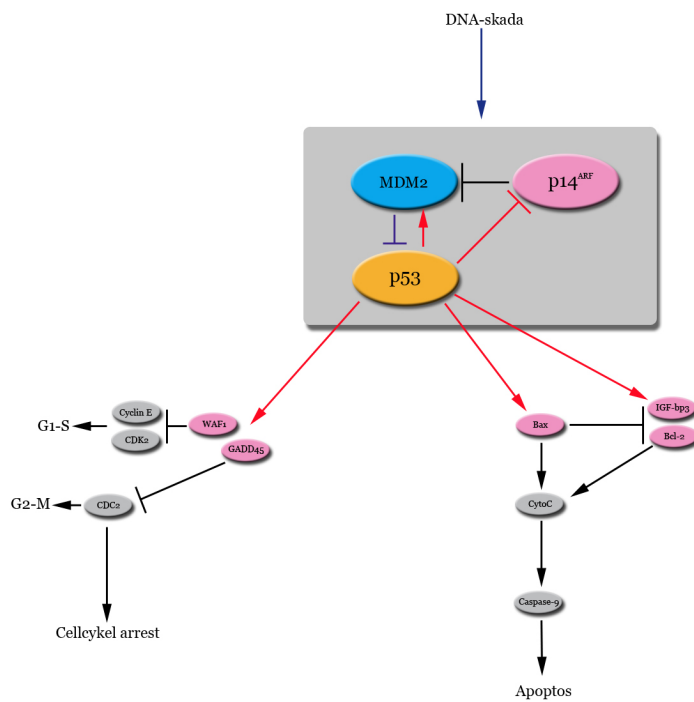




Genomets Vaktare - p53



Sonja Buratovic

Genomets väktare – p53

Sonja Buratovic

Självständigt arbete i biologi 2009

Sammandrag

p53 är en mycket viktig tumörsuppressorgen vars funktion är inaktiverad i de flesta fallen av human cancer. Dessa inaktiveringar kan ske på flertalet olika sätt bland annat genom missensemutationer i DNA-bindningsdomänen, överuttryck av *p53* inhibitorer såsom *MDM2* eller radering av *p14ARF*.

p53 kontrollerar cellcykeln genom att direkt aktivera generna *WAF1* och *GADD45*. Förhöjt uttryck av dessa två gener inhiberar i sin tur CDKs och progression till nästa fas i cykeln. Cellens mottaglighet för apoptotiska signaler ökar om *p53* binder till *Bax* promotorn och inducerar dess uttryck. Samtidigt som uttrycket av *Bax* förhöjs inhiberas uttrycket av *Bcl-2*. Transkriptionen av IGF-BP3, som även det verkar proapoptotiskt genom att bilda komplex med *Bcl-2*, induceras av *p53*.

För att kunna binda till genomet och agera som transkriptionsfaktor måste *p53* monomerer bilda tetramerer. Detta sker genom hydrrofoba interaktioner i monomerernas C-terminal. N-terminalen utgör en viktig transaktiveringsdomän för exempelvis inhibitorn *MDM2*.

Återaktivering av inaktiverat *p53* kan ske med hjälp av adenovirusvektorer med vildtyp *p53* sekvenser. Även främjad stabilisering av aktiv *p53* konformation eller inhibering av *MDM2* leder till minskad tumörtillväxt.

Introduktion

p53 beskrevs i litteratur för första gången 1979. Gnarcceller som var positiva för tumörviruset SV40 och således tumörinducerade producerade ett 54 kDa stort protein. Vidare försök med hamster-, ap- och humanaceller som infekterats eller transformerats av samma tumörvirus uttryckte analoga protein i storleken 44 till 60 kDa. Det konstaterades att dessa tumörvirus antingen inducerade transkription av eller stabiliserade detta protein. Men proteinets funktion var fortfarande oklar (Linzer & Levine, 1979). Studier av detta protein i icke transformerade 3T3 cell-linjer som forcerades att genomgå cellcykeln visade att proteinet, som nu fått sitt namn *p53*, i större utsträckning uttrycktes och stabiliserades när cellerna skulle befann sig i G1 till S fas chekpointen. Om cellcykeln istället inhiberades uttrycktes proteinet i låga koncentrationer. Dessa resultat indikerade att *p53* spelar en viktig roll i cellens övergång från ett vilande till ett aktivt proliferativt (Reich & Levine, 1984). Dessa resultat bekräftades senare genom flertalet andra försök varav det i ett användes humana fibroblaster som behandlades med antikroppar mot *p53* proteinet. Slutsatsen som drogs var att *p53* inhiberar cellens övergång från G0 till S fas men inte M till S fas (Mercer *m fl*, 1984). *p53* klassades nu som en onkogen. Dess förmåga att göra celler odödliga och icke mottagliga för transformation via stimuli av andra onkogener, till exempel *ras*, låg till grund för detta kontakterande (Jenkins *m fl*, 1985).

