

Defekty genowe w raku pęcherza moczowego – prognostyczne znaczenie mutacji i zaburzeń ekspresji genu *p53*

Beata Schlichtholz¹, Marcin Matuszewski²

*Rak pęcherza moczowego jest jednym z najczęściej spotykanych nowotworów układu moczowego w Polsce. Ustalenie rokowania w raku przejściowokomórkowym pęcherza moczowego jest trudne ze względu na jego heterogenność. Nowotwór o jednakowych parametrach klinicznych może wykazywać odmienny sposób progresji. Skłania to do poszukiwania markerów biologicznych, które ułatwią ocenę złośliwości danego nowotworu i tym samym rokowanie. Spośród wielu defektów genowych, związanych z progresją nowotworu, analiza genu *p53* i jego produktu białkowego wydaje się być niezwykle istotna. Mutacje w genie *p53* obserwuje się u 50% pacjentów. Celem niniejszego opracowania jest analiza opublikowanych danych dotyczących prognostycznego znaczenia genu *p53* w raku pęcherza moczowego. Z danych tych wynika, że istnienie korelacji pomiędzy utratą funkcji przez białko *p53*, a zaawansowanym stadium choroby nowotworowej umożliwia wykorzystanie genu *p53* jako markera nowotworowego w raku pęcherza moczowego.*

Gene defects in bladder carcinoma – prognostic implications of the *p53* gene mutations and alterations in the *p53* gene product expression

*Bladder cancer is one of the most common cancers of the urinary tract in Poland. Transitional cell carcinoma of the bladder is heterogenous and its clinical behavior is difficult to predict. Tumors with similar clinicopathological parameters display different progression patterns. There is a need for biological markers that will help characterize the malignant potential of a given tumor and, thus, determine its prognosis. Among numerous types of gene defects associated with tumor progression, analysis of *p53* gene and/or *p53* gene product appears to be very important. *p53* mutations are observed in 50% of patients. The objective of the present analysis was to review published literature on the association of *p53* alterations and prognosis of patients with bladder cancer. Presence of the correlation between loss of *p53* function and tumor progression implicates that *p53* gene may be used as a clinically relevant tumor marker for bladder cancer.*

Słowa kluczowe: rak pęcherza moczowego, supresor transformacji nowotworowej, utrata heterozygotyczności, gen *p53*, mutacje punktowe

Key words: bladder carcinoma, tumor suppressor gene, chromosomes, loss of heterozygosity, *p53* gene, point mutations

Defekty genowe w raku pęcherza moczowego – prognostyczne znaczenie mutacji i zaburzeń ekspresji genu *p53*

Nowotwory złośliwe stanowią, po schorzeniach układu krążenia, najczęstszą przyczynę zgonów w Polsce. Jednym z poważnych problemów społecznych są nowotwory pęcherza moczowego. Niezależnie od sposobu leczenia tego nowotworu wyniki nie są zadowalające, a śmiertelność wysoka, pomimo nowoczesnych, zintegrowanych metod terapii. W 1996 roku w Polsce zarejestrowano 3070

przypadków raka pęcherza moczowego wśród mężczyzn, co stanowi 5,4% wszystkich zachorowań na nowotwory [1]. Przyczyny powstawania tego nowotworu nie zostały w pełni wyjaśnione. Do najważniejszych czynników ryzyka należy wiek, płeć, palenie papierosów, dieta, przewlekły stan zapalny oraz kontakt z aminami aromatycznymi w niektórych grupach zawodowych, zwłaszcza osób o zwiększonej podatności osobniczej, tj. osób z powolnym fenotypem acetylacji ksenobiotyków [2].

Nowotwory pęcherza moczowego to raki powierzchniowe, zbudowane z nabłonka przejściowego (90%), 5-10% to raki płaskonabłonkowe i 2-3% to raki o utkaniu gruczołowym. Większość nowotworów ma początkowo charakter brodawczakowaty i nie wykazuje naciekania głębszych warstw pęcherza. Guzy naciekające mięśniówkę występują u 30% pacjentów i są związane ze znacznie gorszym rokowaniem [3]. Dobrze rokują raki powierzch-

