

NÁDOROVÝ SUPRESOR P53 A LEUKEMIE

TUMOR SUPPRESSOR P53 AND LEUKEMIA

PAVLOVÁ S.¹, MAYER J.², ŠMARDOVÁ J.¹

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² II. INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO-BOHUNICE

Souhrn: Tento článek shrnuje informace o významu nádorového supresoru p53 v leukemogenezi. Frekvence mutací genu p53 je u leukemií a lymfomů výrazně nižší než u solidních nádorů, pohybuje se mezi 5 % až 20 % případů dle typu onemocnění. V řadě případů je spojena s horší prognózou, s progresí onemocnění do další fáze (chronická fáze chronické myeloidní leukemie do blastického zvratu, myelodysplastický syndrom do akutní myeloidní leukemie), případně s relapsem onemocnění. V případech, ve kterých se mutace p53 nevyskytuje, se mohou uplatňovat jiné způsoby inaktivace proteinu p53 nebo celé dráhy, podobně jako tomu je u některých typů solidních nádorů. Navíc bylo ukázáno, že funkce p53 může být ovlivněna některými fúzními proteiny exprimovanými v důsledku translokací specifických pro leukemie.

Klíčová slova: p53, leukemie, leukemogeneze, AML

Abstract: This review summarizes information about the role of the p53 tumor suppressor protein in the process of leukemogenesis. The frequency of mutations within the p53 gene is significantly lower in leukemias and lymphomas than in solid tumors, ranging from 5 % to 20 % of cases according to the type of a disease. p53 mutations are associated with worse prognosis, with the progression of disease to a more severe phase (chronic phase of chronic myeloid leukemia to blast crisis, myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia) and with relapse of disease in many cases. In cases when p53 mutation does not occur, other mechanisms of inactivation of p53 protein or its pathway may occur, as well as in some types of solid tumors. Moreover, it has been shown that some fusion proteins expressed as the result of leukemia-specific translocations may affect p53 function.

Key words: p53, leukemia, leukemogenesis, AML

V tomto článku shrnujeme informace o významu nádorového supresoru p53 v leukemogenezi. Nejprve se zmíníme o mutacích lidského genu p53, o jejich frekvencích, důsledcích pro pacienty a o souvislostech s přestavbami chromozomu 17. Protože spektrum hematologických onemocnění je poměrně široké, zaměříme se v této části především na akutní myeloidní leukemie (AML), myelodysplastický syndrom (MDS) a chronickou myeloidní leukemii (CML). V další části se zmíníme o jiných možných způsobech inaktivace proteinu p53 a jeho signální dráhy a pokusíme se nastínit možné role proteinu p53 v leukemogenezi.

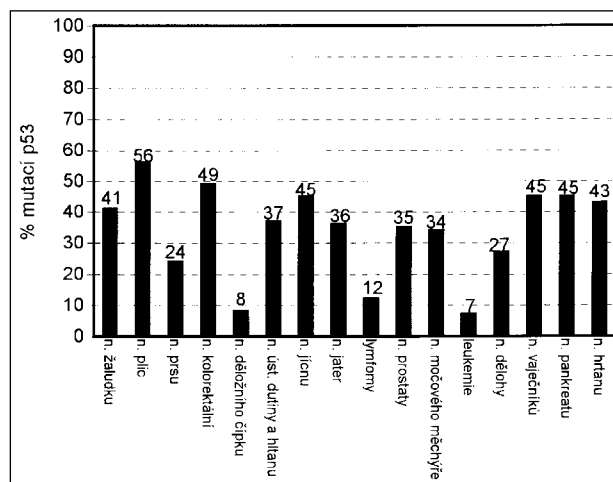
1. KANCEROGENEZE, LEUKEMOGENEZE A NÁDOROVÝ SUPRESOR p53

1.1. Úloha p53 v kancerogenezi

Kancerogeneze je vícestupňový proces, během kterého se kumulují genetické a epigenetické změny, které postupně transformují normální buňku v buňku nádorovou. Konkrétních genů, jejichž mutace může přispět k transformovanému fenotypu buňky, je mnoho, ale obecně je přijímána představa, že v buňce musí proběhnout asi šest základních změn, které se společně podílejí na vytvoření maligního fenotypu: buňka tím získává soběstačnost v produkci růstových signálů, oslabuje se její citlivost k působení antiproliferačních signálů, narušuje se proces apoptózy, posiluje se její replikační potenciál (aktivací telomerázy), angiogeneze a schopnost kolonizovat další tkáň, tedy tvořit metastázy (1, 2). Pravděpodobnost, že budou skutečně pozměněny všechny naznačené funkce v buňce, je výrazně posílena tehdy, jestliže má buňka sníženou schopnost udržovat stabilitu genomu.

Při udržování stability genomu má nezastupitelnou úlohu protein p53. Aktivace proteinu p53 při poškození DNA může vyvolat blok v G1 fázi buněčného cyklu nebo spustit apoptózu, je-li rozsah poškození DNA příliš velký vzhledem ke kapacitě opravných mechanismů (3, 4, 5). Proto není překvapivé, že mutace genu p53 patří k nejčastějším genetickým změnám detegovaným u solidních nádorů (obr. 1). Uvádí se, že v průměru polovina všech nádorů má mutaci v genu pro nádorový supresor p53 (6).

Obr. 1: Frekvence mutací p53 u různých typů nádorů. Upraveno podle Harris (83).



