

VŮDČÍ GEN P53: ZPRÁVA Z KONFERENCE

THE LEADING GENE P53: REPORT ON THE CONFERENCE

ŠMARDOVÁ J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Ve dnech 30. 6 až 3. 7. 2003 se konala v Lyonu ve Francii mezinárodní konference nazvaná „**Functional consequences of TP53 mutations: Characterization of common and rare p53 mutants and relevance to human cancer**“. Konferenci organizovaly společně francouzská IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a americký NIEMS (*National Institute of Environmental Health Sciences*). Lyon nebyl hostitelským městem náhodou. Právě zde IARC spravuje pravděpodobně největší databázi mutací nádorového supresoru p53 (<http://www.iarc.fr/p53>). Lidé zabývající se vedením databáze a také analýzou v ní ukládaných dat (*Pierre Hainaut, Magali Olivier*) vyvolali diskusi o budoucí podobě a využití této databáze. Nádorový supresor p53 byl objeven v roce 1979 a od té doby se těší intenzivnímu zájmu badatelů a je také spojován s velkými nadějami klinických onkologů. A právě neuvěřitelný rozpor mezi stále bohatšími a detailnějšími znalostmi o struktuře a funkci tohoto nevelkého proteinu a především jeho klíčové roli v kancerogenezi na straně jedné a zatím minimálního praktického dopadu těchto znalostí v klinické praxi na straně druhé jsou již dlouho zdrojem určitého napětí mezi badateli a praktickými onkology. Konference v Lyonu shrnula některé zajímavé poznatky o p53, z nichž mnohé jasně ukazují, v čem je příčina tohoto rozporu.

Na úvod stručně: protein p53 je nádorovým supresorem. Zajišťuje adekvátní odpověď buňky na buněčný stres a zamezuje dělení, případně přežití poškozených buněk. Vyřazení této funkce představuje významný krok v progresi kancerogeneze. p53 je transkripční faktor, který po indukci některými buněčnými stresy (např. hypoxie, nedostatek nukleotidů, poškození mitotického vřeténka, aktivace onkogenů a především poškození DNA) spouští transkripci svých cílových genů, a to prostřednictvím vazby na specifické sekvence DNA v jejich promotorech. Cílových genů bylo popsáno více než 60, včetně takových, jejichž produkty navozují blok buněčného cyklu (p21, 14-3-3σ, GADD45,...), apoptózu (Bax, Apaf-1, CD95/Fas/APO1, PIGs,...), opravy DNA (p48, R2) a další procesy (TSP1, cyklin G,...). Vedle vysokého počtu proteinů, s nimiž p53 interaguje formou meziproteinových interakcí, právě obrovský počet genů, jejichž expresi protein p53 reguluje, a množství buněčných procesů, které tak p53 může ovlivnit, vynesl genu p53 označení „a master gene“ (*Michael Resnick*), tedy gen, který vládne ostatním a rozhoduje o nich. Můžeme mu pro jednoduchost říkat česky ne zcela přesně **vůdčí gen**.

Mutace p53 jsou častou událostí při vývoji řady různých nádorů. Na rozdíl od některých jiných nádorových supresorů, které jsou v buňkách inaktivovány většinou formou zkrácení výsledného proteinu, který potom postrádá některé své strukturní složky a tím zcela svou funkci (např. APC, BRCA1,...), gen p53 je postižen zdaleka nejčastěji bodovými mutacemi, tedy záměnami jednoho nukleotidu za jiný. K dnešnímu dni bylo v databázi IARC zaznamenáno celkem 18 500 mutací p53, z toho více než 1 300 různých bodových („*missense*“) mutací, což při délce kódující sekvence odpovídající výsledným 393 aminokyselinám v proteinu p53 je počet mimořádný.

Samotný počet odlišných mutací by nebyl až tak zajímavý, nebýt toho, že všechny mutace p53 nejsou stejné ve svých důsledcích pro funkci p53.

Opakovanou analýzou mutací p53 v různých typech nádorů byla postupně sestavována mutační spektra p53, byly nalézány „hot spot“ oblasti, a tak se tvořila představa o povaze mutací. Mutace postihují ty části molekuly p53, které buď bezprostředně ovlivňují kontakt proteinu p53 s DNA nebo mění konformaci molekuly p53 takovým způsobem, který vazbu na DNA znemožní. Tato historicky původní představa mutací p53 je tedy spojena s úplnou ztrátou schopnosti p53 vázat se na cílové sekvence a tedy se ztrátou schopnosti regulovat transkripci cílových genů – tzv. mutace „**loss-of-function**“. Jedním z důsledků této ztráty funkce je neschopnost transaktivovat gen *mdm2*, který představuje zpětnovazební regulační smyčku p53 a zprostředkovává jeho degradaci. Neschopnost mutantního p53 aktivovat expresi *mdm2* má za následek akumulaci p53 v buňce.