1 Katedra i Zakład Biochemii

2 Katedra i Klinika Urologii

Akademii Medycznej w Gdańsku

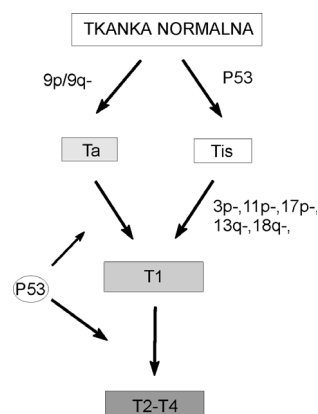
chowne, bez naciekania mięśnia pęcherza moczowego, jakkolwiek ryzyko nawrotu po zastosowanej elektrotresekcji przezcewkowej sięga 70%, a 10-45% guzów nawrotowych ulega progresji [4, 5]. U części pacjentów (15-30%) nowotwór w chwili rozpoznania jest guzem inwazyjnym i jeżeli nie zostanie zastosowane leczenie radykalne, to u ponad połowy z nich rozwiną się przerzuty w ciągu 2 lat. Przy obecnym stanie wiedzy medycznej tylko wczesne rozpoznanie nowotworu pęcherza moczowego może przyczynić się do poprawy ostatecznych wyników leczenia. Bezobjawowy początek i skryty przebieg choroby nowotworowej sprawiają, że zadanie to jest bardzo trudne.

Duże nadzieje wiąże się z badaniami nad molekularnymi podstawami chorób nowotworowych, które wskazują, że są one wynikiem akumulacji mutacji w genach, istotnych z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania komórki. Geny te zaliczane są do klasy onkogenów i genów supresorów transformacji nowotworowej. Aktywność proliferacyjna komórek normalnych jest wynikiem równowagi pomiędzy protoonkogenami promującymi wzrost, a supresorami transformacji nowotworowej, hamującymi podziały komórkowe. Zaburzenie tego stanu, najczęściej wynik mutacji punktowych, delecji genu, fuzji genowej, powstającej jako rezultat translokacji chromosomowej oraz amplifikacji genu, prowadzącej do zwielokrotnienia liczby kopii genu, sprzyja transformacji nowotworowej. Konsekwencją mutacji, które aktywują komórkowe protoonkogeny, jest niekontrolowany wzrost, charakterystyczny dla komórek rakowych, podczas gdy w przypadku supresorów transformacji nowotworowej, uszkodzenia genetyczne prowadzą do ich inaktywacji, eliminując tym samym czynniki negatywnie regulujące proliferację komórek. Należy także zwrócić uwagę na geny biorące udział w rozpoznawaniu i naprawie uszkodzeń DNA, albowiem ich inaktywacja w wyniku mutacji wpływa na wzrost częstości mutacji w onkogenach i supresorach transformacji nowotworowej.

Badania dotyczące anomalii genetycznych i/lub molekularnych mają na celu opracowanie klasyfikacji molekularnej, która w przyszłości mogłaby uzupełnić istniejącą klasyfikację anatomopatologiczną. W chwili obecnej analiza cytologiczna, uzupełniona cystoskopia, jest głównym narzędziem diagnostycznym raka pęcherza moczowego, zaś stopień zaawansowania oraz złośliwości są najbardziej wiarygodnymi wskaźnikami, jakkolwiek wydaje się, że proangiogeny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) może być wykorzystany jako wskaźnik nawrotu w przypadku formy powierzchniowej tego nowotworu [6]. Wysoka czułość markerów molekularnych, zwłaszcza w przypadku nowotworów o niższym stopniu zaawansowania i złośliwości, umożliwia wykorzystanie ich w testach uzupełniających badania cytologiczne lub histopatologiczne, czyniąc je tym samym narzędziem pomocnym w ustaleniu rozpoznania [7-9]. Obecnie trwają intensywne poszukiwania markerów prognostycznych i predykcyjnych, które mogłyby *a priori* ocenić skuteczność terapii. Zrozumienie zaś mechanizmów kancerogenezy umożliwia opracowanie nowych, skutecznych metod leczenia.

