

**¹Ewa Jassem, ²Rodryg Ramlau, ³Rafał Dziadziuszko, ¹Amelia Szymanowska,
⁴Joanna Jakóbkiewicz, ⁵Katarzyna Lamperska, ⁶Grazyna Kobierska,
⁷Jan Skokowski, ²Wojciech Dyszkiewicz, ⁵Andrzej Mackiewicz,
⁸Maciej Żylicz, ³Jacek Jassem**

¹Klinika Chorób Pluc i Gruźlicy, AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. med. J. M. Stomiński,
²Oddział Onkologii Wielkopolskiego Centrum Chorób Pluc i Gruźlicy w Poznaniu,

ordynator: dr med. R. Ramlau,

³Klinika Onkologii i Radioterapii AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. med. J. Jassem,

⁴Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku,
kierownik: dr hab. W. Werel,

⁵Zakład Immunologii Nowotworów AM w Poznaniu, kierownik: prof. dr hab. med. A. Mackiewicz,

⁶Zakład Patologii AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. med. A. Roszkiewicz,

⁷Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej AM w Gdańsku, kierownik: prof. dr hab. med. J. Skokowski,

⁸Oddział Torakochirurgii Wielkopolskiego Centrum Chorób Pluc i Gruźlicy w Poznaniu,
ordynator: prof. dr hab. W. Dyszkiewicz,

⁹Zakład Biologii Molekularnej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej
UNESCO w Warszawie, kierownik: prof. dr hab. M. Żylicz

MUTACJE GENÓW *P53* I *P16* W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA

P53 AND *P16* GENE MUTATIONS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Summary: The aim of this study was to assess prospectively the occurrence of *p53* and *p16* mutations (considered separately and together) in NSCLC in terms of their clinical and prognostic relevance. Study group included 87 patients who underwent pulmonary resection for cure. *p53* and *p16* mutations were found in 22 (25%) and 14 (16%) cases, respectively. In eight patients (9%) both mutations were present, and the tendency for their common occurrence was significant ($p=0.02$). There was no relation between mutation and clinical characteristics. Median survival in the entire group was 17 months and the 3-year survival probability – 41%. There was no correlation between the occurrence of any mutation (considered separately or together) and survival. These results indicate that *p53* and *p16* gene mutations tend to occur together in NSCLC, however these alterations seem not to have noteworthy clinical and prognostic significance.

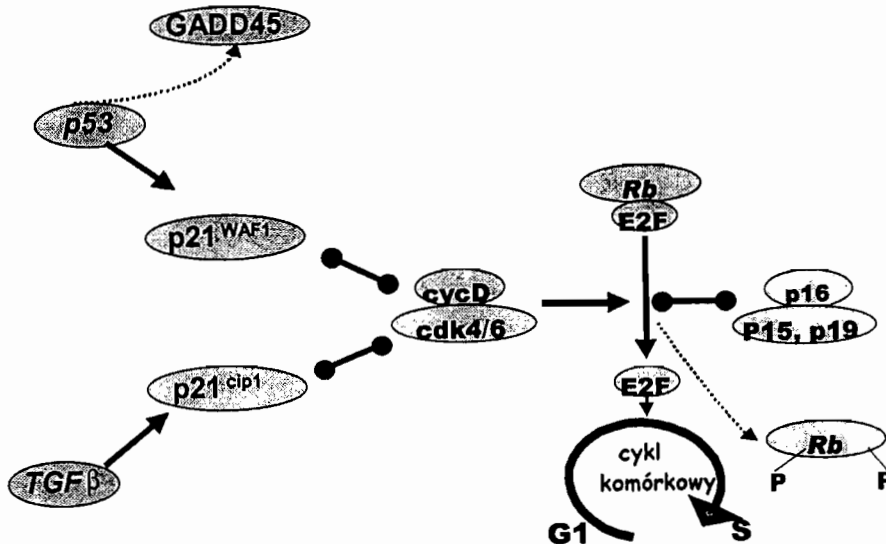
Key words: *p53* gene, *p16* gene, non-small cell lung cancer

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2002, 70, 1-2, 64-70

***Praca została zrealizowana częściowo w ramach grantu nr 4P05C04112
finansowanego przez Komitet Badań Naukowych***

Wstęp

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpił znaczny postęp w rozumieniu mechanizmów kancerogenezy niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Podłożem morfologicznych zmian zachodzących w nabłonku oskrzelowym jest szereg genetycznych i epigenetycznych zaburzeń. Istotne znaczenie przypisuje się między innymi mutacjom genów supresorowych, w tym genów *p53* i *p16*, które pełnią istotną rolę w regulacji cyklu podziałowego komórki (14). Mutacje w tych genach prowadzą do zaburzenia struktury i funkcji ich białkowych produktów. W prawidłowych warunkach białka p53 i p16 uczestniczą w hamowaniu cyklu podziałowego pomiędzy fazą G1 i S w sytuacji gdy dochodzi do uszkodzenia DNA (ryc. 1).