Studier visade att *p53* fungerade som en proto-onkogen och transformerade celler, till en malignt fenotyp, på ett dominant sätt som kunde jämföras med kända onkogener såsom *myc*. Detta efter att man infört plasmider innehållande en aktiverad *Ha-ras* gen. *p53* mutanter som konstruerats från cDNA och nästan helt saknade läsram bildade ett fåtal foci om de uttrycktes tillsammans med en onkogen, i det här fallet *ras*. Mutanter skapade från samma cDNA men istället hade en punkt mutation i valin-135 och uttrycktes tillsammans med *ras* gav upphov till en stor mängd foci. Upptäckten som förbryllade forskarna och talade emot att *p53* var

produkten av en onkogen var det faktum att försök med DNA innehållande vild-typs p53 inte gav upphov till några foci alls trots att proteinet uttrycktes tillsammans med *ras* (Eliyahu *m.fl.*, 1984). Funktionen hos olika mutanter av p53 undersöktes noga under de kommande åren och det konstaterades att skillnader i gensekvens mellan olika cDNA kloner gav upphov till olika uttryck i cellen (Finlay *m.fl.*, 1988). Det konstaterades att en punkt mutation från alanin till valin på position 135 i p53 räckte för att aktivera proteinets misstänkta onkogeniska egenskaper både i cDNA kloner och genomiska vild typs dito (Hinds *m.fl.*, 1989). Tanken att p53 istället skulle klassas som produkten av en tumör suppressor gen väcktes när studier av vild typ p53 visade sig hämma den transformerande effekten som *ras* annars hade på cellen. De celler som trots vild typ p53 i sitt genom bildade foci visade sig antingen inte uttrycka proteinet alls eller uttrycka en muterad form av detta (Finlay CA *m.fl.*, 1989). Härmed stod det utom rimligt tvivel att det första cDNA som klonats för p53 var en mutant och att proteinet inte var produkten av en onkogen.

Eftersom p53 bevisligen är en viktig komponent i uppkomsten av cancertumörer och dess transformation från ett benigt till ett malignt stadium blev jag intresserad av att ta reda på vilka händelser som ligger bakom denna transformation. Detta har jag tänkt att göra genom att utreda proteinets struktur och funktion, vilka gener det styr samt hur mutationer i p53 leder till uppkomst av tumörer.

p53 Struktur och funktion

Genen som kodar för det mänskliga proteinet p53 finns belägen på den korta armen av kromosom 17. Hos människor benämns denna gen bland annat som *TP53* och bär på sekvensen för ett 53 kDa stort protein (Shu *m.fl.*, 2007). Det humana p53 är uppbyggt av 393 aminosyror och i sin aktiva form återfinns det som en homotetramer bestående av 4, av dessa 53 kDa stora, ihopsatta subenheter. Delade meningar råder om huruvida proteinet bör delas upp i 3 eller 4 olika domäner (Shu *m.fl.*, 2007; Levine, 1997). Vad som med säkerhet har konstaterats är att p53 verkar som en sekvensspecifik transkriptionsfaktor som aktiveras om cellen utsätts för stress (Baum *m.fl.*, 2009). Ett stort antal gener står under direkt eller indirekt kontroll av p53 exempelvis *WAF1* (El-deiry *m.fl.*, 1993), *GADD45* (Kastan *m.fl.*, 1992), *BAX* (Miyashita & Reed, 1995), *IGF-BP3* (Buckbinder *m.fl.*, 1995) och *MDM2* (Momad *m.fl.*, 1992). Mer om dessa gener och hur p53 verkar på dem tas upp under respektive avsnitt.

Som tidigare nämnts delas proteinet p53 upp i 4 strukturellt och funktionellt olika delar (figur 1).



Figur 1. p53 struktur. Blått område utgör bindningsställen för transkriptionsaktivering. Aminosyra 22 och 23 är viktiga vid bindning till MDM2. Rött band är prolinrikt och har en regulatorisk funktion. DNA bindningsdomänen är utmärkt i orange. Lila band innehåller tetrameriseringssekvenser och ljusgult område kodar för icke sekvensspecifik bindning till DNA.

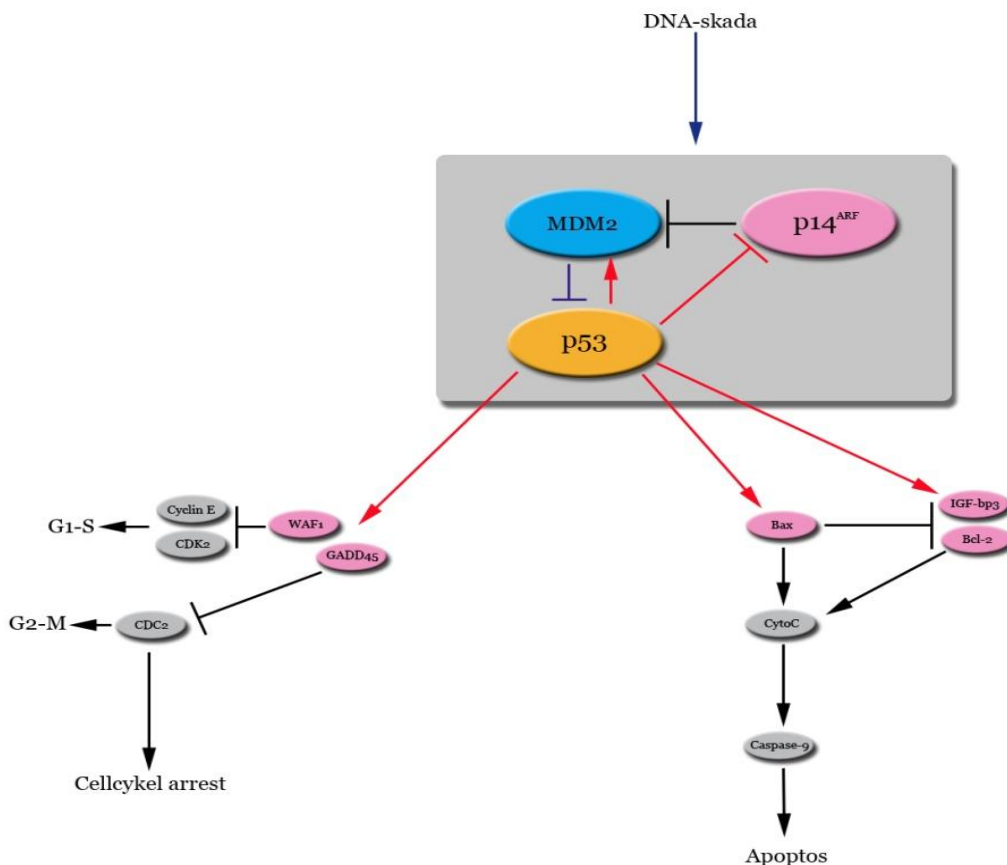
N-terminalen består av 93 aminosyror varav de första 60 utgör ett viktigt bindningsställe för transkriptionsaktivering (Fields & Jang, 1990). Aminosyror 18-25 utgör transaktiveringsdomän 1 för p53 inhiberaren MDM2 (Wells *m fl*, 2008). MDM2 binder främst till aminosyror 22 och 23 i denna domän och inhiberar p53 aktivitet i cellen (Freedman & Levine, 1999; Levine, 1997). Nästföljande 32 aminosyror utgörs främst av prolin och har en regulatorisk funktion (Wells *m fl*, 2008). Kärn-domänen eller DNA-bindningsdomänen som den också kallas följer efter den transaktiverande domänen. Bargonetti *m fl* visade genom klyvning av p53 att denna kärn-domän stäcker sig från aminosyra 91 till 306 och är essentiell för proteinets förmåga att bina till DNA. För att kunna dra denna slutsats jämfördes vild typ p53 med en onkogenisk mutant (Bargonetti *m fl*, 1993). Sekvensen i genomet som p53 binder till är 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3', där Pu markerar puriner och Py indikerar pyrimidiner. Minst två upprepningar av denna sekvens är nödvändiga och inga altemneringar får förekomma för att bindning ska kunna ske (El-deiry *m fl*, 1992). Sekvensen som kodar för oligomerisering av p53 samt kärnlokaliseringssignaler återfinns bland aminosyror 303 till 366 (Lee *m fl*, 1994). Tetrameriseringssekvensen som även möjliggör stabilisering av p53 är lokaliserad till aminosyror 322 till 355 (Clubb *m fl*, 1995). Icke sekvensspecifik bindning till DNA regleras positivt eller negativt med hjälp av aminosyror 360 till 393 i C-terminalen. Detta sker troligtvis genom fosforylering och acetylering av C-terminalen och leder till konformella skillnader i p53. Dessa konformella skillnader resulterar i att proteinet antingen befinner sig i ett latent eller ett aktivt tillstånd (Ahn & Prives, 2001).

