

ХІРУРГІЯ

УДК 577.2+577.218+616.62+616-006.6

Возіанов О.Ф., Юрах А.О., Лопез-Гуерреро Х.А., Рамос Д., Рубіо Х., Ломбарт-Босх А.
Vozianov O.F., Yurakh A.O., Lypez-Guerrero J.A., Ramos D., Rubio J., Lombart-Bosch A.ПОШКОДЖЕННЯ ГЕНА *p53* ПРИ ПЕРЕХІДНОКЛІТИННОМУ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Інститут урології АМН України, м. Київ

Відділ патології медичного факультету університету Валенсії, Іспанія

Валенсійський інститут онкології (Instituto Valenciano de Oncologia), Іспанія

ПОШКОДЖЕННЯ ГЕНА *p53* ПРИ ПЕРЕХІДНОКЛІТИННОМУ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА – Вивчено пошкодження гена *p53* з використанням основного на циклічній ланцюговій реакції конформаційного поліморфізму однострочної ДНК (PCR-SSCP) і секвенування екзонів 5-8 даного гена та експресії протеїну *p53* за допомогою імуногістохімічного методу на 84 перехідноклітинних пухлинах сечового міхура людини. SSCP-позитивні випадки склали 26,2%. Наявність мутацій підтверджена секвенуванням у 11,9% пухлин. Виявлено 5 випадків поліморфізму та одну мутацію в кодоні 213. Не було відмічено чітко виражених «гарячих точок», хоча в кодонах 273 та 285 виявлено по дві мутації. У трьох пухлинах з мутаціями гена *p53* імуногістохімічне дослідження не дало можливості встановити його пошкодження. Зі збільшенням поширеності експресії протеїну *p53* в пухлині зростали її стадія ($p=0,006$) та ступінь клітинної атипії ($p=0,0004$). Не спостерігалось значущого зв'язку між мутаціями гена *p53* та двома останніми показниками. Встановлено, що тільки поєднане застосування секвенування гена *p53* та імуногістохімічного дослідження експресії протеїну *p53* дозволяє достовірно оцінити функціональний стан цього гена в клітинах перехідноклітинного раку сечового міхура.

ПОВРЕЖДЕННЯ ГЕНА *p53* ПРИ ПЕРЕХОДНОКЛЕТОЧНОМУ РАКУ МОЧОВОГО ПУЗЬРЯ – Изучено повреждения гена *p53* с использованием базирующегося на циклической цепной реакции конформационного полиморфизма однострочной ДНК (PCR-SSCP) и секвенирования экзонов 5-8 данного гена, а также экспрессии протеина *p53* с помощью иммуногистохимического метода на 84 переходноклеточных опухолях мочевого пузыря человека. SSCP-положительные случаи составили 26,2%. Наличие мутаций подтверждено секвенированием в 11,9% опухолей. Обнаружено 5 случаев полиморфизма и одну мутацию в кодоне 213. Не отмечено четко выраженных «горячих точек», хотя в кодонах 273 и 285 выявлено по две мутации. В трех опухолях с мутациями гена *p53* иммуногистохимическое исследование не дало возможности установить его повреждение. С увеличением распространенности экспрессии протеина *p53* в опухоли увеличивались ее стадия ($p=0,006$) и степень клеточной атипии ($p=0,0004$). Не наблюдалось значимой связи между мутациями гена *p53* и двумя последними показателями. Выведено, что только сочетанное применение секвенирования гена *p53* и иммуногистохимического исследования экспрессии протеина *p53* позволяет достоверно оценить функциональное состояние этого гена в клетках переходноклеточного рака мочевого пузыря.