1.2. Leukemogeneze je vícestupňový proces

Pro hematologická onemocnění jsou typické chromozomální přestavby, zejména translokace. U některých případů dochází k důsledku translokace k přemístění genu pro transkripční faktor pod kontrolu vysoce aktivních elementů promotoru nebo zesilovačů transkripcie, např. imunoglobulinů nebo genů pro receptory T-buněk (TCR), a tedy k abnormální expresi daného transkripčního faktoru. Jiným důsledkem translokace je fúze genu pro transkripční faktor nebo receptorovou tyrozinkinázu s jiným, nepřibuzným genem. V buňce pak dochází k syntéze chimerického proteinu, který je schopen interagovat s DNA a s jinými proteiny tak, že narušuje normální regulační mechanismy (pro přehled 7).

Chromozomální přestavby hrají v leukemogenezi pravděpodobně zásadní roli, ale přesto nejsou proteiny exprimované jako důsledek translokace dostačující pro plné rozvinutí onemocnění. Stejně jako u solidních nádorů je k plnému rozvoji maligního fenotypu krevní buňky nutných více genetických změn a k jejich vzniku může přispívat genomová nestabilita. Kromě statistických modelů, studií na transgenních zvířatech a latence nástupu onemocnění u vrozených translokací potvrzuje vícestupňový model leukemogeneze také výskyt buněk se změnami typickými pro leukemie a lymfomy u zdravých jedinců, u kterých se hematologické onemocnění nevyvine, např. MLL-AF4 (8), bcr-abl (9, 10), BCL-2/JH (11). Pro progresi směrem k hematologickému onemocnění jsou pak nezbytné další mutace, které se vyskytnou jen u malé podskupiny jedinců (12).

Často studovaným modelem vícestupňové leukemogeneze jsou hematologická onemocnění, která se vyvíjejí v nejméně dvou klinicky odlišných fázích, jako jsou například chronická fáze a blastický zvrstvení chronické myeloidní leukemie (CML) nebo myelodysplastický syndrom (MDS) přecházející v akutní myeloidní leukemii (AML). V jednotlivých fázích těchto onemocnění jsou postupně narušeny nejméně dva procesy – proliferace nebo/a apoptóza a diferenciace. Teprve narušení obou těchto procesů má za následek vznik klonu buněk s plně leukemickým fenotypem, tj. buněk, které ztratily schopnost normálně diferencovat ve zralé krevní buňky a nekontrolovatelně proliferují nebo expandují. Za přechod do druhé fáze těchto onemocnění jsou zodpovědné další genetické změny (pro přehled 13 a 14). Mezi geny, které by se mohly podílet na progresi hematologických onemocnění, je pro svou významnou funkci v kancerogenezi solidních nádorů zvažován také nádorový supresor p53.

2. MUTACE GENU p53 U LEUKEMIÍ

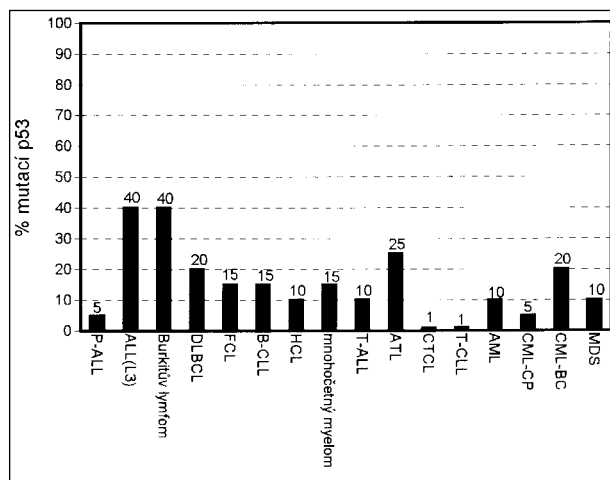
2.1. Frekvence mutací p53 u hematologických malignit

Frekvence mutací genu pro p53 je u hematologických onemocnění poměrně nízká. Z 2152 případů pacientů s leukemií a myelodysplazií byla mutace p53 popsána u 238 z nich, tj. u 11 % případů (15). Nejvyšší frekvence byla nalezena u Burkittova lymfomu a u akutní lymfoblastické leukemie typu L3. Tyto údaje byly později potvrzeny a rozšířeny (16), výsledky shrnuje graf na obr. 2. Z grafu je patrné, že frekvence mutací genu p53 se u většiny typů onemocnění pohybuje do 20 %, s výjimkou Burkittova lymfomu a odpovídající B akutní lymfoblastické leukemie B-ALL L3 (40 %) a T buněčné leukemie/lymfomu ATL („adult T-cell leukemia“) (25 %).

Rozdíly ve zjištěných frekvencích mutací p53 uvedených v literatuře jsou poměrně značné. Například frekvence mutací genu p53 u akutní myeloidní leukemie je udávána mezi 4,5 % a 16 % případů (17, 18, 19, 20, 21, 22). Značné rozdíly v naměřených frekvencích mutací p53 jsou běžné i u solidních nádorů a mohou souviset např. s použitou metodou detekce (23, 24, 22, 25, 26). U leukemií se navíc ukazuje, že výsledné hodnoty frekvencí mutací p53 souvisí se stádiem onemocnění a také s předchozí léčbou pacienta (27). Obecně se udává, že mutace jsou několikrát častější v relapsu než v době záchytu onemocnění (20, 15). Také u sekundárních onemocnění, jejichž

Obr.2: Frekvence mutací u leukemií a lymfomů. Upraveno podle Drexlera a kol. (16).

