, ali sa nižom stopom transverzija G→T karakterišu tumori kože indukovani 7,12-di-metilbenz[a]antracenom. Iz ovoga se nameće generalni zaključak da različiti karcinogeni deluju različito na gen *TP53*. U tom smislu bi se mogao razmatrati i nalaz da karcinomi kože miša indukovani UV radijacijom sadrže prevalencu tranzicija C→T.

Za razmatranje mehanizma mutiranja gena *TP53* važna je činjenica da većina mutacija pogađa nematrični lanac gena. Pošto se on sporije reparira, to predstavlja veliki potencijal za prenos grešaka na ćerke ćelije.

MOGUĆA TERAPIJA

Uvođenje divljeg tipa gena *TP53* u nekoliko različitih ćelijskih sistema u ćelijskim kulturama obično zaustavlja ćelijsku proliferaciju i sprečava prolaz ćelije kroz kontrolnu tačku za prelaz iz G₁ u S period ćelijskog ciklusa. Pri tome dolazi i do supresije neoplastičnog fenotipa u ćelijskoj kulturi i tu-morogenosti u *nude* miševima. Ali, ako se u ćelije uvodi mutirani gen tada nema supresije, već se pro-liferativnost i tumorogenost pojačavaju. Ovi efekti su viđeni i na humanim karcinomima prostate, kolo-rektalnim i plućnim karcinomima, kao i glioblastomima, osteosarkomima i akutnim limfoblastnim leukemijama.

Normalni *TP53* uveden retroviralnim vektorom u fibroblaste Li-Fraumeni pacijenata vraća kontrolu ćelijskog ciklusa i smanjuje amplifikaciju gena na normalni nivo. Ovakvim genskim tretmanom se može takođe indukovati i apoptoza u tretiranim ćelijama. Svi ovi podaci su dobar putokaz za primenu genske **terapije kancera**.

LITERATURA

1. Lane DP., Crawford LV.: T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature*, 1979; 278:261.
2. Jenkins JR., Rudge K., Currie GA.: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 1984; 312: 651.
3. Eliyahu D., Raz A*, Gruss P., Givol D., Oren M.: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, 1984; 312: 646.
4. Parada LF., Land H., Weinberg RA., Wolf D., Rotter V.: Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, 1984; 312: 649.
5. Finlay CA., Hinds PW., Levine AJ.: The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 1989; 57: 1083.
6. Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pin-hasi-Kimhi O., Oren M.: Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989; 86: 8763.
7. Zambetti GP., Olson D., Labow M., Levine AJ.: A mutant p53 protein is required for maintenance of the transformed phenotype in cells transformed with p53 plus ras cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 3952.
8. Levine AJ.: The tumour suppressor genes. *Annu Rev Biochem*, 1993; 62: 623.
9. Agarwal ML., Agarwal A., Taylor WR., Stark GR.: p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995; 92: 8493-9497.

10. Frebourg T., Kassel J., Lam KT., Gryka MA., Barbier V., Andersen TI., Borresen AL., Friend SH.: Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992; 89: 6413.
11. Finlay CA., Hinds PW., Tan TH., Elivahu D., Oren M., Levine AJ.: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.*, 1988; 8:531.
12. Morgenbesser SD., Williams BO., Jacks T., DePinho RA: p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature.*, 1994; 371:72-74.
13. Guillof C, Rosselli F., Krishnaraju K., Mous-tacchi E., Hoffman B., Liebermann DA.: p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role for DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 1995; 10: 2263-2270.
14. Malkin D., Li FP., Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE., Kim DH., Kassel J., Gryka MA., Bischoff FZ., Tainsky MA., Friend SH.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 1990; 250: 1233.
15. Stewart N., Hicks GG., Paraskevas F., Mowat M.: Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, 1995; 10: 109-115.
16. Symonds H., Krali L., Remington L., Saenzro-bles M., Lowe S., Jacks T., Van Dyke T.: p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 1994; 78: 703-711.
17. Hsu I., Metcalf R., Sun T., Welsh J., Wang N., Harris C: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 1991; 350: 427.
18. Hansen R., Oren M.: p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr. Opin. Gen. Devel.*, 1997; 7: 46-51.