

PROTEIN P53 A PROTINÁDOROVÁ TERAPIE

PROTEIN P53 AND ANTI-CANCER THERAPY

KOTALA V.¹, ULDRIJAN S.¹, NENUTIL R.², VOJTĚŠEK B.¹

¹ODDĚLENÍ EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

²ODDĚLENÍ PATOLOGIE, FN-BRNO, PRACOVNÍSTĚ PORODNICE, BRNO

Souhrn: Protein p53 hraje klíčovou roli v inhibici buněčné proliferace v závislosti na vlivu různých stresových podmínek. Stresem indukovaný p53 spouští, podle míry poškození DNA, buď mechanismy vedoucí k programované buněčné smrti (apoptóze) nebo indukuje zastavení buněčného cyklu. Funkce tohoto proteinu je ovlivněna řadou mechanismů, k nimž patří zejména mutace a interakce s buněčnými a virovými onkoproteiny. Vývoj lidských nádorů bývá provázen inaktivací biochemických drah regulovaných proteinem p53, nejčastěji mutacemi genu p53. Tyto skutečnosti vedly k navržení možných terapeutických přístupů, využívajících metod molekulární biologie, které by byly schopny obnovit původní funkci proteinu p53 v nádorové buňce. Tyto přístupy mohou v budoucnu značnou měrou přispět ke zvýšení efektivity konvenční léčby nádorových onemocnění.

Klíčová slova: p53, nádorová onemocnění, terapie

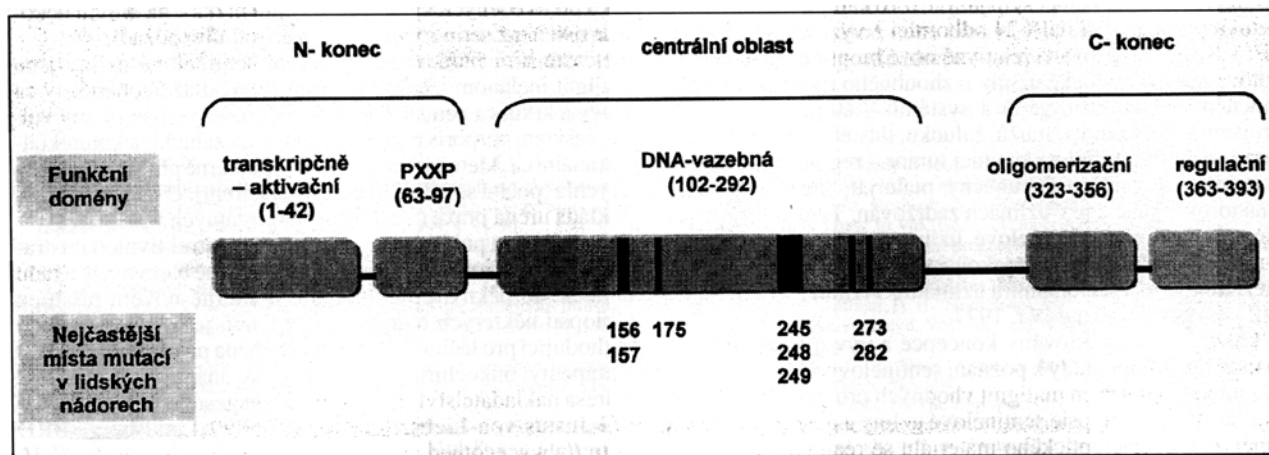
Summary: Protein p53 plays a key role in inhibition of the cell proliferation in response to various types of stress. The induced p53 protein triggers either growth arrest or apoptosis. p53 function is modulated by mechanisms including mutations as well as interactions with cellular and viral oncoproteins. The development of human cancers is frequently associated with the inactivation of p53-mediated biochemical pathways. Mutations are the most common mechanism of p53 inactivation in most human cancers. These findings led to designing of potential therapeutical approaches that using molecular biology methods reactivate p53 function in tumour cells lacking functional p53. These strategies could enhance the effectiveness of commonly used cancer therapies.