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia; ATL, adult T cell leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML-BC/CP, chronic myeloid leukemia in blast crisis/chronic phase; CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; FCL, follicular cell lymphoma; HCL, hairy cell leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; P, precursor.



vznik se dává do souvislosti s předchozí léčbou jiného nádoru („therapy-related disease“), bývá detekována vyšší frekvence mutací p53 (28).

2.2. Prognostický význam mutace p53

Mutace p53 jsou spojeny s horší prognózou onemocnění, a to zejména u MDS, AML, CLL (chronické lymfoidní leukemie) a TALL (T-akutní lymfoidní leukemie) (15, 18, 21, 28). Je nutné si ovšem uvědomit, že se mutace genu p53 častěji vyskytují u starších pacientů a pacientů s pozměněným karyotypem, což jsou skupiny pacientů s horší prognózou samy o sobě. Multifaktoriální analýza dat získaných u skupiny 200 pacientů s *de novo* AML ukázala, že mutace p53 je důležitým faktorem pro prognózu, ale méně důležitým než věk pacienta a jeho karyotyp. Rozdíl v prognóze mezi pacienty s mutací a pacienty s funkčním p53 je významnější u pacientů mladších 60 let a u této skupiny pacientů se dokonce mutace p53 považuje za nejvýznamnější prognostický faktor, i když není častá (22). Jedním z důvodů horší prognózy pacientů s mutací p53 by mohla být snížená schopnost odpovídat na terapii. Obecně je rezistence k léčbě pravděpodobně multifaktoriální, podílí se na ní mj. bcl-2, MRP („multidrug-resistance related protein“) a HSP27 (29), ale byla popsána také jasná souvislost s mutací p53 (21, 30).

2.3. Výskyt mutací p53 vzhledem k fázi leukemogeneze

Zdá se, že inaktivace p53 hraje roli spíše v pozdějších fázích leukemogeneze a jejich vznik je doprovázen posunem k agresivnějšímu leukemickému fenotypu buněk. U chronické myeloidní leukemie je zvažována úloha mutací p53 při přechodu z chronické fáze do blastové krize. Experimenty na transgenních myších, které vedle translokace bcr/abl typické pro CML měly mutaci v jedné alele genu pro p53, ukázaly, že ztráta funkce p53 skutečně přispívá ke zvýšené proliferaci hematopoietických buněk exprimujících bcr/abl a podílí se na vývoji blastického zvrstvení. U těchto transgenních myší se nemoc vyvinula výrazně rychleji než u myší, které zárodečnou mutaci p53 nenesly, a v šesti z devíti analyzovaných případů došlo ke ztrátě druhé alely (31). Tyto experimenty jsou v souladu se zjištěním, že frekvence mutací p53 je vyšší u pacientů v blastickém zvrstvení než u pacientů v chronické fázi CML (32, 33, 27, 34). Podobně se mutace p53 vyskytují u pokročilejších subtypů myelodysplastického syndromu a mohly by hrát roli při pře-

chodu do AML (35, 36, 37). Také již zmíněná skutečnost, že výskyt mutací je několikrát častější při relapsu onemocnění než v době jeho zachytu, poukazuje na úlohu inaktivace p53 v pokročilých fázích onemocnění.

Velmi vysoké procento mutací p53 se vyskytuje u leukemických buněčných linií. U myelocytických linií je frekvence mutací okolo 57 %, u monocytických dokonce okolo 91%. Zdá se, že mutace nevznikají *de novo* při tvorbě linií, ale jsou přítomné, alespoň v malém klonu, již v buňkách pacienta (16). Lze tedy předpokládat, že inaktivace p53 zvyšuje schopnost leukemických buněk růst *in vitro*. Ti pacienti, jejichž blasty vykazují vysokou schopnost autonomního růstu *in vitro*, mají horší prognózu a jejich blasty, z nichž byly linie pravděpodobně odvozeny, často vykazují aberantní expresi p53 a jsou relativně rezistentní k indukci apoptózy cytotoxickými léčivy (38, 39).

Na druhé straně nelze vyloučit možnost, že u některých leukemií hraje inaktivace p53 roli v raných fázích leukemogeneze (40, 41). Podle jednoho z navržených mechanismů se může nestabilita genomu po inaktivaci p53 spolupodílet na vzniku translokací. U některých sekundárních leukemií byly podrobnou analýzou detegovány kopie genů MLL a abl rozptýlené po genomu („segmental jumping translocations“). Tyto amplifikace mohou vznikat právě jako následek genomové nestability po inaktivaci obou alel genu p53 a chemoterapie nebo radioterapie použité při léčbě primárního nádoru. Translokace, při kterých je zasažen gen MLL, jsou specificky spojeny s vývojem některých leukemií, ale role amplifikace genu MLL v leukemogenezi zůstává neznámá. Proto není zcela jasné, zda je možné připsat těmto přestavbám zásadní význam v počátečních fázích vývoje onemocnění a zařadit v tomto případě mutaci p53 mezi rané události leukemogeneze (42).