p53 och cancer

För att en normal cell ska visa det karaktäristiska dysplastiska utseendet som kännetecknar cancerceller måste en onormal aktivering eller inaktivering av delar av dess genom ske. Cellen måste inaktivera de gener som begränsar dess tillväxt och proliferation (cellcykel regulatorerna) samtidigt som den måste bli självförsörjande av tillväxtsignaler, bilda nya blodkärl och inaktivera apoptotiska signaler. För att kunna sprida sig vidare krävs det även att den är kapabel att invadera och metastasera vävnader utanför primärtumören. Icke funktionellt p53 kan, direkt eller indirekt, ge upphov till många av dessa förändringar (Osada & Takahashi, 2002).

MDM2 och p53 utgör en autoregulatorisk loop

Förhöjda mängder av p53 i cellen aktiverar och framförallt inducerar uttrycket av det 95 kDa stora proteinet mdm2 (Murine Double Minute Clone 2) (Barak *m fl*, 1993). mdm2 binder sedan till p53 vid aminosyrorna 22 och 23 (Freedman & Levine, 1999) och inhiberar dess förmåga att transaktivera andra gener (MomadJ *m fl*, 1992) (figur 2). *MDM2* genen innehåller en p53 beroende promotor, P₂ i intron 1. Uttrycket är ett transkript som saknar den första intronen och ett fåtal nukleotider ur exon 2. Även en p53 oberoende promotor, P₁ återfinns i intron 1 och denna uttrycks kontinuerligt. Dessa två transkript skiljer sig genom att de som härrör från P₂ även innehåller icke kodande sekvenser i 5'ändan. Trots dessa skillnader tros båda transkripten leda till samma produkt efter translation (Barak *m fl*, 1994). I mdm2 proteinets N-terminal återfinns ett bindningsställe för p53 (Chen *m fl*, 1996). När dessa två protein bildar komplex märks p53 för degradering genom proteolys. Märkningen sker antingen genom ubiquitinerings av de sista 30 aminosyrorna i C-terminalen eller interaktion med ett tredje protein (Kubbutat *m fl*, 1998). Mutationer i aminosyran lysin på plats 370 till 386 har visat sig generera ett p53 protein som är motståndskraftigt mot nedbrytning genom ubiquitinerings (Rodriguez *m fl*, 2000). När cellen utsätts för stress i form av exempelvis UV-strålning eller joniserande strålning fosforyleras serin-20 och serin-15 och därmed förhindras mdm2 från att binda till p53. Inhibering av komplexbildning är viktig för att p53 ska kunna binda till DNA och därmed reparera skadan (Chehab *m fl*, 1999; Siliciano *m fl*, 1997).