Key words: p53, cancer, therapy

Buněčná proliferace je velmi komplexní proces, který je regulován celou řadou specifických genů. Narušení funkce těchto genů může mít fatální následky a způsobit neoplastickou transformaci buňky. Mezi nejčastější příčiny inaktivace regulačních genů u nádorů patří mutace. Postupně byly objeveny stovky mutací těchto genů mající vztah k různým typům nádorových onemocnění. Mezi tyto geny prokazatelně patří také nádorový supresorový gen p53.

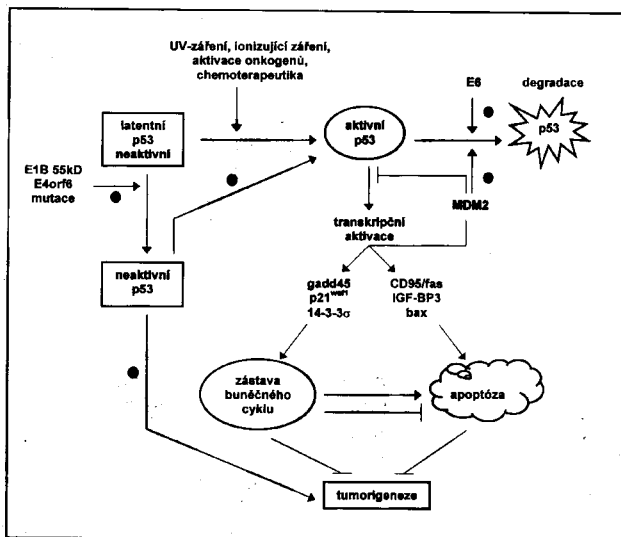
Lidský gen p53 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13). Celková délka genu je přibližně 20kb a je složen z 11 exonů, z nichž první je nekódující, a 10 intronů (5, 20). Výskyt a sekvenční homologie dosud prozkoumaných genů p53 u různých druhů živočichů, od bezobratlých po obratlovce, dokazuje jeho vysokou evoluční konzervativnost.

Fosfoprotein p53, kódovaný tímto genem, se skládá z 393 aminokyselin a obsahuje 4 hlavní funkční domény (Obr. 1). Na N-konci proteinu je transkripčně-aktivační doména, v centrální části je DNA-vazebná doména a na C-konci se nachází oligomerizační a regulační doména (19). p53 je jaderný transkripční faktor, regulující odpověď buňky na nejrůznější formy stresu (Obr. 2). Aktivuje transkripci genů podílejících se na řízení řady buněčných procesů, jako jsou: zástava buněčného cyklu v G1 fázi, S fázi nebo na přechodu z G2 do M fáze, inhibice amplifikace genů, apoptóza, inhibice replikace DNA, diferenciace, transkripce, reparace DNA a udržování stability genomu (3, 25, 28). Pro zabránění vzniku nádorů je zvláště významná jeho schopnost řídit odpověď buňky na poškození dědičné informace uložené v DNA. Po poškození DNA zasta-



Obrázek 1. Struktura proteinu p53 s hlavními funkčními doménami. Černé jsou vyznačeny oblasti, které jsou u lidských nádorů nejčastěji postiženy mutacemi. Čísla vyjadřují pořadí mutovaných aminokyselin.

Obrázek 2. Protein p53 je v normální buňce udržován na velmi nízké hladině v latentní neaktivní formě a je aktivován působením různých forem stresu. Tímto stresem může být např. poškození DNA (UV nebo ionizující záření, syntetická chemoterapeutika atd.) nebo aktivace onkogenů. Aktivní p53 indukuje transkripci specifických cílových genů, jejichž produkty buď zastaví buněčný cyklus (22) nebo spustí programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Naopak může být p53 inaktivován interakcemi s řadou virových a buněčných onkoproteinů (29), které inhibují jeho transkripční aktivitu nebo stimulují jeho degradaci. Významným mechanismem inaktivace p53 jsou také různé mutace, které mění jeho konformaci a negativně ovlivňují jeho transkripční aktivitu. Černé body ve schématu znázorňují místa potenciálního terapeutického zásahu.



ví p53 buněčný cyklus v některém z kontrolních bodů a umožní tak reparaci poškozené DNA. Pokud je DNA poškozena ve velkém rozsahu a nelze ji opravit, podílí se p53 na indukci programované buněčné smrti (apoptózy) a tím zabrání přenosu tohoto poškození do dceřiných buněk.