2.4. Mutace p53 a chromozomální přestavby

p53 je nádorový supresor a pro jeho úplné vyřazení z funkce musí být ve většině případů inaktivovány obě alely. V leukemických buňkách se obvykle kromě aberace typické pro daný typ onemocnění vyskytují i další chromozomální přestavby, mezi nimi i změny chromozomu 17, na kterém je lokalizován gen p53 (17p13). Ztráta celého chromozomu 17 nebo delece jeho části s genem p53 tak může odhalit bodovou mutaci ve druhé alele genu a vést k úplné ztrátě funkce nádorového supresoru (tzv. ztráta heterozygotnosti – LOH). U leukemií se vyskytují monozomie chromozomu 17, delece nebo jiné přestavby jeho části (zejména nerekiproké translokace) a izochromozomy i(17q), při jejichž vzniku dochází ke ztrátě části 17p. U AML s bodovou mutací genu p53 se frekvence změn chromozomu 17 pohybuje mezi 60 % a 80 %. (17, 18, 15, 43, 22, 28). Dá se předpokládat, že u ostatních případů se ve druhé alele genu p53 nacházejí bodové mutace nebo drobné aberace, může se také jednat o poměrně vzácný případ dominantně-negativních mutací (44).

Pacienti s delecí 17p tvoří poměrně malou podskupinu v rámci AML a MDS a výskyt těchto delecí je častější u t-AML a t-MDS než u primárních leukemií (43). Tato podskupina charakteristická specifickými morfoloickými znaky a horší prognózou se považuje za samostatnou morfoloicko-cytogeneticko-molekulární entitu v rámci MDS a AML (43, 45).

Chromozomální abnormalita i(17q) se vyskytuje asi u 20 % pacientů v blastickém zvratu CML a také u malé části pacientů s AML a dalšími typy leukemie. Byla hledána souvislost mezi mutací p53 a vznikem tohoto izochromozomu, ale výsledky si často protířečí. Někteří autoři potvrzují, že izochromozom i(17q) je provázen inaktivací druhé alely p53 (46), jiní mutace ve druhé alele genu p53 nezachytily (47, 48). Není proto vyloučeno, že v patogenezi leukemie asociované s izochromozomem 17 by mohl hrát roli jiný nádorový supresorový gen.

3. ALTERNATIVNÍ ZPŮSOBY INAKTIVACE PROTEINU P53

Mutace genu je nejběžnější mechanismus inaktivace nádorového supresoru p53 v nádorových buňkách. U solidních nádorů byly popsány i další mechanismy, z nichž některé se uplatňují také u leukemií: interakce s virovými proteiny, interakce s buněčným onkoproteinem MDM2 a jaderná exkluze. Kromě toho se ukazuje, že některé proteiny vznikající v důsledku translokací by mohly samy alespoň částečně ovlivňovat funkci p53, narušovat proces apoptózy a napomáhat kumulaci dalších změn. Tento mechanismus se týká leukemických chimerických proteinů a je to tedy pravděpodobně mechanismus specifický pro leukemie.

3.1. Inaktivace p53 interakcí s virovými proteiny

Funkce proteinu p53 může být pozmeněna interakcí s virovými onkoproteiny – např. s proteinem E1B adenovirů (49), s proteinem E6 lidských papillomavirů (50), s proteinem HBx viru hepatitidy B (51, 52), s velkým antigenem T viru SV40 (53, 54), s proteinem EBNA-5 viru Epstein-Barrové (55) či s proteinem IE84 lidského cytomegaloviru (56). Inaktivace p53 indukovaná viry je skutečně součástí karcinogeneze některých solidních nádorů např. nádorů děložního čípku (57, 58, pro přehled 59).

K inhibici funkce proteinu p53 virovým proteinem dochází u T buněčné leukemie/lymfomu, který je spojen s infekcí virem HTLV-1 („human T-cell lymphotropic virus type 1“). Protein Tax kódovaný tímto virem stabilizuje p53 a narušuje jeho transkripční funkci inhibicí N-terminální aktivační domény nezávisle na vazebné aktivitě p53. Narozdíl od proteinů výše uvedených virů zde pravděpodobně nedochází k přímé vazbě proteinu Tax na p53, funkce aktivační domény p53 je spíše modifikována fosforylací některých aminokyselin (60, 61). Inhibice funkce proteinu p53 tak pravděpodobně umožňuje vznik chromozomálních abnormalit nebo mutací během dlouhého období chronické infekce virem, jejichž důsledkem je pak propuknutí vlastního onemocnění.

3.2. Inaktivace p53 interakcí s buněčným onkoproteinem MDM2

Protein MDM2 funguje v buňce jako negativní regulátor p53 (62, 63). U sarkomů (64, 65), nádorů mozku (66) a některých dalších typů nádorů byla detegována amplifikace genu mdm2. V buňkách s amplifikací genu mdm2 dochází v důsledku vyšší hladiny proteinu MDM2 ke zvýšené míře odbourávání proteinu p53. Amplifikace genu mdm2 nebyla u leukemií popsána. Nicméně u různých typů leukemií byla popsána zvýšená exprese mdm2 na úrovni mRNA (67, 68) i na úrovni proteinu (69, 70). V případech, ve kterých byla provedena analýza genu pro p53, nebyla nalezena koincidence mutace p53 a zvýšené exprese mdm2. Pacienti se zvýšenou hladinou exprese mdm-2 měli tendenci mít horší prognózu a hůře reagovali na terapii.