Ryc. 1. Udział supresorowych genów *p53* i *p16* w regulacji cyklu podziałowego komórki. Produkt białkowy genu *p16* hamuje uwalnianie czynnika E2 związanego z białkiem Rb (E2 stanowi czynnik transkrypcyjny dla białek umożliwiających przejście cyklu podziałowego z fazy G1 do fazy S). Proces uwalniania czynnika E2 (poprzez fosforylację białka Rb) jest natomiast pobudzany przez kinazy zależne od cyklin (cdk – ang. *cyclin dependent kinases*). Działanie kompleksu cdk i cykliny D jest hamowane przez białka p21^{cip1/WAF1}, których działanie jest z kolei pobudzane przez białko p53.

Wydłużenie fazy G1 umożliwia „dokonanie niezbędnych napraw”. Jeżeli uszkodzenia są zbyt duże aby mogły zostać naprawione, komórka kierowana jest na drogę apoptozy. Zaburzenie tego mechanizmu wskutek mutacji w obrębie supresorowych genów może przyczynić się do przekazywania uszkodzeń genetycznych następnym pokoleniom komórek, do kumulacji tych uszkodzeń i ostatecznie do kancerogenezy. Geny *p16* i *p53* regulują hamowanie cyklu podziałowego w częściowo niezależny sposób. Piśmiennictwo dotyczące mutacji genu *p53* w NDRP jest bogate, natomiast mutacje genu *p16* oraz zjawisko jednoczesnego występowania obu tych zmian były przedmiotem jedynie nielicznych doniesień. Nie ustalono ponadto jaki jest związek tych zaburzeń z klinicznymi cechami NDRP i rokowaniem. Zagadnienia te podjęto w niniejszej pracy.

**Materiał
i metody**

Badanie miało charakter prospektywny i prowadzono je w latach 1996–1998. Analizą objęto 87 chorych na NDRP poddanych resekcji mięszu płucnego (67 w Akademii Medycznej w Gdańsku i 20 w Wielkopolskim Centrum Chorób Płuc w Poznaniu) (tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, z uwzględnieniem występowania mutacji genów p53 i p16

Table 1. Demographic and clinical characteristics of NSCLC patients with regard to p53 and p16 mutation.

Cechy kliniczne Clinical patterns	n	p53(+) (%)	p	p16(+) (%)	p
<i>Miejsce leczenia</i>					
Gdańsk	67				
Poznań	20				
<i>Wiek / Age</i>					
>60 lat / > 60 years	51	13 (25)	0,99*	14 (20)	0,44*
<60 lat / < 60 years	36	10 (28)		4 (11)	
<i>Płeć / sex</i>					
Kobiety / women	17	8 (47)	0,07*	2 (12)	0,86
Mężczyźni / men	70	15 (21)		12 (17)	
<i>Stopień zaawansowania / Stage</i>					
I	25	6 (24)	0,45	3 (12)	0,80
II	18	3 (17)		3 (17)	
III	44	14 (32)		8 (18)	
<i>Typ histopatologiczny / Histopathologic typ of cancer</i>					
Plaskonablonkowy / Squamous	57	15(26)	0,49	11 (19)	0,50
Gruczolowy / Adenocarcinoma	20	6 (30)		3 (15)	
Wielkokomórkowy / Giant cell	5	2 (40)		0	
Mieszany / Mixed	5	0		0	

* uwzględniono poprawkę Yatesa

Materiał do badania stanowiły wycinki z guza zamrażane bezpośrednio po pobraniu i przechowywane w temperaturze -70°C .