V dnešní době existuje dostatek experimentálních a klinických důkazů o tom, že změny v genu p53 a jeho produktu úzce souvisí se vznikem sporadických i dědičných forem lidských malignit. Mutace p53 se vyskytují u mnoha různých typů nádorů. Charakter a výskyt mutací závisí často na typu tkáně, ze které nádor vzniká, a částečně také na endogenních a exogenních faktorech zodpovědných za mutagenézi. První zmínku o pravděpodobné korelaci mezi konkrétním nádorovým onemocněním a mutací p53 podali Harris a Ozturk (8, 14), kteří zjistili vysokou frekvenci přítomnosti transverze G>T v kodonu 249 u jaterního karcinomu populací jižní Afriky a východní Asie. Postupně byla prokázána celá řada bodových mutací zodpovědných za expresi konformačně změněného proteinu p53, a posunových mutací způsobujících, spolu s nesmyslnými, zkrácení tohoto proteinu. Přibližně 80-90% všech mutací, zejména bodových, je soustředěna do centrální části p53 a postihují DNA-vazebnou doménu. Jedná se o tzv. "hot spot" mutace v kodonech 175, 249, 273 a 282. Frekvence a distribuce těchto mutací je různá u různých typů nádorů. Mutacemi v DNA-vazebné doméně vzniká protein, který není schopen sekvenčně specifické vazby na DNA a následné aktivace cílových genů. Tyto mutace se vyskytují především u nádorů plic, tlustého střeva, mozku, prsu, slinivky a jícnu. Častý výskyt mutací v genu p53 byl také nalezen u dědičně podmíněných forem nádorů (jde o zárodečné bodové mutace v kodonech 175, 245, 248 a 273), jako je Li-Fraumeni syndrom (LFS). Jedná se o zřídka se vyskytující autosomálně-dominantní syndrom, který poprvé popsali Li a Fraumeni (16). Typická diagnóza je charakterizována tvorbou sarkomů u kostní a měkkých tkání již v dětském věku. Vedle tohoto klasického fenotypu existuje ještě tzv. Li-Fraumeni syndrom-like (LFS-L), který se liší od LFS tím, že u postižených rodin dochází k tvorbě četných malignit různého histologického typu. Zděděné mutace v genu

p53 u LFS rodin byly v heterozygotní formě nalezeny u nenádorových buněk. Nemají vliv na vývoj jedince, ale pravděpodobně způsobují predispozici jejich nositelů k tumorigenезi. Většina mutací u těchto syndromů je v DNA-vazebné doméně. Byly však zjištěny i mutace v oligomerizační doméně v kodonech 337 (18) a 344 (30).

Další významné mechanismy inaktivace p53 vztahující se k neoplasiím jsou uvedeny v následujícím tabulkovém přehledu.

Tabulka I. Přehled nejdůležitějších mechanismů inaktivující funkci p53 a s ním spojená nádorová onemocnění [upraveno podle Vogelstein a spol. (32)].

Mechanismus inaktivace p53	Důsledek inaktivace	Typické nádory
Delece C-koncové oblasti	Neschopnost tvorby tetramerů p53	Sporadické karcinomy na různých místech
Nadměrná exprese genu mdm2	Zvýšená degradace p53	Sarkomy a nádory mozku
Virová infekce	Inaktivace p53 interakcemi s virovými onkoproteiny, které inhibují jeho transkripční aktivitu (E1B-55kDa protein adenoviru) nebo stimulují jeho degradaci (E6 protein lidského papilomaviru)	Karcinom děložního čípku, jater a čtené lymfomy
Delece genu p14 ^{ARF}	Neschopnost inhibice MDM2 proteinu s následnou ztrátou regulace degradace p53	Karcinom prsu, nádory mozku a plic
Mimojaderná lokalizace proteinu p53 v cytoplasmě	Absence funkce p53 (p53 je funkční pouze v jádře)	Neuroblastom