3.3. Jaderná exkluze

Dalším mechanismem inaktivace p53 je abnormální zadržování funkčního proteinu p53 v cytoplasmě (71, 72), které bylo detegováno u některých typů nádoru prsu a nediferencovaných neuroblastomů. (73, 74, 75). U leukemií tento jev dosud popsán nebyl.

3.4. Interakce proteinu p53 s proteiny vzniklými v důsledku translokací

3.4.1. PML-RAR α

Akutní promyelocytární leukemie (APL) je specifickým subtypem akutní myeloidní leukemie, podle FAB klasifikace označovaná jako AML-M3. Ve většině případů je spojena s reciprokou balancovanou translokací, která postihuje chromozomy 15 a 17. Jejím důsledkem je vznik fúzních genů PML-RAR α a RAR α -PML a následně chimerických proteinů, které interferují s funkcí normálních proteinů PML a RAR α .

PML mimo jiné funguje jako pozitivní regulátor apoptózy – závislé i nezávislé na p53 – a je také nezbytný pro senescenci indukovanou po onkogenní transformaci prostřednictvím p53. PML je např. nutný pro správnou acetylaci p53 po působení gamma záření a následnou schopnost p53 vázat se na DNA (76, 77). Protein PML umožňuje vznik a stabilní existenci tzv. jaderných tělísek („nuclear bodies“), ve kterých je lokalizován spolu s proteiny CBP, SUMO-1, Sp100, Sp140, DAXX, RB, p53 a dalšími. Chimerický protein PML-RARa dominantně-negativním způsobem narušuje funkci PML a znemožňuje tvorbu jaderných tělísek. K acetylaci p53, která je nutná k aktivaci tohoto proteinu, pravděpodobně dochází právě v jaderných tělískách, kde je p53 přítomen spolu s acetyltransferázou CBP. Protein PML-RAR α tak interferuje s acylací p53, protože proces acetylace je zřejmě závislý na přítomnosti jaderných tělísek (78).

3.4.2. MLL/MEN

Translokace týkající se oblasti 11q23, ve které se nachází gen MLL, jsou nejčastěji pozorovanou chromozomální abnormalitou u leukemií. Jedním z mnoha možných partnerů genu MLL je gen MEN, který kóduje elongační faktor RNA polymerázy II. Translokace t(11;19)(q23;p13,1) zodpovědná za fúzi těchto dvou genů se vyskytuje u myeloidních leukemií dospělých. Chimerický protein MLL/MEN se buď přímo nebo nepřímo váže na protein p53 a potlačuje jeho transkripční schopnost. Interakce MLL/MEN s p53 je závislá na přítomnosti části MEN, samotný protein MEN je schopen inhibovat transkripční funkci p53 stejně účinně. Možným mechanismem deregulace vztahu MLL/MEN – p53 ve srovnání s MEN – p53 by mohla být buď zvýšená stabilita chimerického proteinu MLL/MEN oproti samotnému MEN, nebo změněná exprese chimerického proteinu, která je řízena z promotoru genu MLL (79).

3.4.3. CBF β -SMMHC

Fúzní gen CBF β -SMMHC je exprimován v blastech pacientů s AML M4eo jako důsledek inverze inv(16)(p13q22) nebo translokace t(16;16)(p13q22). Následkem těchto chromozomálních přestaveb je transkripční faktor CBF β připojen ke koncové doméně proteinu SMMHC („smooth muscle myosin heavy chain“). Normální CBF β tvoří v buňce heterodimerní transkripční faktor CBF s jednou ze tří podjednotek CBF α : CBF α 1, AML1 (CBF α 2) nebo CBF α 3. Heterodimer se prostřednictvím podjednotky CBF α váže na DNA, podjednotka CBF β zvyšuje afinitu této vazby. Britos-Bray et al. (80) navrhli jeden z možných způsobů, jakým by mohl CBF β -SMMHC přispívat k leukemogenezi. Ukázali, že u buněk exprimujících CBF β -SMMHC je snížena indukce p53 a zpomalena apoptóza po působení ionizujícího záření a etoposidu. Ke snížení apoptózy je nezbytná interakce chimerického proteinu s podjednotkou CBF α , což naznačuje, že fúzní protein interferuje se schopností transkripčního faktoru CBF aktivovat cílový gen nebo skupinu genů. Snížená induk-

ce p53 tak může být způsobena přímou inhibicí transkripce p53.

4. ÚLOHA FUNKČNÍHO PROTEINU p53 V LEUKEMOGENEZE

Pro doplnění úplného spektra možných rolí p53 v leukemogenezi zde zbývá zmínit zajímavý model, který navrhli Megonigal et al. (81). Podle tohoto modelu by důležitou úlohu v leukemogenezi mohl hrát funkční p53, a to při vzniku chromozomálních translokací genu MLL. V tomto genu se v blízkosti jednoho místa zlomů vyskytují nespárované nukleotidy a cílová místa pro štěpení DNA topoizomerázou II. Tento enzym způsobuje zlomy v DNA, které následně spojuje. Model předpokládá narušení ligační aktivity enzymu protinádorovými léčivy (např. epipodophyllotoxinem) u sekundárních leukemií nebo jiným poškozením DNA u *de novo* případů. V takovém případě dojde ke zlomu chromozomu topoizomerázou II, nemůže už ovšem dojít k ligaci. Volné konce jsou podle modelu spojeny reparačními mechanismy, což může vést k translokaci. Jedním z proteinů, které se uplatňují při opravách zlomů DNA, je právě protein p53. Úloha jeho funkčních varianty při vzniku těchto translokací by pak mohla vysvětlovat nízkou frekvenci mutací v genu p53 přinejmenším u leukemií spojených s přestavbami genu MLL, zvláště v časných stádiích leukemogeneze.