Defekty genowe w raku pęcherza moczowego

Defekty genowe są zjawiskiem powszechnie obserwowanym w przypadku raka pęcherza moczowego. Analizy kariotypowe wykazały aberracje, dotyczące liczby chromosomów 7, 8, 9 oraz aberracje strukturalne w chromosomach 3, 5, 8, 9, 11, 17, 18, zlokalizowane głównie w regionach kodujących onkogeny lub supresory transformacji nowotworowej [10]. Geny ulegające amplifikacji, delecji lub mutacjom w raku pęcherza moczowego zostały przedstawione w Tabeli nr 1. Całkowita utrata chromosomu 9 obserwowana jest w 50% przypadków raka pęcherza moczowego, zaś delecje obserwowane w tym chromosomie, prowadzące do utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH), stanowią najczęściej występującą aberrację w przypadku powierzchniowego raka przejściowokomórkowego (TCC), niezależnie od jego stopnia zaawansowania i złośliwości [11]. Zmiany genowe pojawiają się już w początkowych stadiach choroby nowotworowej i są głównie związane z delecjami locus 9p21 chromosomu 9, spotykanymi w pierwotnych guzach pęcherza moczowego w 70% przypadków [11]. Ich obecność zaobserwowano także w przypadku formy brodawkowatej oraz raka *in situ*. Delecje te inaktywują gen *p16 (CDKN2/INK4A)*, jak również dwa inne geny, leżące w tym samym regionie, kodujące białka p14ARF oraz p15. Wymienione powyżej białka pełnią funkcję supresorów transformacji nowotworowej i mogą być inaktywowane równocześnie na skutek delecji homozygotycznych [12]. Również w ramieniu długim chromosomu 9 (9q) w locus 9q13-9q33 występują delecje, które przypuszczalnie inaktywują szereg innych genów supresorowych [13]. Utrata fragmentów ramienia krótkiego chromosomu 11 (11p) towarzyszy progresji nowotworu ze stadium Ta do T1, a chromosomu 17p związana jest ze stadium naciekania błony mięśniowej pęcherza moczowego [14]. W niektórych przypadkach zmiany genowe chromosomu 9q są zjawiskiem wtórnym w stosunku do pojawiających się wcześniej mutacji w kolejnym genie supresorowym, tj. genie kodującym białko p53. Zjawisko to jest obserwowane w zmianach dysplastycznych oraz raku *in situ* [15]. Sekwencja zmian genowych, towarzyszących progresji raka pęcherza moczowego, została przedstawiona na rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający zmiany genowe w progresji formy brodawkowatej oraz raka *in situ* (wg Spruck i wsp., 1994 – zmodyf.).

Integralną częścią transformacji nowotworowej są zaburzenia mikrosatelitarnego DNA. Mikrosatelity są wysoce polimorficznymi regionami DNA, składającymi się z tandemowych powtórzeń sekwencji 1-5 nukleotydu, równomiernie rozproszonymi w genomie [16]. Zmiany w liczbie powtórzeń na skutek insercji lub delecji motywów powtórzeń, częstokroć wynik mutacji w genach mutatorowych, obserwowane są w wielu chorobach nowotworowych, w tym, w raku pęcherza moczowego [16]. Wykorzystując polimorficzne markery mikrosatelitarne, niestabilność mikrosatelitarną (ang. *microsatellite instability*, MSI) i/lub utratę heterozygotyczności wykazano w 96% przypadków raka pęcherza moczowego [8]. Ponadto, Sardi i wsp. na podstawie analizy mikrosatelitarnej raka pęcherza moczowego, z wykorzystaniem zestawu 12 mikrosatelitów, wykazali, że czułość tej metody w przypadku stopnia złośliwości G1, G2 i G3 wynosi odpowiednio 50, 50 i 81,8%, a w przypadku nowotworów Ta-T1 i T2-T4 wynosi 60 i 72,7% [17]. Bardzo obiecujące jest również wykorzystanie analizy sekwencji mikrosatelitarnych do badań DNA nowotworowego, występującego w płynach ustrojowych, takich jak mocz, surowica, plazma [18]. O zastosowaniu tego rodzaju analizy w diagnostyce i prognoście nowotworów zdecydują dalsze badania, mające na celu wytypowanie specyficznych markerów mikrosatelitarnych o dużej czułości.