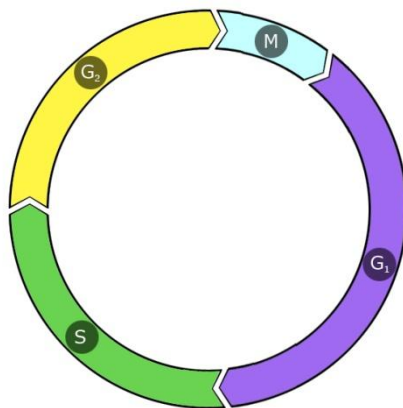


Figur 2. Sambandet mellan p53 och dess effektorgener. p53 avkivras när DNA utsätts för skada på grund av till exempel UV-strålning. En negativ feedback loop mellan MDM2 och p53 reglerar mängden av det sistnämnda proteinet i cellen. Vid stressignaler binder p14ARF till MDM2 och inhiberar dess effekt på p53 som då kan tetramerisera och binda till transkriptionssiter i genomet. Även fosforylering av ser-15 och ser-20 förhindrar komplexbildning mellan p53 och MDM2. Vid bindning av p53 till *WAF1* eller *GADD45* inhiberas olika CDKs och cellcykelstopp inträffar. Bindning av p53 till *Bax* eller *IGF-BP3* gör cellen mer mottaglig för apoptotiska signaler .

p53 som cellcykel inhiberare

WAF1 genen finns lokaliserad på kromosom 6p21.2 och dess transkription induceras direkt genom bindning till p53 i en, för p53 specifik, region belägen 2,4 kb uppströms i den kodande sekvensen (El-deiry *m fl*, 1993). Uttrycket av *WAF1* ger upphov till ett 21 kDa stort protein vars uttryck upregleras av strålningsinducerad DNA skada och verkar inhiberande på flertalet cyklin beroende kinaser (CDKs) genom att direkt binda sig till kinaset (El-deiry *m fl*, 1995; El-deiry, 1998) (figur 2). CDKs verkar tillsammans med cyklin proteiner och säkerställer att cellen inte går vidare till nästa fas i cell cykeln om något fel har uppkommit i genomet (figur 3). Uttryck av *WAF1* inhiberar både övergång från G1 till S fas och G2 till mitos (Vogelstein *m fl*, 2000) . Under G1 har cellen tid att reparera skada som har uppkommit i dess DNA. Skulle denna reparation på något sätt misslyckas förhindras cellen från att gå vidare till S fas och p53 triggar igång apoptotiska signaler (Makoto *m fl*, 1999) (figur 2).

p53 verkar även som en uppregerande transkriptionsfaktor av genen *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage inducible # 45). Genen är lokaliserad på kromosom 1p31.2 (www.genenames.org) och dess protein produkt verkar hämmande på övergången från G2 till mitos. Bindningsstället för p53 i *GADD45* är lokaliserat till en intronisk del vilket talar för att komplexbildning mellan dessa två förhöjer uttrycket av det inhibitoriska proteinet (figur 2). *GADD45* är viktig för cellens förmåga att reparera skador på DNA (Kastan *m fl*, 1992).



Figur 3. Cellcykeln och dess olika stadier. p53 styr WAF1 som verkar inhiberande på cyklin beroende kinaser och förhindrar övergång från G₁ till syntes (S) fas och G₂ till mitos (M). Uttrycket av *GADD45* regleras positivt av bindning till p53 och verkar inhiberande på övergång från G₂ till M.

Aktivering av apoptos via *Bax*

Bax (Bcl2-associated X protein) är belägen på den långa armen av kromosom 19 på position 13.3- 13.4 (www.genenames.org). *Bax* är en homolog till *Bcl-2* och deras genprodukter har motsatt effekt på cellens öde. *Bax* verkar pro-apoptotiskt medan *Bcl-2* främjar fortsatt överlevnad och proliferation av cellen (Reed , 1994). *Bax* kodas av sex exoner och har flertalet alternativa splicing positioner. Ett membranbundet 192 aminosyror och 21 kDa stort protein binder till *Bcl-2 in vivo* och motverkar det sistnämnda proteinets effekt på cellens öde. Vidare har två ytterligare cytosoliska isoformer av *Bax* hittats (Oltari *m fl*, 1993). Förhöjda nivåer av p53 i cellen stimulerar uttrycket av *Bax* samtidigt som det inhiberar *Bcl-2* (figur 2). Således kommer cellen att vara mer benägen att genomgå programmerad celledöd eftersom

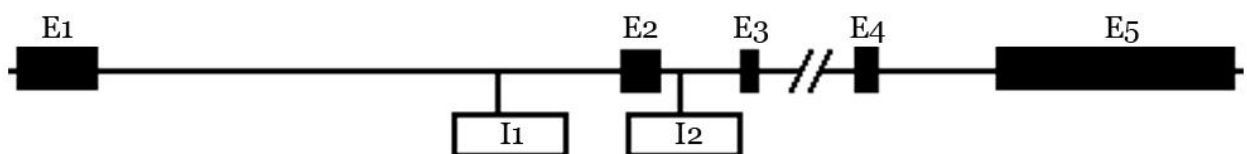
Bax i större utsträckning har möjlighet att binda till Bcl-2 och verka dominant negativt på dess egenskaper att främja överlevnad (Miyashita *m fl*, 1994a).

Initierings positionen för transkription av *Bcl-2* är lokaliserad till en region ~1,7 kb uppströms från den öppna läsramen. mRNA produkten kommer därmed att innehålla en lång 5'otranslaterad region som tros vara stället dit p53 binder och inhiberar uttrycket av *Bcl-2*. Vidare har en region för negativ reglering belägen -271 bp till -84 bp från initieringssiten för translation, i den otranslaterade regionen, hittats (Miyashita *m fl*, 1994b).

Bax har i likhet med homologen *Bcl-2* en 5'otranslaterad region i närheten av promotorn som troddes vara bindningsstället för p53. En TATAA box finns lokaliserad 398 bp uppströms från den öppna läsramen och 22 bp från denna finns en startpunkt för transkription. Ungefär 70 bp uppströms från TATAA boxen på plats -486 till -448 finns DNA sekvensen som p53 kräver för att kunna binda till genen. På plats -474 till -465 bp nedströms från TATAA boxen finns en promotor belägen och även denna innehåller den essentiella p53 bindningssekvensen. Om *Bax* innehållande dessa sekvenser uttrycks tillsammans med p53 ökar mängden Bax i cellen. Beroende av vilken typ av celler som används ökar uttrycket av Bax mellan 30 till 60 gånger. Det konstaterades till slut att p53 binder till *Bax* på -486 till -448 bp nedströms från TATAA boxen och där agerade som en potent transkriptionsfaktor (Miyashita & Reed , 1995).