5. ZÁVĚR

V tomto článku jsme se pokusili shrnout publikované informace o možné úloze proteinu p53 v procesu leukemogeneze. Výchozím bodem úvah o možné roli p53 bylo zjištění, že mutace genu p53 jsou u leukemií poměrně vzácné. Ukázali jsme, že v těch případech, kde se mutace v genu p53 vyskytují, nejde pouze o jakýsi vedlejší produkt nestability genomu, ale tyto mutace přispívají k leukemickému fenotypu buněk. Dále jsme ukázali, že nízkou frekvenci mutací genu p53 lze vysvětlit také uplatněním alternativních mechanismů inaktivace p53 a zmínili jsme některé novější poznatky o inhibici p53 fúzními proteiny exprimovanými jako důsledek vzniku translokací. Vysoce pravděpodobně však je, že u významné části leukemií není v procesu jejich vývoje inaktivace proteinu p53 ani jeho dráhy nezbytná (82).

Další výzkumy ukáží, jaký je podíl inaktivace proteinu p53 na vývoji leukemického fenotypu ať už mutací nebo některým alternativním mechanismem, bude zajímavé sledovat výsledky naznačující, v čem je role proteinu p53 v leukemogenezi odlišná či méně významná než při vývoji solidních nádorů. Vzhledem k nízké frekvenci výskytu mutací p53 v leukemických buňkách nebude mít pravděpodobně jejich detekce velký význam v klinické praxi, ale poznání širších souvislostí jejich vzniku a výskytu by mohlo přispět k pochopení procesu leukemogeneze.

Tato práce byla sponzorována grantem IGA MZ ČR č. NC/6395-3 a MZ0002980501.

Literatura

- Compagni A., Christofori G.: Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br.J.Cancer* 2000, 83, 1-5.
- Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57-70.
- Lane D.P.: p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358, 15-16.
- Levine A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88, 323-331.
- Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Weismuller L., Deppert W.: Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 1999, 18, 7706-7717.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R., Harris C.C.: Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucl.Acids.Res.* 1994, 22, 3551-3555.
- Look A.T.: Genes altered by chromosomal translocations in leukemias and lymphomas. In: *The genetic basis of human cancer*, eds. Vogelstein B., Kinzler K.W., The McGraw-Hill companies, Inc. 1998, 109-141.
- Uckun F.M., Herman-Hatten K., Crotty M.-L., Sensel M.G., Sather H.N., Tuel-Ahlgren L., Sarquis M.B., Bostrom B., Nachman J.B., Steinherz P.G., Gaynon P.S., Heerema N.: Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 1998, 92, 810-821.
- Biernaux C., Loos M., Sels A., Huez G., Stryckmans P.: Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 1995, 86, 3118-3122.
- Biernaux C., Sels A., Huez G., Stryckmans P.: Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17, 45-47.
- Dolken G., Illerhaus G., Hirt C., Mertelsmann R.: BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J.Clin.Oncol.* 1996, 14, 1333-1344.
- Hunger S.P., Cleary M.L.: What significance should we attribute to the detection of MLL fusion transcripts? *Blood* 1998, 92, 709-711.