DAMAGE OF *p53* GENE AT TRANSITIONAL-CELL CARCINOMA (TCC) OF BLADDER - Mutations of *p53* gene and *p53* protein expression were studied in 84 transitional-cell carcinomas of human bladder using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), sequencing of exon 5-8 and immunohistochemical method. SSCP-positive cases amount was 26,2%. Availability of mutations was confirmed by sequencing in 11,9% cases. Five cases of polymorphism and one mutation in codon 213 were revealed. No "hot points" were marked, but in codons 273 and 285 two mutation were revealed. In three tumors with *p53* gene mutations immunohistochemical study was not able to show its damage. Tumor stage ($p=0,006$) increased and level of its cellular differentiation ($p=0,0004$) decreased with increasing of *p53* protein expression. No significant relationship of *p53* mutations with the last two indices was observed. Only the combination of immunohistochemical study and *p53* gene sequencing is able to evaluate reliably the functioning of *p53* gene in cells of transitional-cell carcinoma of the bladder.

Ключові слова: ген *p53*, протеїн *p53*, імуногістохімія, аналіз послідовності, однострочковий конформаційний поліморфізм.

Ключевые слова: ген *p53*, протеин *p53*, иммуногистохимия, анализ последовательности, однострочковий конформаційний поліморфізм.

Key words: *p53* gene, *p53* protein, immunohistochemistry, sequence analysis, single-stranded conformational polymorphism.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ І АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ Пошкодження гена *p53* є

одним з найчастіших явищ під час багатоступінчастого процесу канцерогенезу різних пухлин людини, в тому числі перехідноклітинних раків сечового міхура (ПКР СМ). Ген *p53*, розміщений в короткому плечі 17 хромосоми, кодує однойменний протеїн, який бере участь в регуляції клітинного циклу, підтримці стабільності генома та запуску контрольованої клітинної смерті (апоптозу). Таким чином, *p53* є антионкогеном і втрата його функції призводить до пухлинного росту та прогресії пухлини [9].

За своєю структурою протеїн *p53* є тетрамером, який утворений чотирма однаковими субодинами. Присутність в тетрамері хоча б однієї пошкодженої субодинами викликає зміну просторової структури всієї молекули, що веде до втрати її функції. Виходячи з цього, мутація навіть одного алеля гена, при збереженому іншому, може призвести до втрати функціонального білка [3].

Незмінений протеїн *p53* швидко розкладається в клітині і тому не може бути виявлений за допомогою моноклональних антитіл. На противагу цьому, аномальний протеїн, який є продуктом мутованого гена, втрачає здатність розпадатися в клітині та накопичується в ній і тому може бути виявлений моноклональними антитілами. Це дає змогу оцінити функціональний стан цього білка в клітині і опосередковано виявити мутацію гена *p53* імуногістохімічним методом. Проте, даний метод може давати псевдонегативні результати, якщо мутація гена пошкоджує ділянку промотора *p53*, або коли результатом мутації є стоп-кодон, який перериває синтез протеїну. В такому випадку, за відсутності функції протеїну, *p53*-імунореактивність теж буде відсутня. В іншому випадку, коли спостерігається зв'язування протеїну *p53* вірусними чи клітинними білками, буде спостерігатися виражена імунореактивність, хоча ген *p53* не є мутованим, однак функція білка *p53* в цьому випадку теж втрачається. При гіперекспресії незміненого *p53* також буде спостерігатися імунореактивність, але функція білка при цьому буде збережена [9].

МЕТОЮ нашої роботи було вивчення пошкоджень мутацій гена *p53*, експресії білка *p53* та їх взаємозв'язку в клітинах ПКР СМ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ Дослідження проведено на 84 перехідноклітинних пухлинах, які були забрані під час відкритих та трансуретральних резекцій пухлин сечового міхура. Матеріал в максимально короткий термін заморожувався в рідкому азоті та в подальшому зберігався при температурі -80°C до проведення екстракції ДНК. Матеріалом для імуногістохімічного дослідження були депарафіновані зрізи (товщиною 5 мкм) парафінових блоків, виготовлених з фіксованих формаліном кусочків перехідноклітинних пухлин.