Ocena występowania mutacji genów *p53* i *p16* obejmowała: 1. izolację DNA z badanej próbki; 2. amplifikację egzonów od 5 do 8 dla genu *p53* i egzonu 2 dla genu *p16* przy zastosowaniu metody PCR (ang. *polymerase chain reaction* – łańcuchowa reakcja polimerazy); 3. wstępną ocenę występowania mutacji w badanych egzonach przy użyciu metody PCR/SSCP (ang. *single strain comparison polymorphism*); 4. sekwencjonowanie próbek, które w badaniu SSCP wykazywały obecność mutacji. Szczegółowy opis metody został przedstawiony wcześniej (3). Występowanie mutacji genu *p53* w próbkach oceniano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego, natomiast mutacje genu *p16* – w Zakładzie Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Poznaniu.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego *Statistica 5.0*. Testy chi-kwadrat i Fishera z poprawką Yatesa stosowano w celu określenia zależności pomiędzy występowaniem mutacji w genach *p53* i *p16* a klinicznymi cechami guza. Krzywe przeżycia sporządzono za pomocą metody Kaplana-Meiera, a ich porównywania przeprowadzono przy

Mutacje genów p53 i p16

użyciu testu logrank. Wpływ poszczególnych cech na czas przeżycia analizowano przy użyciu modelu Coxa. Za znamienne przyjęto te różnice, dla których wartość p nie przekraczała niż 0,05.

Wyniki

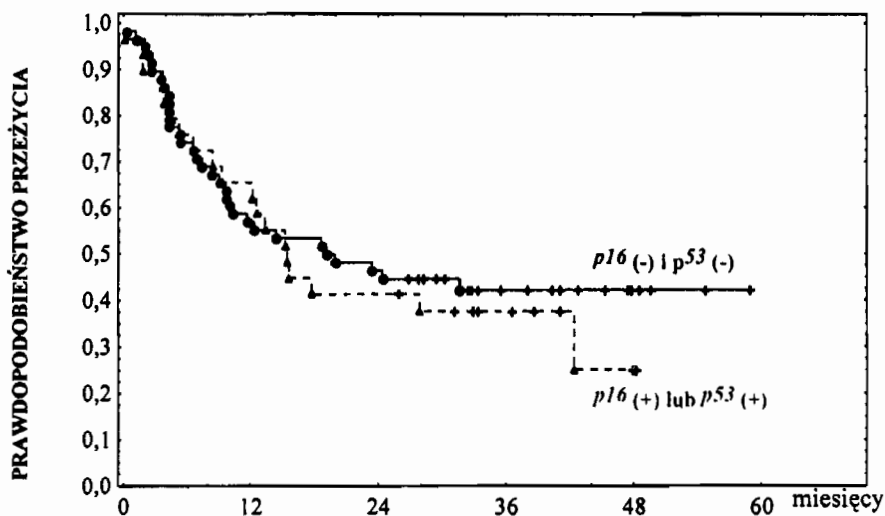
Spośród 87 analizowanych próbek w 22 (25%) stwierdzono mutacje genu *p53*, a w 14 (16%) mutacje genu *p16*. W ośmiu przypadkach (9%) mutacje obu genów występowały jednocześnie. Prawdopodobieństwo równoczesnego występowania obu mutacji było znamienne statystycznie ($p=0,02$).

Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem mutacji a demograficznymi i klinicznymi cechami chorych (tab. I).

Analizę przeżycia w badanej grupie przeprowadzono w maju 2001. Mediana czasu obserwacji wynosiła 36 miesięcy (zakres od 19 do 59 miesięcy). Spośród 87 chorych w chwili badania żyło 35. Mediana czasu przeżycia w całej grupie wynosiła 17 miesięcy, a odsetek trzyletnich przeżyć – 41%. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem mutacji genów *p53* i *p16* (rozpatrywanych osobno i łącznie) a czasem przeżycia (tab. II, ryc. 2).

Tabela 2. Analiza wpływu poszczególnych klinicznych cech na czas przeżycia
Table 2. Influence of particular features on survival.

Cechy kliniczne Clinical patterns	Współczynnik ryzyka (95% zakres ufności)	p
Wiek / Age		
> 60 lat		
< 60 lat	1,05 (0,60-1,83)	0,87
Płeć / Sex		
Kobiety / F	0,53 (0,24-1,18)	0,12
Mężczyźni / M		
Stopień zaawansowania / Stage		
I		
II	0,91 (0,46-1,81)	0,79
III	2,31 (1,31-4,07)	0,003
Typ histopatologiczny rak / Histopathological type of cancer		
Płaskonabłonkowy / Squamous		
Gruźlowy	0,92 (0,47-1,82)	0,81
Mutacja genu p16		
Nieobecna / Absent		
Obecna / Present	1,04 (0,50-2,13)	0,92
Mutacja genu p53		
Nieobecna / Absent		
Obecna / Present	1,14 (0,63-2,08)	0,67
Mutacje genu p16 i p53		
Nieobecne / Absent		
Obecne / Present	1,17 (0,66-2,06)	0,59



Ryc. 2 Krzywa przeżycia w zależności od występowania mutacji genu *p53* lub *p16*. Mediana czasu przeżycia w grupie chorych z mutacją genów *p53* i/lub *p16* – 15 miesięcy; w grupie chorych bez żadnej z tych mutacji – 19 miesięcy. Odsetek 3-letnich przeżyć, odpowiednio: 38% i 42%; log-rank, $p=0,59$

Fig 2. Survival curve according to presence of mutation of *p53* or *p16*.