Potencjalnym markerem progresji nowotworu jest gen *Rb*, zlokalizowany w chromosomie 13 [19]. Utrata funkcji tego genu w wyniku LOH lub mutacji związana jest z rozwojem siatkówczaka, kostniakomiesaka, mięsaka tkanek miękkich, raka płuc oraz prostaty. Gen ten, należący do supresorów transformacji nowotworowej, odgrywa istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego, a jego inaktywacja obserwowana jest u 1/3 chorych na raka pęcherza moczowego [20]. Cairns i wsp. wykazali, że nowotwory z nieaktywnym genem *Rb* charakteryzowały się większą agresywnością oraz progresją w raka inwazyjnego [19]. Ponadto wykazano, że pięcioletnie przeżycie jest znacznie krótsze w grupie pacjentów nie ujawniających ekspresji genu *Rb*, w porównaniu z grupą wykazującą normalny poziom ekspresji ($p < 0,001$) [20]. Wartość prognostyczną ma także białko p21 – inhibitor kinaz zależnych od cyklin. Białko p21 znajduje się pod kontrolą supresora transformacji nowotworowej – genu *p53*, aczkolwiek p21 może także funkcjonować niezależnie od p53 [21,22]. In-

aktywacja genu *p53* prowadzi do zahamowania ekspresji p21 i w konsekwencji do niekontrolowanego wzrostu komórek. Stein i wsp. wykazali, że w raku pęcherza moczowego ekspresja genu *p21* jest czynnikiem prognostycznym, niezależnym od stopnia zaawansowania i złośliwości oraz zaangażowania węzłów chłonnych [22]. W świetle tych badań inaktywacja genu *p53* oraz brak białka p21 związane są z większym prawdopodobieństwem wystąpienia wznowy oraz skróceniem czasu przeżycia w porównaniu z przypadkami, w których obserwuje się normalną ekspresję genu *p21* oraz brak aktywności białka p53 [22].

Zła prognoza w raku pęcherza moczowego związana jest z nadekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), kodowanego przez gen *c-erbB-1* [23]. Nowotwór, w którym stwierdza się nadmierną ekspresję EGFR, przebiega agresywniej. Wyrazem tego jest skrócenie okresu wolnego od wznowy i całkowitego przeżycia [24]. Wykazano również, że nadekspresja EGFR związana jest z wysokim stopniem zaawansowania i złośliwości, i jest niezależnym czynnikiem prognostycznym [25], jakkolwiek badania Nguyen i wsp. nie potwierdzają tego związku [26]. Ponadto wydaje się, że EGFR jest dobrym czynnikiem predykcyjnym, gdyż jego wysoki poziom związany jest z lepszą odpowiedzią na chemioterapię.

Zwiększona agresywność jest wynikiem zmniejszenia się ilości cząsteczki adhezyjnej – kadheryny E [27]. Obniżoną ekspresję tego białka zaobserwowano w 76% nowotworów inwazyjnych pęcherza moczowego [27]. Wykazano, że zmniejszona ekspresja kadheryny E związana jest ze zwiększoną częstością wznowy w przypadku nowotworów Ta-T1 [28] oraz skróconym czasem przeżycia [27]. Ponieważ nie wszystkie badania potwierdzają istnienie przedstawionych powyżej korelacji, wartość prognostyczna kadheryny E w raku pęcherza moczowego jest kwestionowana [29]. W świetle badań Otto i wsp. wartość prognostyczna zredukowanej ekspresji kadheryny E wzrasta w połączeniu z analizą wzrostu ekspresji receptora autokrynnego czynnika ruchliwości, białka GP78 [30]. W odróżnieniu od kadheryny E, której poziom ulega zmniejszeniu, ekspresja transbłonowej glikoproteiny CD44 wzrasta w przypadku wielu chorób nowotworowych [31]. CD44 jest białkiem adhezyjnym, występującym w różnych izoformach, będących wynikiem alterna-

Tab. I. Geny biorące udział w procesie onkogenezy pęcherza moczowego oraz znaczenie kliniczne obserwowanych defektów genowych