IGF- BP 3 induceras av p53

Genen som kodar för Insulin like growth factor binding protein 3 (IGF-BP3) finns lokaliserad på kromosom 7p13-12 (Entrez Gene). *IGF-BP3* stimuleras av p53 att utsöndra högre nivåer av sin proteinprodukt vilken i sin tur inhiberar de mitogeniska och antiapoptotiska effekterna som IGF-1 har på cellen (figur 2). I *IGF-BP3* finns två introner innehållande p53 bindningssekvensen (Figur 4). Aktivering av *IGF-BP3*, genom bindning till p53, leder till en 14 faldig ökning av dess mRNA. Vissa skillnader i p53 bindningssekvensen återfinns mellan de två intronerna, där intron 1 är en mer exakt matchning än intron 2. Detta återspeglar sig i faktumet att aktivering via intron 1 ger ett högre proteinuttryck än aktivering via intron 2.



Figur 4. *IGF-BP3* innehåller två introner (I1 och I2) med den specifika p53 bindningssekvensen. Aktivering av IGF-BP3 via intron 1, vilken är en mer exakt matchning av den nödvändiga DNA-bindningssekvensen, ger ett högre proteinuttryck än aktivering via intron 2.

En synergistisk effekt har observerats när multipla kopior av intron 2 finns i genomet vilket tyder på att båda intronerna är sammanlänkade och essentiella för att cellen ska fungera på ett korrekt sätt (Buckbinder *m fl* 1995). IGF-BP3 kan förutom att inhibera celltillväxt *in vivo* och *in vitro* även inducera apoptos i båda systemen. Detta sker genom ändringar i förhållandet mellan Bcl-2 och Bax där det förstnämnda proteinet inhiberas om mängden Bax i cellen ökar. I många fall av lungcancer uttrycks inte tillräckligt höga koncentrationer av IGF-BP3 på grund av ett inaktiverat p53 (Lee *m fl*, 2002).

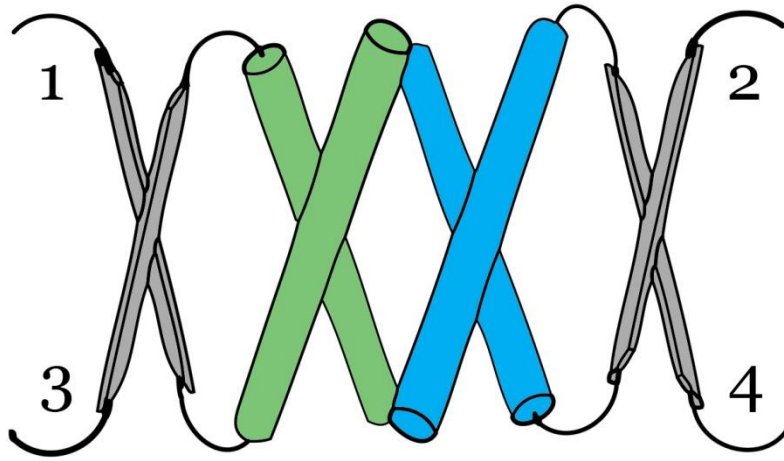
Inaktivering av p53

Funktionen som p53 utför i cellen är på ett eller annat sätt inaktiverad i de allra flesta fallen av human cancer. Sätten som denna inaktivering kan ske på är många men samtliga leder till att cellen visar den karaktäristiska sjuka fenotypen (Vogelstein *m fl*, 2000) (Tabell 1).

Tabell 1. Mekanismer som leder till inaktivering av p53 och vilken effekt denna inaktivering har på cellen.

Mekanismer som inaktiverar p53	Effekt av inaktivering
Missense mutationer i DNA-bindnings domän	Förhindrar bindning och aktivering av effektorgener
Radering av C-terminal	Förhindrar p53 monomerer att tetramerisera
Amplifiering av <i>MDM2</i> i genomet	Förhöjda mängder <i>MDM2</i> stimulerar nedbrytning av p53
Virusinfektioner	Produkter av aktiverade onkogener binder till och inaktiverar p53
Radering av <i>p14ARF</i>	Minskad inhibering av <i>MDM2</i>
Mislokalisering av p53 till cytosol	p53 är bara aktivt i cellkärnan och kommer således inte kunna utföra sin funktion

För att p53 ska kunna binda till DNA krävs det att monomerer av proteinet bildar tetramerer genom att binda till varandra med hjälp av C-terminalens oligomeriseringssekvenser. Varje monomer är uppbyggd av en β sträng, en böj och en α helix. Genom hydrofoba interaktioner mellan 3 aminosyror i β strängen, glycin 334 och 7 aminosyror i α helixen bildar monomererna dimerer. Dessa dimerer sätts samman till tetramerer genom hydrofoba interaktioner mellan α helixar där leucin 344 spelar en särskilt viktig roll (Figur 5). I sin tetrameriska form kan p53 befinna sig i ett inaktivt, symmetriskt, T stadium eller ett aktivt R stadium. Vid jämvikt eller i frånvaro av DNA favoriseras T stadiet men genom konformella ändringar i proteinets struktur, som gör det asymmetriskt, intar p53 det aktiva stadiet och kan således binda till DNA (Waterman *m fl*, 1995). Substituering av leucin 344 eller radering av hela C-terminalen förhindrar p53 från att bilda tetramerer och således binda till DNA (Brazdova *m fl*, 2002).