13. Sawyers C.L., Denny C.T., Owen N.W.: Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 1991, 64, 337-350.
14. Eaves C., Cashman J., Eaves A.: Defective regulation of leukemic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 1998, 22, 1085-1096.
15. Parry T.E.: The non-random distribution of point mutations in leukaemia and myelodysplasia – a possible pointer to their aetiology. *Leuk. Res.* 1997, 21, 559-74.
16. Drexler H.G., Fombonne S., Matsuo Y., Hu Z.-B., Hamaguchi H., Uphoff C.C.: p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization? *Leukemia* 2000, 14, 198-206.
17. Fenaux P., Jonveaux P., Quiquandon I., Lai J.L., Pignon J.M., Loucheux-Lefebvre M.H., Bauters F., Berger R., Kerckaert J.P.: P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991, 78, 1652-1657.
18. Fenaux P., Preudhomme C., Quiquandon I., Jonveaux P., Lai J.L., Vanrumbeke M., Loucheux-Lefebvre M.H., Bauters F., Berger R., Kerckaert J.P.: Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1992, 80, 178-183.
19. Hu G., Zhang W., Diesseroth A.B.: P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1992, 81, 489-494.
20. Trecca D., Longo L., Biondi A., Cro L., Calori R., Grignani F., Maiolo A.T., Pelicci P.G., Neri A.: Analysis of p53 gene mutations in acute myeloid leukemia. *Am.J.Hematol.* 1994, 46, 304-309.
21. Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P.: p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994, 84, 3148-3157.
22. Nakano Y., Naoe T., Kiyoi H., Kitamura K., Minami S., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Kusumoto S., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Saito H., Ohno R.: Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *Eur.J.Haematol.* 2000, 65, 23-31.
23. Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K., Schlichtholz B.: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int.J.Cancer* 1994, 57, 1-9.
24. O'Connor P.M., Jackman J., Bae I., Myers T.G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D.A., Monks A., Sausville E.A., Weinstein J.N., Friend S., Fornace A.J.Jr., Kohn K.W.: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the national cancer institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer drug. *Cancer Res.* 1997, 57, 4285-4300.
25. 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.
26. Martinez-Delgado B., Robledo M., Arranz E., Infantes F., Echezaretta G., Marcos B., Sanz C., Rivas C., Benitez J.: Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. *Am.J.Hematol.* 1997, 55, 1-8.
27. Guinn B.A., Mills K.I.: p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Lymphoma* 1997, 26, 211-226.
28. Christiansen D.H., Andersen M.K., Pedersen-Bjergaard J.: Mutations with loss of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J.Clin.Oncol.* 2001, 19, 1405-1413.
29. Kasimir-Bauer S., Ottinger H., Meusers P., Beelen D.W., Brittinger G., Seeber S., Scheulen M.E.: In acute myeloid leukemia, coexpression of at least two proteins, including P-glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat-shock protein 27, is predictive of the response to induction chemotherapy. *Exp. Hematol.* 1998, 26, 1111-1117.
30. Matozaki S., Nakagawa T., Kawaguchi R., Aozaki R., Tsutsumi M., Murayama T., Koizumi T., Nishimura R., Isobe T., Chihara K.: Establishment of a myeloid leukaemic cell line (SKNO-1) from a patient with t(8:21) who acquired monosomy 17 during disease progression. *Br.J.Haematol.* 1995, 89, 805-811.
31. Honda H., Ushijima T., Wakazono K., Oda H., Tanaka Y., Aizawa S., Ishikawa T., Yazaki Y., Hirai H.: Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210bcr/abl-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* 2000, 95, 1144-1150.
32. Foti A., Ahuja H.G., Allen S.L., Koduru P., Schuster M.W., Schulman P., Bar-Eli M., Cline M.J.: Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia in blast crisis. *Blood* 1991, 77, 2441-2444.
33. Nakai H., Misawa S., Toguchida J., Yandell D.W., Ishizaki K.: Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of chromosome 17p. *Cancer Res.* 1992, 52, 6588-6593.
34. Beck Z., Kiss A., Toth F.D., Szabo J., Bacsi A., Balogh E., Rbely A., Telek B., Kovacs E., Olah E., Rak K.: Alterations of p53 and RB genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma* 2000, 38, 587-597.
35. Adamson D.J., Dawson A.A., Bennett B., King D.J., Haites N.E.: p53 mutation in the myelodysplastic syndromes. *Br.J.Haematol.* 1995, 89, 61-66.
36. Mori N., Hidaï H., Yokota J., Okada M., Motoji T., Oshimi K., Mizoguchi H.: Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome and overt leukemia. *Leuk.Res.* 1995, 19, 869-875.
37. Castro P.D., Liang J.C., Nagarajan L.: Deletions of chromosome 5q13.3 and 17 p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood* 2000, 95, 2138-2143.
38. Zhu Y.M., Bradbury D., Russell N.: Expression of different conformations of p53 in the blast cells of acute myeloblastic leukaemia is related to in vitro growth characteristics. *Br.J. Cancer* 1993, 68, 851-855.
39. Russell N.H., Hunter A.E., Bradbury D., Zhu Y.M., Keith F.: Biological features of leukaemic cells associated with autonomous growth and reduced survival in acute myeloblastic leukaemia. *Leuk.Lymphoma* 1995, 16, 223-229.
40. Kaneko H., Misawa S., Horiike S., Nakai H., Kashima K.: TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* 1995, 85, 2189-2193.
41. Misawa S., Horiike S., Kaneko H., Sasai Y., Ueda Y., Nakao M., Yokota S., Taniwaki M., Fujii H., Nakagawa H., Tsuda S., Kashima K.: Significance of chromosomal alterations and mutations of the N-RAS and TP53 genes in relation to leukemogenesis of acute myeloid leukemia. *Leuk.Res.* 1998, 22, 631-637.
42. Felix C.A., Megonigal M.D., Chervinsky D.S., Leonard D.G.B., Tsuchida N., Kakati S., Block A.M.W., Fisher J., Grossi M., Salhany K.I., Jani-Sait S.N., Aplan P.D.: Association of germline p53 mutation with MLL segmental jumping translocation in treatment-related leukemia. *Blood*, 1998, 91, 4451-4456.
43. Soenen V., Preudhomme C., Roumier C., Daudignon A., Lai J.-L., Fenaux P.: 17p deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998, 91, 1008-1015.
44. Felix C.A., Nau M.M., Takahashi T., Mitsudomi T., Chiba I., Poplack D.G., Reaman G.H., Cole D.E., Letterio J.J., Whang-Peng J., Knutsen T., Minna J.D.: Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin.Invest.* 1992, 89, 640-647.
45. Lai J.L., Preudhomme C., Zandeck M., Flactif M., Vanrumbeke M., Lepelletier P., Wattel E., Fenaux P.: Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of p53 mutations. *Leukemia* 1995, 9, 370-381.
46. Feinstein E., Cimino G., Gale R.P., Alimena G., Berthier R., Kishi K., Goldman J., Zaccaria A., Berrebi A., Canaani E.: p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 6293-6297.
47. Schutte J., Opalka B., Becher R., Bardenheuer W., Szymanski S., Lux A., Seebert S.: Analysis of the p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph-positive or -negative myeloid leukemia. *Leuk.Res.* 1993, 17, 533-539.
48. Fioretos T., Strömbeck P., Sandberg T., Johansson B., Billström R., Borg A., Nilsson P.-G., Van Den Berghe H., Hagemeijer A., Mitelman F., Höglund M.: Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. *Blood* 1999, 94, 225-232.
49. Sarnow P., Shih Ho Y., Williams J., Levine A.J.: Adenovirus E1b – 58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982, 28, 387-394.
50. Dyson N., Howley P.M., Munger K., Harlow E.: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243, 934-937.
51. Feitelson M.A., Zhu M., Duan L.-X., London W.T.: Hepatitis B X antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993, 8, 1109-1117.
52. Wang X.W., Forrester K., Yeh H., Feitelson M.A., Gu J.R., Harris C.C.: Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA-binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1994, 91, 2230 – 2234.
53. Lane D.P., Crawford L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979, 278, 261-263.
54. 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* 1979, 17, 43-52.
55. Szekely L., Selivanova G., Magnusson K.P., Klein G., Wiman K.G.: EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1993, 90, 5455-5459.
56. Speir E., Modali R., Huang E.S., Leon M.B., Shawl F., Finkel T., Epstein S.E.: Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994, 265, 391-394.
57. Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M.: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990, 248, 76-79.
58. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990, 63, 1129-1136.
59. Thomas M., Pim D., Banks L.: The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999, 18, 7690-7700.
60. Pise-Masison C.A., Choi K.-S., Radonovich M., Dittmer J., Kim S.-J., Brady J.: Inhibition of p53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J.Virol.* 1998, 72, 1165-1170.
61. Pise-Masison C.A., Radonovich M., Sakaguchi K., Apella E., Brady J.: Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type-1 transformed cells. *J.Virol.* 1998, 72, 6348-6355.
62. Marks J.R., Davidoff A.M., Kerns B.J., Humphrey P.A., Pence J.C., Dodge R.K., Clarke-Pearson D.L., Inglehart J.D., Bast R.C., Berchuck A.: Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 1991, 51, 2979-2984.
63. Mietz J.A., Unger T., Huitregtse J.M., Howley P.M.: The transcriptional transactivation function of wild-type p53 protein is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* 1992, 11, 5013-5020.
64. 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* 1992, 69, 1237-1245.
65. Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992, 358, 80-83.
66. Reifemberger G., Liu L., Ichimura K., Schmidt E.E., Collins V.P.: Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* 1993, 53, 2736-2739.
67. Quesnel B., Preudhomme C., Osciér D., Lepelletier P., Collin-d'Hooghe M., Facon T., Zandeck M., Fenaux P.: Over-expression of the MDM-2 gene is found in some cases of haematological malignancies. *Br.J.Haematol.* 1994, 88, 415-418.
68. Bueso-Ramos C.E., Yang Y., deLeon E., McCown P., Stass S.A., Albitar M.: The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 1993, 82, 2617-2623.
69. Zhou M., Gu L., Abshire T.C., Homans A., Billett A.L., Yeager A.M., Findley H.W.: Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein

- overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000, 14, 61-67.
70. Faderl S., Kantarjian H. M., Estey E., Manshouri T., Chan C. Y., Rahman Elsaied A., Kornblau S. M., Cortes J., Thomas D. A., Pierce S., Keating M. J., Estrov Z., Albitar M.: The prognostic significance of p16(INK4a)/p14(ARF) locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2000, 89, 1976-1982.
 71. Gannon J.V., Lane D.P.: Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 1991, 349, 802-806.
 72. Liang S.H., Hong D., Clarke M.F.: Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *J.Biol.Chem.* 1998, 273, 19817-19821.
 73. Moll U.M., Riou G., Levine A.: Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1992, 89, 7262-7266.
 74. Moll U.M., LaQuaglia M., Benard J., Riou G.: Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1995, 92, 4407-4411.
 75. Moll U.M., Ostermeyer A.G., Haladay R., Winkfield B., Frazier M., Zambetti G.: Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol.Cell.Biol.* 1996, 16, 1126-1137.
 76. Pearson M.R., Carbone R., Sebastiani C., Fagioli M., Saito S., Higashimoto Y., Appella E., Minucci S., Pandolfi P.P., Palicci P.G.: PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000, 406, 207-210.
 77. Guo A., Salomoni P., Luo J., Shih A., Zhong S., Gu W., Pandolfi P.P.: The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat.Cell Biol.* 2000, 2, 730-736.
 78. Pandolfi PP: Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum.Mol.Genet.* 2001, 10, 769-775.
 79. Maki K., Mitani K., Yamagata T., Kurokawa M., Kanda Y., Yazaki Y., Hirai H.: Transcriptional inhibition of p53 by the MLL/MEN chimeric protein found in myeloid leukemia. *Blood* 1999, 93, 3216-3224.
 80. Britos-Bray M., Ramirez M., Cao W., Wang X., Liu P.P., Civin C.I., Friedman A.D.: CBF β -SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998, 92, 4344-4352.
 81. Megonigal M.D., Rappaport E.F., Nowell P.C., Lange B.J., Felix C.A.: Potential role for wild-type p53 in leukemias with MLL gene translocations. *Oncogene* 1998, 16, 1351-1356.
 82. Sutcliffe T, Fu L, Abraham J, Vaziri H, Benchimol S.: A functional wild-type p53 gene is expressed in human acute myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1998, 92, 2977-2979.
 83. Harris C.C.: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic – an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1187-1198.