Для екстракції ДНК використано загальноприйнятий фенол-хлороформний метод та осадження ДНК за допомогою ацетату натрію [15].

Для скринінгу мутацій гена *p53* було використано полімеразну ланцюгову реакцію з визначенням однострочкового конформаційного поліморфізму (polymerase chain reaction-

based single-strand conformation polymorphism – PCR-SSCP). Ми застосували нерадіоактивний метод PCR-SSCP, описаний Ainsworth et al. [2], особливістю якого є зафарбування гелю нітратом срібла. Проводили аналіз екзонів 5-8 гена *p53* тому, що вони, згідно з даними літератури, включають в себе близько 80 % стабільних доменів гена і саме в них спостерігається понад 95 % мутацій, виявлених в спора-

дичних пухлинах людини [12]. Використані нами праймери, температура їх відпалу та розмір PCR-продукту наведені в таблиці 1. Для підтвердження наявності мутацій проводили секвенування всіх SSCP-позитивних випадків в автоматичному секвенаторі ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, США). Отриману послідовність нуклеотидів порівнювали з нормальною послідовністю гена *p53* [4].

Таблиця 1. Використані праймери, температура їх відпалу та розмір PCR-продукту

Екзон	Праймери		Температура відпалу, °C	Розмір продукту, bp
	прямий	зворотний		
5	TTCTCTTCCTGCAGTAC	GCCCCAGCTGCTCACCA	55	214
6	GGGCTGGTGGCCAGGGT	TAGTGTCAAACCAGACCTC	60	150
7	GTGTGTCTCTTAGGTTG	TGGCAAGTGGCTCCTGAC	55	142
8	CSTATCTGAGTAGTGGT	GTCCTGCTTGCTTACC	55	166

Для вивчення експресії протеїну *p53* була застосована стандартна імуногістохімічна методика авідин-біотин пероксидазного комплексу з використанням моноклональних антитіл DO-7 (DAKO, Данія) та реактивів з LSAB kit (DAKO, Данія). Оцінка поширеності експресії проводилась з використанням індексу імунореактивності (iIP) – відсотка забарвлених клітин серед 2000 клітин, підрахованих під світловим мікроскопом в різних випадкових ділянках препарату при збільшенні x40. Інтенсивність експресії оцінювалася наступною шкалою: 1 бал – слабка, 2 бали – середня, 3 бали – сильна.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою PCR-SSCP аналізу встановлено, що аномальна конформація одониткової ДНК тільки ексона 5 гена *p53* спостерігалися у 11,9 % (10/84), ексона 6 – у 6,0 % (5/84), ексона 7 – у 1,2 % (1/84), і ексона 8 – у 8,3 % (7/84), а хоча б одного з перерахованих екзонів (5 – 8) цього гена – у 26,2 %

(22/84) досліджуваних пухлин. З метою підтвердження мутацій PCR-продукт SSCP-позитивних випадків піддавався секвенуванню. Виявлені зміни ДНК наведені в таблиці 2 і 3. Результати секвенування підтвердили зміну нуклеотидної послідовності досліджуваних екзонів у 72,7 % (16/22) SSCP-позитивних пухлин. Очевидно, у решти пухлин аномальна конформація одониткової ДНК була зумовлена зміною нуклеотидної послідовності інтронів. Мутації гена *p53* описувалися рядом авторів як часте явище в клітинах ПКР СМ, але не існує єдиної думки, щодо їх частоти в цих пухлинах. Частота мутацій *p53*, виявлених в клітинах ПКР СМ, за даними літератури, становить від 23 до 58 % [11,12,17], що значно перевищує частоту мутацій у наших результатах. Методом секвенування ми встановили наявність мутацій досліджуваних екзонів тільки у 11,9 % (10/84) пухлин. Така варіабельність частоти мутацій може бути пов'язана з відмінностями досліджуваних груп пухлин.