p53 a terapie nádorů

Většina nádorových onemocnění je úzce spjata s aberantní expresí proteinu p53, proto se výzkum zaměřil také na vypracování potenciálních terapeutických přístupů, které by byly schopny in vivo v nádorové tkáni obnovit funkci tohoto proteinu p53. Jelikož mutace patří mezi nejvýznamnější mechanismy, které inaktivují funkci p53, bude znalost statusu p53 (zda je mutantní nebo tzv. *wild-type*) důležitá pro budoucí výběr správné terapie. Tato domněnka vychází ze studií, které ukázaly, že většina nádorů exprimujících mutantní p53 je rezistentní k chemoterapii a radioterapii (1, 4, 26, 31). Ani tato strategie však nemusí být pro výsledný terapeutický efekt rozhodující, protože některé nádory s mutantním p53 jsou citlivé na látky poškozující DNA (33). Výběr správné terapie bude záležet nejen na tom, zda je p53 inaktivován mutací nebo interakcí s endogenními virovými a buněčnými onkoproteiny, ale i na celkovém charakteru nádorové tkáně, především na množství a typu genetických abnormalit.

V následujících odstavcích je uveden přehled možných terapeutických přístupů, které jsou schopny obnovit funkci proteinu p53 v nádorové buňce popřípadě v buňkách s nefunkčním p53 indukovat proces programované buněčné smrti. Některé z nich jsou již ve stádiu klinických testů.

Vnesení genu pro *wild-type* p53 do nádorové buňky pomocí virových a nevirových nosičů

Pro tento účel se využívá virových vektorů (retroviry, adenoviry), ale i nevirových, jako např. liposomů modifikovaných transferinem. (23, 35). Gen pro p53 byl vnášen pomocí retrovirů a adenovirů neschopných replikace v cílové buňce. Tímto postupem bylo dosaženo inhibice buněčné proliferace u některých nádorů, konkrétně u karcinomu prsu, děložního čípku a plic (23). Bohužel tato „virová terapie“ naráží na tři zásadní problémy: I) lze ji aplikovat pouze na určité typy nádorových tkání, II) adenoviry jsou imunogenní, což komplikuje opakovaný terapeutický zásah, III) adenoviry mají slabou schopnost penetrace do hlubších vrstev nádorové tkáně.

Obnovení funkce proteinu p53 blokováním jeho interakcí s inhibičními proteiny

Obnova funkce p53 je zřejmě obtížnější u nádorů exprimujících virové onkoproteiny (E6-karcinomy děložního čípku) nebo endogenní buněčné onkoproteiny (MDM2-sarkomy). E6 a MDM2 stimulují degradaci proteinu p53, proto může jejich zablokování výrazně zvýšit hladinu funkčního p53. Pro zeslabení inhibičního efektu těchto proteinů byly použity tyto postupy: I) regulace genové exprese s následnou redukcí hladiny proteinů vnesením "antisense" RNA proti oběma genům (E6 a mdm2) do buňky pomocí adenoviru (10, 15), II) blokování interakce proteinů E6 nebo MDM2 s p53 prostřednictvím protilátek proti vazebným místům, nebo prostřednictvím peptidů schopných rozrušit jejich vzájemnou vazbu a uvolnit tak funkční p53 (6, 7), III) použití mutantní formy p53, která není schopna interakce s inhibičními proteiny, ale inhibuje proliferaci buněk (17). Pro terapeutické využití dvou posledně jmenovaných přístupů bude nutné najít specifický a účinný způsob přenosu proteinů a peptidů do nádorové buňky.