Omówienie

Częstość występowania mutacji genu *p53* w NDRP zawarta jest w poszczególnych doniesieniach w szerokich granicach – od 18% do 58% (16, 20). Odsetek mutacji wykrytych w niniejszym materiale (25%) należy zatem do niższych. Niski odsetek mutacji genu *p53* w niniejszym doniesieniu jest potwierdzeniem naszych wcześniejszych wyników w odniesieniu do chorych z regionu Gdańska (3). Wśród przyczyn dużej rozpiętości wyników w piśmiennictwie należy między innymi uwzględnić czynniki etniczne i geograficzne. Doniesienia innych autorów wydają się potwierdzać taką możliwość. Przykładowo badanie przeprowadzone w Hong Kongu wykazało znamienne różnice w częstości występowania mutacji genu *p53* w dwóch różnych grupach kobiet chorych na raka płuca: 31% u Japonek i 20% u Chinek (20). Do innych możliwych przyczyn tego zjawiska należą niewielka liczebność i skład kliniczny badanych grup chorych oraz różnorodność stosowanych technik badawczych (różne metody wstępnej selekcji próbek zawierających mutacje, różne metody sekwencjonowania, stosowanie materiału utrwalanego w różny sposób, np. w postaci bloków parafinowych lub mrożonych wycinków). Wymienione czynniki mogą mieć także wpływ na różnice w występowaniu mutacji genu *p16* w komórkach ndrp. W naszym materiale mutacje te stwierdzono w 16%, i wynik ten mieścił się w szerokich granicach (5%-30%) podawanych przez innych autorów (4, 17). Zagadnienie to było jednak dotychczas przedmiotem jedynie pojedynczych doniesień, zatem dane te należy traktować z ostrożnością. Więcej danych istnieje natomiast w odniesieniu do innych zaburzeń genu *p16*: ekspresji jego białkowego produktu i występowania zaburzeń metylacji regionu promotorowego (1, 5, 11, 12, 15).

Podobnie jak w doniesieniu Sanchez-Cespedez i wsp. (17), w niniejszej pracy wykazaliśmy skłonność do współwystępowania mutacji genów *p16* i *p53*. W innym badaniu wykazano, że również zaburzenia ekspresji produktów białkowych obu genów współwystępują w komórkach NDRP (19). Być może jednoczesna obecność mutacji w genach regulujących cykl podziałowy na drodze niezależnych od siebie mechanizmów nasila kancerogenezę (ryc. 1). W obecnej analizie nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem mutacji genów *p53* i *p16* a klinicznymi cechami NDRP. W kilku badaniach wykazano istotnie częstsze występowanie zaburzeń ekspresji obu genów w raku płaskonabłonkowym, w porównaniu do gruczolakoraka (9, 20).

Istotnym aspektem molekularnych badań jest ich rokownicza wartość. Obecne badanie nie wykazało wpływu żadnej z badanych mutacji (analizowanych odrębnie i łącznie) na czas przeżycia chorych. Mimo, że piśmiennictwo dotyczące rokowniczego znaczenia mutacji *p53* jest bogate, zagadnienie to jest nadal kontrowersyjne. Wyniki podobne do naszych uzyskano w opublikowanym niedawno doniesieniu obejmującym 183 chorych na NDRP (18), ale w kilku wcześniejszych pracach wykazano istotny związek pomiędzy występowaniem mutacji genu *p53* i gorszym rokowaniem (8, 15). W innych doniesieniach wykazano natomiast, że niekorzystny wpływ na rokowanie mają tylko niektóre typy mutacji genu *p53*, np. *null* (3, 6). Stwierdzono ponadto, że obecność mutacji genu *p53* była związana z krótszym czasem przeżycia jedynie u chorych na gruczolowego raka płuca, podczas gdy u chorych na płaskonabłonkowego raka płuca nie miała ona rokowniczego znaczenia (10, 13).