Таблиця 2. Мутації, поліморфізм та точкові делеції гена *p53*, виявлені під час секвенування ДНК, екстрагованої з клітин ПКР СМ, та результати імуногістохімічного дослідження експресії білка *p53*

№ пухлини	Екзон	Кодон	Зміна кодону	Зміна нуклеотиду	Зміна амінокислоти	Тип пошкодження	iIP, %	Інтенсивність експресії, бали
3196	5	165	CAG→TAG	C→A	Gln→STOP	мутація	1	1
2378	5	175	CGC→CAC	G→A	Arg→His	мутація	70	2
3168	5	184	GAT→TAT	G→T	Asp→Tyr	мутація	100	3
2221	6	213	CGA→CGG	A→G	Arg→Arg	поліморфізм	40	1
2325	6	213	CGA→CCA	G→C	Arg→Pro	мутація	80	2
2483	6	213	CGA→CGG	A→G	Arg→Arg	поліморфізм	40	2
2487	6	213	CGA→CGG	A→G	Arg→Arg	поліморфізм	40	2
2747	6	213	CGA→CGG	A→G	Arg→Arg	поліморфізм	30	2
3254	6	213	CGA→CGG	A→G	Arg→Arg	поліморфізм	5	1
3172	7	248	CGG→CAG	G→A	Arg→Glu	мутація	40	2
2278	8	273	CGT→TGT	C→T	Arg→Cys	мутація	10	1
3471	8	273	CGT→CAT	G→A	Arg→His	мутація	80	2
2763	8	278	CCT→TCT	C→T	Pro→Ser	мутація	15	2
2481	8	285	GAG→AAG	G→A	Glu→Lys	мутація	30	3
3242	8	285	GAG→AAG	G→A	Glu→Lys	мутація	65	1
		287	GAG→GAC	G→C	Glu→Asp	мутація		
2479	8	294	GAG→AG	G→0	зсув рамки зчитування	делеція	80	2

Таблиця 3. Частота випадків з мутаціями, поліморфізмом та точковими делеціями, виявленими при секвенуванні екзонів 5 – 8 гена *p53* клітин ПКР СМ

Екзони	Мутація	Поліморфізм	Точкова делеція	Разом
5	25,0 % (4/16)	0	0	25,0 % (4/16)
6	6,25 % (1/16)	31,25 % (5/16)	0	37,25 % (6/16)
7	6,25 % (1/16)	0	0	6,25 % (1/16)
8	25,0 % (4/16)	0	6,25 % (1/16)	31,25 % (5/16)
5 – 8	62,5 % (10/16)	31,25 % (5/16)	6,25 % (1/16)	100 % (16/16)

Немалу частку виявлених нами змін ДНК складав поліморфізм – 31,3 % (5/16), який не призводить до зміни закодованої геном послідовності амінокислот, а значить, не впливає на його функцію. Поліморфізм спостерігався тільки в кодоні 213, але мутація в цьому кодоні виявлена лише в одному випадку. Високу частоту поліморфізму в кодоні 213 описали також ряд дослідників [6], а Lu et al. [13] – високу частоту мутацій. Серед мутацій у восьмих екзонах двічі спостерігалися пошкодження як кодону 273, так і кодону 285. Однак, окремі дослідники вказують на значно частіші мутації („гарячі точки“) в цих двох кодонах при ПКР СМ [13, 16]. В кодоні 248, який також був описаний рядом дослідників як „гаряча точка“ [13, 18], нами виявлено мутацію тільки в одному випадку. Таким чином, ми не спостерігали чітко виражених „гарячих точок“ при вивченні мутацій гена *p53* у досліджуваній групі пухлин, що підтверджує результати O’Connell et al. [14].