Figur 5. p53 monomerer sammansätts till dimerer genom hydrofoba ineraktioner mellan C-terminalens oligomeriseringssekvenser. Efter att monomer 1 och 3 har bildat en dimer binder α helixarna (gröna cylindrar) främst via aminosyran leucin 344 till ytterligare en dimer (monomer 2 och 4) och bildar funktionella tetramerer som har förmågan att binda till DNA. β -strängen är här utmärkt i grått.

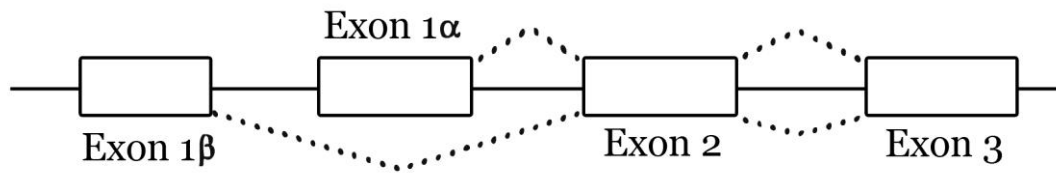
I 50 till 55 % av cancerfallen är det punktmutationer i proteinets DNA bindningssekvens som resulterar i att p53 inte kan binda till det skadade genomet (Hollstein *m fl*, 1994).

International Agency for Research on Cancer har till dagens datum registrerat 24 785 somatiska mutationer, 423 könsells mutationer och 2300 muterade protein i p53 och antalet ökar kontinuerligt (www-p53.iarc.fr). Missense mutationer i p53 selekteras för i högre utsträckning än raderingar av hela den proteinkodande sekvensen. Studier har visat att cellinjer som helt saknar p53 liksom linjer som uttrycker vild typ p53 inte leder till tumör tillväxt. Inte heller försök *in vivo* med dessa sekvenser ledde till uppkomst av tumörer. Införandet av missense mutationer i humana sk "hot spot" p53 kodon ledde till att nästintill samtliga djurmodeller utvecklade tumörer. Samma mönster sågs i försök där det påvisades att muterat p53 kunde aktivera gener som vildtyp p53 inte gjorde. Dessa gain of function mutationer tros vara orsaken till att missense mutationer i högre grad selekteras för, jämfört med radering av kompletta p53 kodande sekvenser, eftersom de gav cellerna ökade fördelar för tillväxt (Dittmer *m fl*, 1993).

Amplifiering av p53 inhiberaren *MDM2* är även det en orsak till inaktivering av proteinet. Av 47 undersökta sarkom visade sig 17 ha *MDM2* amplifierat mellan 5 till 50 gånger. Studier på lipom och carcinom visade inte denna amplifiering. Amplifiering av humant *MDM2* visade sig som förhöjda mängder av dess RNA vilket talade för att inhibering av p53 skedde i större utsträckning genom komplexbildning mellan proteinerna. Fem av dessa sarkom, vilka innehöll amplifieringar av *MDM2*, sekvenserades för att utesluta mutationer i p53. Samtliga av dessa vävnader visade sig uttrycka vildtyp p53 (Oliner *m fl*, 1992).

Lokuset *INK4A/ARF* kodar för två funktionellt skilda protein vilka spelar en viktig roll i cellcykelreglering (figur 2). Genprodukterna *INK4A* och *ARF* (Alternative Reading Frame) delar uttrycket av exon 2 och 3 men har olika startpositioner för transkription. *ARF* promotorn är belägen före *E1 β* (exon 1 β) och en alternativ mRNA splicingposition eliminerar *E1 α* som innehåller promotorn för *INK4A* (Mao *m fl*, 1995) (figur 6). Förhöjt uttryck av *ARF* leder inte bara till aktivering av p53 utan även inhibering av *mdm2*. Direkt bindning av *ARF* till *mdm2* tillåter oligomerisering och stabilisering av p53 (Stott *m fl*, 1998). Analyser har visat att *ARF* binder via sekvenser i N-terminalen i *E1 β* transkriptet till C-terminalen i *mdm2*. Detta leder till en förkortad livslängd för det sistnämnda proteinet och således inhibering av dess funktion (Zhang *m fl*, 1998). Inaktivering av *INK4a/ARF* ur genomet har påvisats i tumörer från vitt skilda vävnader och stadier. I de allra flesta fallen skedde inaktiveringen som

en följd av homozygotisk radering av hela lokuset ur genomet. Även heterozygot radering och i förlängning förlorande av heterozygositet var en vanlig mekanism för inaktivering av ARF medans hypermetylering av promotorn och punktmutationer representerade en mindre bråkdel av de undersökta tumörerna (Sanches-Cespedes *m fl.* 1999).



Figur 6. INK4A och p14ARF är två skilda transkript som kodas av samma gen. Båda proteinen uttrycker exon 2 och 3 men startpunkten för transkription skiljer. ARF promotorn är belägen vid exon 1β och dess mRNA har en alternativ splicing site vilken eliminerar exon 1α. INK4A har sin promotor belägen i nära anslutning nedströms till exon 1α