Během několika minulých let se ale hromadily informace o tom, že to zřejmě s povahou mutací p53 není tak jednoduché nebo jednoznačné. Jedním z cílů konference v Lyonu bylo tyto informace shromáždit, vyhodnotit a zohlednit je v plánech na další rozvoj databáze mutací p53. Pokusím se teď krátce charakterizovat některé typy mutací p53, které byly v Lyonu diskutovány a které se odlišují od zmíněných „klasických“ mutací spojených s úplnou ztrátou funkce p53.

Jestliže klasická představa mutace p53 je spojena se ztrátou transaktivace schopnosti postiženého proteinu, potom můžeme na prvním místě mezi „neklasickými“ mutacemi jmenovat tzv. **superaktivní** mutace. To jsou mutace, které ve srovnání se standardním proteinem zvyšují specifickou i nespecifickou vazbu p53 na DNA a tím jeho schopnost transaktivovat cílové geny (*Carol Prives*).

Výraznou skupinu mutant p53 představují tzv. mutace „**gain-of-function**“, tj. takové, které struktuře proteinu p53 přinášejí nějakou novou funkci (*Moshe Oren, Varda Rotter, Giovanni Blandino, Kent Soe, Guillermina Lozano, Arnold J. Levine*). Zdá se, že pro „gain-of-function“ je nezbytná N-koncová část proteinu p53 (*Moshe Oren*) nebo je zprostředkována DNA vazebnou doménou. Ta není u mutantů schopná vázat DNA a zůstává tak „volná“ pro jiné funkce. Všichni se shodli na tom, že „gain-of-function“ nesouvisí s transaktivací, možná spíše s represí transkripce některých genů (např. CD95/Fas), ale obecně je přijímána představa, že „gain-of-function“ je realizována mechanismem protein-proteinových interakcí. V těchto interakcích mohou být partnerem p53 další členové téže rodiny – p63, p73 (*Moshe Oren, Giovanni Blandino, Arnold J. Levine*) nebo proteiny se zcela odlišnou funkcí jako např. topoizoméráza I (*Kent Soe*).

Další stále se rozrůstající skupinou mutací p53 jsou mutace **podmínečné**, především **teplotně senzitivní** (*ts*), případně **chladově senzitivní** (*cs*). Původně byly tyto vzácně detekované mutace považovány za spíše zajímavé, případně experimentálně využitelné výjimky mezi mutacemi p53. Se stále častějším používáním funkčních testů na místo molekulárních analýz struktury DNA při vyšetřování statutu p53 ale podíl těchto mutací neustále narůstá. Status teplotní senzitivity je sám o sobě zajímavý, protože poukazuje na skutečnost, že všechny mutace nejsou stejné. Zatímco některé rozvrací strukturu proteinu p53 zcela a nevratně, znemožňují bezvýhradně jeho transaktivaci funkci a jsou tedy **zcela inaktivující**, jiné mutace sice rozvrací standardní strukturu p53, ale ponechávají ji poněkud flexibilní a za určitých podmínek (např. změnou

teploty) umožňují její návrat do funkční podoby, jsou tedy jen **částečně inaktivující**. Mnohem podstatnější okolností teplotně senzitivních mutací p53 je ale fakt, že jsou často doprovázeny dalším fenotypovým znakem naplňujícím podstatu částečné inaktivace. Zatímco standardní protein umí rozpoznat a následně fungovat na všech svých popsanych responzivních elementech (i když s odlišnou afinitou), *ts* mutanty jsou často **diskriminující**, to znamená, že jsou více nebo méně funkční na některých responzivních elementech p53, zatímco jsou zcela nefunkční na jiných (*Michael Resnick*). A samozřejmě fenotyp buňky, která nese zcela inaktivující mutaci p53 může být významně odlišný od fenotypu buňky, ve které jsou některé funkce p53 zachovány.

Další kategorií mutací p53 jsou mutace **supresorové**. Ty po svém vnesení do již mutovaného genu p53 mohou „vyrušit“ účinek první mutace a navrátit tak molekulu p53 do částečně nebo zcela funkčního stavu (*Rainer K. Brachmann, Penka Nikolova*). Ze zmíněných typů mutací p53 jsou právě supresorové možná na první pohled nejméně klinicky relevantní. Jistě se s nimi při analýze p53 v nádorech nesetkáváme často a také cílené vnášení dalších mutací do poškozeného genu p53 nebude hlavní formou terapie ani v budoucnu. Jejich studium nás ale přibližuje pochopení na jedné straně podstaty fungování a struktury mutací p53 a na straně druhé odhalení možných mechanismů jejich reaktivace.