На відміну від ряду дослідників [5, 7], ми не виявили значущого кореляційного зв’язку між мутаціями екзонів 5 – 8 гена *p53* та іІР ($r_s = 0,19$; $p=0,09$) чи інтенсивністю імунореактивності до протеїну *p53* ($r_s = 0,03$; $p=0,80$), що підтверджує думку деяких авторів [8]. Проте в групі пухлин з відсутністю мутацій гена *p53* була відмічена тенденція до зменшення рівня іІР, порівняно з пухлинами, в яких ген був мутований. Не встановлено також достовірного взаємозв’язку між мутаціями гена *p53* та стадією пухлин ($\chi^2=2,86$; $p=0,24$) чи ступенем її клітинної атипії ($\chi^2=2,64$; $p=0,27$). Натомість, наші попередники виявляли зв’язок мутацій досліджуваного гена зі стадією, але не зі ступенем клітинної диференціації пухлин [10].

Серед досліджених пухлин у 20,8 % (16/77) випадків спостерігався іІР менший за 10 %, у 62,3 % (48/77) – від 10 до 50 %, та у 16,9 % (13/77) – іІР більший за 50 %. Низька інтенсивність імунореактивності виявлена у 36,4 % (28/77), середня – у 46,7 % (36/77) та висока – у 16,9 % (13/77) пухлин. Зі зростанням іІР спостерігалось лінійне збільшення інтенсивності імунореактивності, а також збільшення стадії пухлини ($\chi^2=14,5$; $p=0,006$) та зростання ступеня її клітинної атипії ($\chi^2=20,3$; $p=0,0004$). Лінійність цих зв’язків підтверджується кореляційним аналізом: $r_s=0,60$ ($p<0,0000005$), $r_s=0,29$ ($p=0,012$) та $r_s=0,33$ ($p=0,004$), відповідно. Ці дані збігаються з результатами інших дослідників [1]. На відміну від цього, не спостерігалось достовірного взаємозв’язку між інтенсивністю експресії протеїну *p53* та стадією пухлини ($\chi^2=1,82$; $p=0,77$) чи ступенем її клітинної атипії ($\chi^2=1,92$; $p=0,75$).

Ми виявили тільки одну мутацію (пухлина № 3196), яка призвела до появи стоп-кодону в п’ятому екзоні досліджуваного гена. В цьому випадку, як і слід було очікувати, не було виявлено імунореактивності до протеїну *p53*, хоча функція гена була втрачена (табл. 2). Крім того, з невідомих нам причин, ще в одному випадку з мутацією гена *p53* не відмічено імунореактивності до *p53* (пухлина № 2278).

ВИСНОВКИ 1. При перехідноклітинному раку сечового міхура не виявлено частих мутацій („гарячих точок“) в тому числі і у кодонах 273, 285 і 248 гена *p53*.

2. Не встановлено значущого кореляційного зв’язку між мутаціями екзонів 5 – 8 гена *p53* та індексом, інтенсивністю імунореактивності, а також – достовірного взаємозв’язку між мутаціями гена і стадією пухлини та ступенем її клітинної атипії.

3. Зі зростанням індексу імунореактивності спостерігалось збільшення стадії пухлини та зростання ступеня її клітинної атипії, але не виявлено взаємозв’язку між інтенсивністю імунореактивності та цими показниками.

4. Серед пухлин перехідноклітинного раку сечового міхура зустрічаються пухлини, імуногістохімічне дослідження яких, як і дослідження окремо мутацій гена *p53*, не дає змоги оцінити функціональний стан протеїну *p53*. Це пов’язано з появою мутації, яка призводить до виникнення