Genterapi med p53 som mål

För att återaktivera ett missense muterat p53s funktion i cellen har man använt sig av rekombinanta humana adenovirusvektorer (Ad-p53). Vektorernas exon 1 är utbytt mot en vildtyp p53 kassett vars uttryck styrs av en Raus sarkomvirus promotor med en tillväxthormonsvans. Efter administrering av virusvektorn och infektion av tumörcellerna med vildtyp p53 sker återaktivering via olika mekanismer (Peng , 2005). Vid behandling med Ad-p53 i kombination med konventionell strålningsterapi visade 64% av patienterna total regression av tumörer och 29% delvis regression. Detta kan jämföras med 19% respektive 60% regression efter behandling med enbart strålning (Zhang *m fl* 2003a). Patienter med långt fortskriden hepatisk cancer (HCC) visade även de en positiv korrelation mellan behandling med AD-p53 i kombination med kemoterapi jämfört med patienter som endast behandlades med kemoterapi. Den förstnämnda gruppen svarade inte bara i större utsträckning på behandlingen (67,6% resp 51,2% för bara kemoterapi) utan hade även en bättre prognos för överlevnad efter 6 mån , 76,5 % jämfört med endast 23,2% av patienterna som enbart fick kemoterapi (Peng *m fl* 2005). Den endogena p53 statusen är inte nödvändigtvis direkt korrelerad till tumörregression. Quist *m fl* visade i en studie på patienter med äggstockscancer att både de som hade muterat p53 och vildtyp p53 i sitt genom svarade bättre på behandling, visade minskad resistens mot konventionella behandlingsmetoder och hade en bättre prognos för överlevnad efter 6 mån om de samtidigt behandlades med Ad-p53 (Quist *m fl.* 2004).

För att p53 ska kunna binda till genomet krävs det att proteinet befinner sig i sin aktiva konformation. Mutationer i proteinets domäner kan motverka dess förmåga till strukturell ändring och således aktivering. Vid screening av > 100 000 kemiska föreningar vilka visar möjlighet att stabilisera p53 via interaktioner mellan proteinet och föreningens hydrofoba R1 grupp och joniserbara R2 grupp valdes ett antal ut för vidare evaluering. Försöket visade att inaktiverat p53 inte gick att rädda men att ackumulering av aktiv vildtyp p53 var möjlig. Halterna av p53 i cellen ändrades inte men mängden aktivt protein var högre än i kontrollgruppen. Vidare förhöjde dessa föreningar transkriptionsaktiviteten av p53 på nedströms belägna effektorgener. Liknande resultat visades *in vivo* där tumörstorlek reducerades på ett dosberoende sätt. Om föreningarna slutade administreras tillväxte tumörerna igen (Foster *m fl* 1999).

Introducerandet av små proteiner vilka binder till MDM2 och förhindrar det från att märka p53 för ubiquitinerad har också visat sig vara effektivt vid behandling av tumörer.

Administrering av dessa små MDM2 inhibitorer leder till ackumulering av endogent p53 i cellen och således transkription av effektorgener (Böttger *m fl* 1997).

Diskussion

Från att ha ansetts vara en potent onkogen är p53 numera klassad som en viktig tumörsuppressor gen vars aktivitet är inaktiverad i merparten av uppkomna tumörer (Finlay *m fl* 1989, Vogelstein *m fl* 2000). Inaktivering kan vara ett resultat av vitt skilda händelser såsom missensemutationer eller radering av gensekvenser som kodar för oligomerisering av p53 eller proteinet p14ARF (Vogelstein *m fl* 2000). Återaktivering av vildtyp p53 funktion har visat goda resultat i behandling av vitt skilda tumörtyper (Zhang *m fl* 2003, Quist *m fl* 2004, Foster *m fl* 1999, Böttger *m fl* 1997).

Genterapi med adenovirusvektorer innehållande vildtyp p53 sekvenser är inne i fas 3 studier och har hittills visar goda resultat med få biverkningar (Guinn och Mulherkar, 2008). I de fallen där inaktivering sker som följd av missensemutationer i DNA-bindningsdomänen (Hollstein *m fl*, 1994) bör vidare forskning med virusvektorer bedrivas för att optimera transfektion och dos.

Potenta MDM2 inhibitorer finns tillgängliga (Böttger *m fl* 1997) och kommer i framtiden kanske kunna användas vid behandling av tumörer där MDM2 är amplifierat i genomet. Möjligheten att använda dessa inhibitorer även vid behandling av tumörer utan amplifierat MDM2 bör beaktas då halten endogent p53 i cellen stiger då MDM2 inhiberas. Kombinerade terapier med både virusvektorer och MDM2 inhiberare tillsammans med exempelvis strålnings- eller kemoterapi bör utredas för att fastställa i vilken grad de stimulerar tillbakabildandet av tumörer och påverkar patientens chans att inte bara överleva utan även undvika tumörens återkomst.

Tack

Jag vill tacka min handledare Lage Cerenius och mina medstudenter Halgord Abdulla, Markus Andersson och Johana Fernandez Martinez för kommentarer på tidigare versioner av denna uppsats. Jag vill även tacka Peter Lamperud för ovärderlig hjälp med figurer och tabeller.

Referenser

- Ahn J & Prives C. 2001. The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nature Structural Biology* **8**: 730-732
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. 1993. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO Journal* **12**: 461- 468
- Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T. 1994. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes & Development* **8**: 1739-1749
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C. 1993. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes & Development* **7**:2565-2574
- Baum N, Schiene-Fisher C, Frost M, Schumann M, Sabapathy K, Ohlenschläger O, Grosse F, Schlott B. 2009. The prolyl cis/trans isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis. *Oncogene* **28**: 3915-3925
- Brazdova M, Palecek J, Cherny DI, Billova S, Fojta M, Pecinka P, Vojtesek B, Jovin TM, Palecek E. 2002. Role of tumor suppressor p53 domains in selective binding to supercoiled DNA. *Nucleic Acids Research* **30**: 4966-4974
- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N.1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**: 646-649
- Böttger A, Böttger V, Sparks A, Lui W-L, Howard SF, Lane DP. 1997. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response *in vivo*. *Current Biology* **7**: 860-869
- Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 13777-13782
- Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ. 1996. Mdm2 Inhibits the G1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 2445-2452
- Clubb RT, Omichinski JG, Sakaguchi K, Apella E, Gronenborn AM, Clore GM. 1995. Backbone dynamics of the oligomerization domain of p53 determined from ¹⁵N NMR relaxation measurements. *Protein Science* **4**: 855-862
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. 1993. Gain of function mutations in p53. *Nature genetics* **4**: 42-46
- El-deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler K, Vogelstein B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* **1**: 45-49