Locus	Geny biorące udział w onkogenezie pęcherza moczowego	Defekty genowe	Znaczenie kliniczne
3p25	<i>VHL</i>	LOH / amplifikacja	Niski stopień zaawansowania i złośliwości
7p12	<i>c-erbB-1</i>	Amplifikacja	Wysoki stopień zaawansowania / progresja / wznowa
8q24	<i>c-myc</i>	Amplifikacja	Niski stopień zaawansowania i złośliwości
9p21	<i>CDKN2</i>	LOH	Brak jednoznacznych korelacji
11p15.5	<i>Ha-ras</i>	Mutacje punktowe	Brak jednoznacznych korelacji
11q13	<i>CCND1</i>	Amplifikacja	Wczesna wznowa / nowotwór agresywny
13q14	<i>Rb</i>	Delecje / LOH	Wysoki stopień zaawansowania i złośliwości / progresja
17p13.1	<i>p53</i>	Mutacje / delecje / LOH	Wysoki stopień złośliwości / progresja
17q21	<i>c-erbB-2</i>	Amplifikacja	Wysoki stopień złośliwości
18q21	<i>DCC</i>	LOH / Mutacje	Wysoki stopień zaawansowania

tywnego składania RNA [32]. Obecność izoform CD44 wykazano także w raku pęcherza moczowego [31]. Z najnowszych badań, opartych na analizie tkanki nowotworowej oraz osadów komórkowych z moczu, wynika, że zwiększona ekspresja wariantów CD44, tj. CD44v8-10, związana jest z progresją nowotworu [33], zaś zredukowana ekspresja wariantu CD44v6 obserwowana jest w mało zróżnicowanych, inwazyjnych TCC [29].

Wskaźnikiem niekorzystnego prognozowania w raku pęcherza moczowego jest amplifikacja onkogenu *c-erbB-2* (*HER2/neu*). Produkt tego genu, białko p185, transbłonowa glikoproteina wykazująca podobieństwo do EGFR, posiada aktywność kinazy tyrozynowej [34] oraz zdolność stymulowania wzrostu komórki [35]. W raku pęcherza moczowego zaobserwowano związek pomiędzy zwiększoną ekspresją *c-erbB-2*, a wyższym stopniem zaawansowania nowotworu [36], progresją [37], zwiększoną częstością występowania przerzutów [38] oraz skróconym czasem przeżycia [36]. Pomimo, że większość badań potwierdza prognostyczne znaczenie *c-erbB-2*, istnieją prace, z których wynika, że ewaluacja tego onkogeny nie ma znaczenia prognostycznego i tym samym stopień zaawansowania i złośliwości są najistotniejszymi czynnikami prognostycznymi [39]. Znaczenie prognostyczne ekspresji genu *c-myc*, ważnego regulatora proliferacji komórkowej, wymaga również dalszej ewaluacji. Chromosomalne translokacje oraz amplifikacje genów należących do rodziny *myc* są zjawiskiem powszechnie obserwowanym w chorobach nowotworowych, a ich zwiększona ekspresja promuje proliferację komórkową [40]. W raku pęcherza moczowego Kotake i wsp. [41] zaobserwowali korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją białka c-Myc i wyższym stopniem zaawansowania nowotworu, z drugiej strony Lipponen i wsp. [42] wykazali, że amplifikacja onkogeny *c-myc*, obserwowana w guzach mało zróżnicowanych, nie wykazuje współzależności z czasem przeżycia i progresją nowotworu.

Brak korelacji pomiędzy mutacjami w genie *Ha-ras*, spotykanymi u 20-50% pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, a stopniem zaawansowania i złośliwości sprawiają, że mutacje tego onkogeny nie są zaliczane do najistotniejszych zmian molekularnych, leżących u podstaw procesu kancerogenezy [43]. Jakkolwiek bardzo obiecujące jest wykorzystanie osadów komórkowych z moczu do identyfikacji mutacji w genie *Ha-ras* oraz nieinwazyjnego i wczesnego wykrywania raka układu moczowego [44].