Aktivace mutantního p53 pomocí peptidů a protilátek

Specifická DNA-vazebná aktivita p53 je negativně regulována jeho C-koncovou doménou, čímž je p53 udržován v latentní neaktivní formě. Konverze z neaktivní do aktivní formy se děje např. fosforylací C-konce (28), částečnou delecí C-konce nebo vazbou protilátek PAb421 a série Bp53 na epitopy C-konce (13, 21). Studie ukázaly, že i mutantní p53 může být aktivován vazbou protilátky PAb421 (2). Tento jev potvrzuje hypotézu, že mutantní p53 může být v nádorové buňce reaktivován a plnit tak svou původní funkci. Podobně Selivanova a spol. (24) obnovili funkci mutantního p53 pomocí syntetického peptidu obsahující sekvenci z C-konce p53. Tento způsob aktivace je velmi významný v souvislosti s vysokou četností mutací měnících konformaci v DNA-vazebné doméně. Pro praktické využití tohoto způsobu aktivace p53 platí výše zmíněná podmínka získání účinného nástroje pro transport proteinů do nádorové buňky.

Eliminace nádorových buněk s nefunkčním p53 prostřednictvím mutantního adenoviru

Zajímavou možností léčby nádorů s nefunkčním p53 je využití mutantního adenoviru s deletovaným genem pro virový protein E1B-55kDa, označovaného ONYX-015 (12). Ztráta exprese proteinu E1B-55kDa způsobí, že ONYX-015 je schopen replikace pouze v buňkách s nefunkčním p53, kdežto v normálních a nádorových buňkách s *wild-type* p53 je jeho replikace potlačena. ONYX-015 tedy selektivně ničí nádorové buňky s nefunkčním p53 a v klinických testech byl úspěšně použit k terapii karcinomu prsu, tlustého střeva, vaječníku, děložního čípku a nádorů rezistentních k některým cytostatikům (12). Toxicita u normálních buněk nebyla zjištěna. Hlavní problém tohoto terapeutického přístupu je, že ONYX-015 je imunogenní, a proto je šíření viru v organismu značně omezené. Tento problém může v budoucnu vyřešit současná aplikace viru spolu s imunosupresivními látkami. Novější výzkumy hovoří spíše ve prospěch efektivnější kombinované terapie, např. kombinace ONYX-015 s některými cytostatiky (cisplatin, 5-fluorouracil), než pro aplikaci viru samotného.

Indukce p53-nezávislé apoptózy prostřednictvím syntetických chemoterapeutik

Hlavní překážkou účinné léčby některých nádorů je jejich značná rezistence způsobená často narušením regulační dráhy spouštějící p53-závislou apoptózu. Současné léčebné postupy proto využívají indukce apoptózy nezávislé na p53 pomocí některých dostupných chemoterapeutik, např. etoposidu (9), taxolu (34), vinkristinu a doxorubicinu (11). Popsané strategie obnovy funkce p53 v nádorové buňce by mohly přispět ke zlepšení kurability nádorů. Maximálního účinku bude zřejmě dosaženo kombinací těchto strategií s konvenčními postupy v radio- a chemoterapii, spíše než jejich samostatnou aplikací. Mnohé z nich se po překonání počátečních potíží a nedostatků mohou stát neocenitelnou součástí moderní léčby nádorů.

Práce byla podporována grantovým projektem NC/7131-3.