Dotychczasowe badania nad rokowniczym znaczeniem genu *p16* dotyczyły przede wszystkim zaburzeń jego ekspresji i metylacji regionu promotorowego. Podobnie jak w odniesieniu do mutacji genu *p53*, w niektórych badaniach stwierdzono ich niekorzystny wpływ na czas przeżycia (9, 15) podczas gdy w innych nie wykazano tego efektu (2, 7). Na szczególną uwagę zasługuje doniesienie z innego polskiego ośrodka obejmujące 125 chorych na NDRP (15), w którym oceniono rokownicze znaczenie mutacji genów *p53* oraz hypermetylacji regionu promotorowego genu *p16*. W badaniu tym, podobnie jak w naszej pracy, nie wykazano rokowniczego znaczenia mutacji genu *p16*, natomiast mutacja genu *p53* miała znaczący niekorzystny wpływ na czas przeżycia. Ponadto w pracy tej niekorzystne znaczenie rokownicze miało występowanie hypermetylacji w promotorowym regionie genu *p16*. Niewykluczone, że wymienione zaburzenia genu *p16* determinują cechy biologiczne guza, czego klinicznym przejawem jest jego bardziej agresywny przebieg.

Wnioski

1. Mutacje genów *p53* i *p16* mają skłonność do równoczesnego występowania w komórkach NDRP
2. Występowanie mutacji genów *p53* i *p16* nie ma istotnego związku z klinicznymi cechami NDRP i nie wpływa na rokowanie.

Piśmiennictwo

1. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA i wsp. Aberrant methylation of *p16^{INK4a}* is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11891-11896.
2. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Bramilla C. Alteration of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999; 188: 351-360.
3. DeAnta J-M, Jassem E, Rosell R i wsp. *TP53* mutational pattern in Spanish and Polish non-small cell lung cancer patients: null mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 1997, 15, 2951-2958.
4. Fu S, Wang B, Huang C i wsp. Mutation analysis of p16 gene in non-small cell lung carcinomas. *Chun-Hua* 1999; 116: 292-295.
5. Gazzeri S, Gouyer V, Vourch C i wsp. Mechanisms of p16^{INK4a} inactivation in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 16: 497-504.
6. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, et al. *p53* null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1999, 59, 5572-5577.
7. Hommura F, Dosaka-Akia H, Kinoshita I i wsp. Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins in non-small cell lung cancers. *Br J Cancer* 1999; 81: 696-701.
8. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T i wsp. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993, 53, 1-9.
9. Huang CI, Taki T, Higashiyama M i wsp. p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2000; 82: 374-380.
10. Jassem E, Rosell R, Monzo M i wsp. Prognostic relevance of *p53* gene mutations in non-small cell lung cancer: adverse effect in adenocarcinoma. *Lung Cancer* (w druku).
11. Kratzke RA, Greatens TM, Rubins JB i wsp. *Rb* and p16^{INK4a} expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 1996; 56: 3415-3420.
12. Malusecka E, Zborek A, Krzyżowska-Gruca S. Changes in expression of pRb, p16 and cyclin D1 in non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol* 1999, 37, 19-24.
13. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M i wsp. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 4055-4063.
14. Niklińska W, Chyczewski L, Nikliński J. New molecular approaches to lung cancer: biological and clinical implications of *P53*, *P16* and *K-RAS* studies. *Folia Cytochem Cytobiol* 2001; 39: 99-103.
15. Nikliński J. Clinical application of molecular markers in operable non-small cell lung cancer (NSCLC): Prognostic value of p53, p16 and K-ras abnormalities. *Streszczenia 7th Lung Cancer Biology Workshop, Barcelona* 2001, A145.
16. Rusin M, Butkiewicz D, Malusecka E, et al. Molecular epidemiological study of non-small-cell lung cancer from an environmentally polluted region of Poland. *Br J Cancer* 1999, 80, 1445-1452.
17. Sanchez-Cespedes M, Reed AL., Buta M i wsp. Inactivation of INKA4A/ARF locus frequently coexists with *TP53* mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999; 18: 5843-5949.
18. Schiller JH, Adak S, Feins RH i wsp. Lack of prognostic significance of p53 and *K-ras* mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a laboratory ancillary study on an Eastern Cooperative Oncology Group prospective randomized trial of postoperative adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001, 19, 448-457.
19. Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP i wsp. Expression of p16INK4a/p16alpha and p19 ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene* 1998, 17, 2779-2785.
20. Wang YC, Chen CY, Chen SK i wsp. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients from Taiwan. *Cancer Res* 1998, 58, 514-517.

Wpłynęła: 23.07.2001

Adres: Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej, 80-211 Gdańsk, Dębinki 7