STOP-кодону або є результатом порушення механізмів регуляції активності протеїну *p53*. Тільки поєднане застосування імуногістохімічного дослідження експресії протеїну *p53* та секвенування гена дозволяє вірогідно виявити пошкодження гена *p53*.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ Подальше дослідження пошкодження гена *p53* за умови більшої вибірки хворих дозволить вірогідніше виявити наявність чи відсутність «гарячих точок» для мутацій гена *p53*. Аналіз пошкодження генів *MDM2*, *p14^{ARF}* та експресії відповідних ім протеїнів, що регулюють активність протеїну *p53*, дасть змогу глибше зрозуміти механізми втрати функції даного білка в пухлинах, в яких відсутні мутації гена *p53*. Доцільним є вивчення впливу вищеописаних пошкоджень на клінічний перебіг ПКР СМ, а також оцінка їх прогностичного значення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Abdel-Fattah R., Challen C., Griffiths T.R., Robinson M.C., Neal D.E., Lunec J. Alterations of TP53 in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of TP53 accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis // Br. J. Cancer. – 1998. – V. 77. – P. 2230-2238.
2. Ainsworth P.J., Surh L.C., Coulter-Mackie M.B. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant // Nucleic Acids Res., – 1991. – V. 19. Vp 405-406.
3. Blagosklonny M.V. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect // Faseb J. – 2000. – Vol. 14. – P. 1901-1907.
4. Buchman V.L., Chumakov P.M., Ninkina N.N., Samarina O.P., Georgiev G.P. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene // Gene. – 1988. – V. 70. – P. 245-252.
5. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G.T. et al. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns // Int. J. Cancer. – 1994. – V. 56. – P. 347-353.
6. Dalbagni G., Ren Z.P., Herr H., Cordon-Cardo C., Reuter V. Genetic alterations in tp53 in recurrent urothelial cancer: a longitudinal study // Clin. Cancer Res. – 2001. – V. 7. – P. 2797-2801.
7. Friedrich M.G., Riethdorf S., Erbersdobler A. et al. Relevance of p53 gene alterations for tumor recurrence in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder // Eur. Urol. – 2001. – V. 39. – P. 159-166.
8. Goudopoulou A., Saetta A., Korkolopoulou P., Patsouris E., Fanourakis G., Miaouli M. et al. p53 mutations detection in urinary bladder cancer in the Greek population: application of the NIRCAs assay // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2003. – Vol. 22. – P. 99-105.
9. 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. – V. 54. – P. 4855-4878.
10. Kannio A., Ridanpaa M., Koskinen H., Partanen T., Anttila S., Collan Y. et al. A molecular and epidemiological study on bladder cancer: p53 mutations, tobacco smoking, and occupational exposure to asbestos // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 1996. – V. 5. – P. 33-39.
11. Kusser W.C., Miao X., Glickman B.W., Friedland J.M., Rothman N., Hemstreet G.P. et al. p53 mutations in human bladder cancer // Environ. Mol. Mutagen. – 1994. – Vol. 24. – P. 156-160.
12. Lorenzo-Romero J.G., Salinas-Sanchez A.S., Gimenez-Bachs J.M., et al. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors // J. Urol. – 2003. – V. 169. – P. 492-499.
13. Lu M.L., Wikman F., Orntoft T.F., Charytonowicz E. et al. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol. 8. – P. 171-179.
14. O’Connell C.D., Tully L.A., Devaney J.M., Marino M.A., Jakupciak J.P., Atha D.H. Renewable standard reference material for the detection of TP53 mutations // Mol. Diagn. – 2003. – V. 7. – P. 85-97.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cool Spring Harbor, NY: Cool Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1659p.
16. Xu X., Stower M.J., Reid I.N., Garner R.C., Burns P.A. A hot spot for p53 mutation in transitional cell carcinoma of the bladder: clues to the etiology of bladder cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 1997. – Vol. 6. – P. 611-616.
17. Yamamoto S., Tada M., Lee C.C. et al. p53 status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast p53 functional assay in combination with p53 immunohistochemistry // Jpn. J. Cancer. Res. – 2000. – V. 91. – P. 181-189.
18. Yu D., Liu F., Liang Z. Detection and clinical pathological significance of the expression of P21, P185, p53 proteins and mutation of ras, p53 genes in transitional cell carcinoma of the bladder // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. – 1996. – V. 25. – P. 202-205.