Literatura

1. Aas T., Borresen A. L., Geisler S., Smith-Sorensen B., Johnsen H., Varhaug J. E., Akslen L. A. and Lonning P. E.: Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;2(7):811-4.
2. Abarzuza P., LoSardo J. E., Gubler M. L. and Neri A.: Microinjection of monoclonal antibody PAb421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53. *Cancer Res* 1995;55(16):3490-4.
3. Agarwal M. L., Agarwal A., Taylor W. R., Chernova O., Sharma Y. and Stark G. R.: A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14775-80.
4. Beaudry G. A., Bertelsen A. H. and Sherman M. I.: Therapeutic targeting of the p53 tumor suppressor gene. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7(6):592-600.
5. Benchimol S., Lamb P., Crawford L. V., Sheer D., Shows T. B., Bruns G. A. and Peacock J.: Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 1985;11(5):505-10.
6. Blaydes J. P., Gire V., Rowson J. M. and Wynford-Thomas D.: Tolerance of high levels of wild-type p53 in transformed epithelial cells dependent on auto-regulation by mdm-2. *Oncogene* 1997;14(15):1859-68.
7. Bottger V., Bottger A., Howard S. F., Picksley S. M., Chene P., Garcia-Echeverria C., Hochkeppel H. K. and Lane D. P.: Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene* 1996;13(10):2141-7.
8. Bressac B., Kew M., Wands J. and Ozturk M.: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350(6317):429-31.
9. Dou Q. P. and Lui V. W.: Failure to dephosphorylate retinoblastoma protein in drug-resistant cells. *Cancer Res* 1995;55(22):5222-5.
10. Hamada K., Sakaue M., Alemamy R., Zhang W. W., Horio Y., Roth J. A. and Mitchell M. F.: Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996;63(2):219-27.
11. Harris C. C.: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(20):1442-55.
12. Heise C., Sampson-Johannes A., Williams A., McCormick F., Von Hoff D. D. and Kirm D. H.: ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytotoxicity and antitumor efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3(6):639-45.
13. Hollstein M., Soussi T., Thomas G., von Brevern M. C. and Bartsch: P53 gene alterations in human tumors: perspectives for cancer control. *Recent Results Cancer Res* 1997;143:369-89.
14. Hsu I. C., Metcalf R. A., Sun T., Welsh J. A., Wang N. J. and Harris C. C.: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350(6317):427-8.
15. Kondo S., Barnett G. H., Hara H., Morimura T. and Takeuchi J.: MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 1995;10(10):2001-6.
16. Li F. P. and Fraumeni J. F.: Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71(4):747-52.
17. Lin J., Chen J., Elenbaas B. and Levine A. J.: Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 1994;8(10):1235-46.
18. Lomax M. E., Barnes D. M., Gilchrist R., Picksley S. M., Varley J. M. and Camplejohn R. S.: Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family. *Oncogene* 1997;14(15):1869-74.
19. May P. and May E.: Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18(53):7621-36.
20. Oren M.: The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 1985;823(1):67-78.
21. Pospíšilová S., Brazda V., Amrichova J., Kameřmeierova R., Paleček E. and Vojtesek B.: Precise characterisation of monoclonal antibodies to the C-terminal region of p53 protein using the PEPSAN ELISA technique and a new non-radioactive gel shift assay. *J Immunol Methods* 2000;237(1-2):51-64.
22. Pospíšilová a Vojtěšek B.: Protein p21WAF1 a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. *Klinická onkologie* 2000;13(1):13-16.
23. Roth J. A. and Cristiano R. J.: Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997;89(1):21-39.

24. Selivanova G., Iotsova V., Okan I., Fritsche M., Strom M., Groner B., Grafstrom R. C. and Wiman K. G.: Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med* 1997;3(6):632-8.
25. Shao C., Deng L., Henegariu O., Liang L., Stambrook P. J. and Tischfield J. A.: Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7405-10.
26. Shelling A. N.: Role of p53 in drug resistance in ovarian cancer. *Lancet* 1997;349(9054):744-5.
27. Sionov R. V. and Haupt Y.: The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999;18(45):6145-57.
28. Steegenga W. T., van der Eb A. J. and Jochemsen A. G.: How phosphorylation regulates the activity of p53. *J Mol Biol* 1996; 263 (2):103-13.
29. Trbušek M. a Vojtěšek B.: Protein MDM2 a nádorová onemocnění. *Klinická onkologie* 1998;(5):144-46.
30. Varley J. M., Thorncroft M., McGown G., Tricker K., Birch J. M. and Evans D. G.: A novel deletion within exon 6 of TP53 in a family with Li-Fraumeni-like syndrome, and LOH in a benign lesion from a mutation carrier. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;90(1):14-6.
31. Velculescu V. E. and El-Deiry W. S.: Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996;42(6 Pt 1):858-68.
32. Vogelstein B., Lane D. and Levine A. J.: Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-10.
33. Wahl A. F., Donaldson K. L., Fairchild C., Lee F. Y., Foster S. A., Demers G. W. and Galloway D. A.: Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 1996;2(1):72-9.
34. Walker K. K. and Levine A. J.: Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(26):15335-40.
35. Xu L., Pirollo K. F. and Chang E. H.: Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiation in vitro. *Hum Gene Ther* 1997;8(4):467-75.