Reaktivace mutantů p53, to bylo další velké téma, které se prolínalo celou konferencí v Lyonu. Hned několik autorů přednášelo své výsledky dokumentující reaktivace některých mutantů p53, a to pomocí CDB3 (*Assaf Friedler, Galina Selivanova*), pomocí nízkomolekulárních látek PRIMA-1 a RITA (*Klas Wiman, Galina Selivanova*), sloučenin „98“ (*Karen S. Vousden*) nebo dokonce prostřednictvím tzv. adaptorového proteinu (vytvářením chiméry mutantní p53 s dalším proteinem – p73) (*Matthias Dobbstein*). Klíčové a opakující se bylo zjištění všech autorů, kteří se o reaktivaci mutantního proteinu p53 pokoušejí, že rozdíly mezi mutanty p53 jsou velké a žádná forma reaktivity není účinná beze zbytku na všechny kategorie mutantů, ale vždy jen na určitý okruh mutantních forem p53.

Mezi další náměty, kterým se na konferenci věnovala pozornost, patřila např. struktura proteinu p53, což má těsnou návaznost na pochopení funkce a také dysfunkce a možné reaktivity mutantních p53 (*Thanos D. Halazonetis, Assaf Friedler, Penka Nikolova*), posttranslační úpravy p53 (*Carl W. Anderson*), vazba p53 na DNA (*Wolfgang Deppert, Ella Kim,*

Richard Iggo), polymorfismus p53 (*Anne-Lise Borresen-Dale, Kanaga Sabapathy*) a polymorfismus MDM2 (*Arnold J. Levine*) a samozřejmě také novinky týkající se dalších molekul bezprostředně signalizujících k p53 (*Karen S. Vousden, Klas Wiman, Kent Soe, Anne-Lise Borresen-Dale*). Hlavním smyslem konference ale bylo na základě současných poznatků vytýčit nové směry a tendence ve vývoji databáze mutantů p53. A z několikadenní debaty jasně vyplynulo: mutace p53 jsou velmi rozmanité a mohou velmi odlišným způsobem ovlivnit vlastnosti výsledného proteinu. Proto se zdá, že bude nezbytné do budoucna vytvářet „funkční“ databázi, tj. sbírat data o přesnějších funkčních dopadech jednotlivých mutací na výsledný protein p53. Do budoucna bude také nutné přesně popsat a pochopit, jak adekvátně jednotlivé funkční testy (v kvasinkách, v savčích buňkách...) vystihují skutečnou biologicky a klinicky relevantní povahu jednotlivých mutantů (*Alberto Inga*). Jestliže byl gen p53 nazván vůdcím pro velký počet různých genů, jejichž exprese ovlivňuje, a pro velký počet různých proteinů, s nimiž interaguje, tak byl také nazván **vůdcím genem rozmanitosti** („a master gene of diversity“) pro obrovskou rozmanitost mutantů s různými funkčními vlastnostmi, které mohou ze standardní molekuly p53 vznikat v důsledku záměn jednotlivých aminokyselin za jiné.

Na závěr bych si dovolila vypůjčit model *Michaela Resnicka*, kterým se pokusil vystihnout současný pohled na funkci standardního p53 a jeho mutantních forem. Svůj model označil jako „**p(piano)53**“. Standardní p53 je protein, který transaktivuje celou řadu genů, na pomyslném pianu tyto geny představují jednotlivé klávesy a p53 je schopen hrát určitý, harmonický akord. Naše původní představa o mutacích p53 byla taková, že ztrácejí svou funkci a tím svou schopnost hrát a výsledkem je ticho. Současná představa je taková, že různé mutanty jsou ve své schopnosti hrát na piano poškozeny do různé míry a výsledkem jejich hry je spíše než ticho změněný, poškozený, neharmonický akord. To má samozřejmě odlišné dopady na buňku a také to vyžaduje odlišné způsoby nápravy, reaktivity. A právě v této rozmanitosti je určité vysvětlení toho, proč zjednodušené přístupy k pochopení mutací p53 a vyvození jednoduchých klinických souvislostí zatím selhávalo. Uvidíme, co přinese tento novější pohled na p53 a na „hudbu“, kterou hrají jednotlivé varianty tohoto úžasného proteinu.

Účast na konferenci i tato práce byly podpořeny grantem IGA MZ ČR č. MZ00020980501