- El-deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Developmental Cell* **75**: 817-825
- El-deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Brunell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. 1995. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} Expression in Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Research* **55**: 2910-2919
- El-deiry WS. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Cancer Biology* **8**: 345-357
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. 1984. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**: 646-649
- Feedman D, Levine AJ. 1999. Regulation of the p53 Protein by the MDM2 Oncoprotein- Thirty-eight G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* **59**: 1-7
- Fields S & Jang SK. 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science Magazine* **249**: 1046-1049
- Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms a hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 531-539
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. 1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**: 1083-1093
- Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. 1999. Pharmacological Rescue of Mutant p53 Conformation and Function. *Science* **286**: 2507- 2510
- Guinn BA & Mulherkar R. 2008. International progression in cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy* **15**: 765-775
- Hinds PW, Finlay CA, Levine AJ. 1989. Mutation is required to activate the p53 for cooperation with the ras oncogene and transformation. *Journal of Virology* **63**: 739-746
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smithsorensen B, Montesano R, Harris CC. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell-lines. *Nucleic Acids Research* **22**: 3551- 3555
- HUGO Gene Nomenclature Committee. 2005. Symbol Report: Bax. www-dokument 2005-04-25: http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=959. Hämtad 2009-11-20
- HUGO Gene Nomenclature Committee. 2005. Symbol Report: GADD45A. www-dokument 2005-04-25: http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?match=GADD45A . Hämtad 2009-11-20
- International Agency for Research on Cancer. 2008. Database statistics. www-dokument 2008-11. <http://www-p53.iarc.fr/Statistics.html>. Hämtad 2009-11-26

- Jenkins JR, Rudge K, Currie CA. 1985. The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* **317**: 816-818
- Kastan MB, Zhan Q, El-deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Developmental Cell* **71**: 587-597
- Kubbutat MHG, Ludwig RL, Ashcroft M, Vousden KH. 1998. Regulation of Mdm2-Directed Degradation by the C Terminus of p53. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 5690-5698
- Lee H-Y, Chun K-H, Liu B, Wiehle SA, Cristiano RJ, Ki Hong W, Cohen P, Kurie JM. 2002. Insulin like Growth Factor Binding Protein-3 Inhibits the Growth of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **62**: 3530-3537
- Lee W, Harvey TS, Yin Y, Yau P, Litchfield D, Arrowsmith CH. 1994. Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Structural Biology* **1**: 877-890
- Levine AJ. 1997. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Developmental Cell* **88**: 323-331
- Linzer DIH & Levine AJ. 1979. Characterization of a 54 k Dalton Cellular SV40 Tumor Antigen Present in SV40-Transformed Cells and Uninfected Embryonal Carcinoma Cells. *Developmental Cell* **17**: 43-52
- Makoto N, Yoko K, Hitoshi M, Kyoji I. 1999. Direct interaction of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**: 35-40
- Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. 1995. A Novel p16^{INK4A} Transcript. *Cancer Research* **55**: 2995-2997
- Mercer WE, Avignolo C, Baserga R. 1984. Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 276-281
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. 1994a. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799- 1805
- Miyashita T, Masayoshi H, Motoi H, Reed JC. 1994b. Identification of a p53-dependent Negative Response Element in the bcl-2 gene. *Cancer Research* **54**: 3131- 3135
- Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Developmental Cell* **80**: 293-299
- Momad J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Developmental Cell* **69**: 1237-1245

- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**: 80-83
- Oltari Z, Milliman C & Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619
- Osada H & Takahasi T. 2002. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**: 7421-7434
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology* **124**: 1-6
- Peng Z. 2005. Current Status of Gene Therapy in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Human Gene Therapy* **16**: 1016-1027
- Quist SR, Wang-Gohrke S, Köhler T, Kreienberg R, Runnebaum IB. 2004. Cooperative effect of adenoviral p53 gene therapy and standard chemotherapy in ovarian cancer cells independent of the endogenous p53 status. *Cancer Gene Therapy* **11**: 547-554
- Reich NC & Levine AJ. 1984. Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* **308**: 199-201
- Rodriguez MS, Desterro JMP, Lain S, Lane DP, Hay RT. 2000. Multiple C-Terminal Lysine Residues Target p53 for Ubiquitin-Proteasome-Mediated Degradation. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 8458-8467
- Sances-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, Yang SC, Jen J, Sidransky D. 1999. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **18**: 5843- 5849
- Shu K-X, Li B, Wu L-X. 2007. The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **55**: 10-18
- Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Apella E, Kastan MB. 1997. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & Development* **11**: 3471-3481
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14^{ARF}, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO Journal* **17**: 5001- 5014
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310
- Waterman JFL, Shenk JL, Halazonetis TD. 1995. The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *The EMBO Journal* **14**: 512-519

Wells M, Tidow H, Rutherford TJ, Markwick P, Jensen MK, Mylonas E, Svergun DI, Blackledge M, Fersht AR. 2008. Structure of tumor suppressor p53 and its intristically disordered N-terminal transactivation domain. *Proceedings of the National academy of Sciences* **105**: 5762-5767

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. 1998. ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppressor Pathways. *Cell* **92**: 725-734

Zhang SW, Xiao SW, Lu YY. 2003a. Thermosensitized effects of adenovirus-mediated p53 (Ad-p53): Preclinical study and a phase II clinical trial in China. *Japanese Journal of Hyperthermic Oncology* **19**: 141–149.