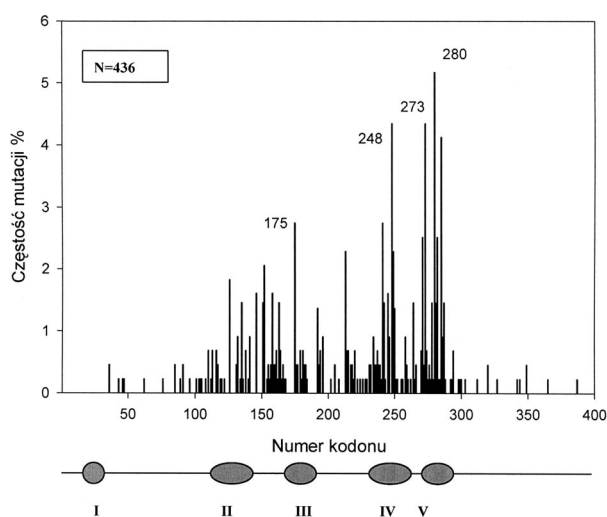
Gen *p53* a rak pęcherza moczowego

Na szczególną uwagę zasługuje gen *p53*, nazywany strażnikiem genomu, biorący udział w regulacji cyklu komórkowego. Gen ten, zlokalizowany w locus 17p13 chromosomu 17, odgrywa istotną rolę w rozwoju raka pęcherza moczowego [45]. Podstawową funkcją białka *p53* jest regulacja transkrypcji, swoista dla normalnej, a nie zmutowanej formy białka *p53* oraz regulacja cyklu komórkowego przy przejściu z fazy G1 do S [46, 47]. Aktywacja białka *p53* w wyniku uszkodzenia DNA może doprowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego, umożliwiając

tym samym naprawę DNA [48] lub zainicjować zaprogramowaną śmierć komórki, czyli apoptozę [49]. Do czynników aktywujących białko *p53* należą: cytokiny, niedotlenienie, uszkodzenia genetyczne, zmiany w metabolizmie komórkowym oraz niektóre białka wirusowe [50, 51]. Zaś funkcja *p53* regulowana jest na poziomie transkrypcji, translacji poprzez czas półtrwania, lokalizację wewnątrzkomórkową oraz oddziaływanie z innymi białkami. Istotną rolę w aktywności *p53* odgrywa także fosforylacja N- i C-końcowego fragmentu tego białka [52]. Utrata regulatorowych funkcji przez białko *p53* uniemożliwia, między innymi, indukcję genów regulujących wycinanie błędnie sparowanych zasad DNA, rekombinację i segregację chromosomów, prowadząc tym samym do utraty stabilności genetycznej [53]. Powszechnie obserwowanym defektem genowym w komórkach rakowych są mutacje w genie *p53*, które pozostają w związku przyczynowym z procesem kancerogenezy. W dwunastu najczęstszych nowotworach zidentyfikowano mutacje somatyczne w genie *p53*, występujące ogółem u 40 do 45% pacjentów [54]. Mutacje w genie *p53* należą głównie do mutacji punktowych zmiany sensu, którym bardzo często towarzyszy utrata heterozygotyczności (LOH) [54]. Konsekwencją braku prawidłowo funkcjonującego białka *p53* jest utrata kontroli nad podziałami komórki i naprawą uszkodzeń DNA, prowadząca do gromadzenia aberracji chromosomowych, i rozwoju transformacji nowotworowej.

Częstość występowania mutacji w genie *p53* wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu i tak np. w przypadku raka jelita grubego ilość mutacji punktowych rośnie w miarę przemiany guza niezłośliwego (*adenoma*) w formę złośliwą (*carcinoma*) [55]. Jakkolwiek mutacje w genie *p53* spotykane są we wczesnych stadiach transformacji nowotworowej [56], to jednak ich największa częstość obserwowana jest w przypadku nowotworów o niskim stopniu zróżnicowania, co pozwala na wykorzystanie tej cechy w prognostyce [57]. W raku pęcherza moczowego obserwuje się korelację pomiędzy mutacjami w genie *p53* (występują u 50% pacjentów), a zróżnicowaniem nowotworu i stanem klinicznym pacjenta [58, 59]. Stosunkowo wysoką częstość mutacji genu *p53* obserwuje się w stadium T2-T4, w porównaniu z T1, co sugeruje, że mutacje te związane są z progresją nowotworu [60]. Do analizy mutacji w genie *p53* stosuje się najczęściej metodę SSCP (polimorfizm konformacyjny jednoniciowego DNA, ang. *Single Strand Conformation Polymorphism*) oraz sekwencjonowanie DNA. Alternatywną metodą, pozwalającą na analizę mutacji w genie *p53* i cieszącą się coraz większym zainteresowaniem, jest metoda z wykorzystaniem mikrochipów DNA, inaczej płytek genowych. Duża specyficzność, szybkość oraz niski koszt tej analizy zostały ostatnio potwierdzone badaniami Wikman'a i wsp., którzy wykonali analizę mutacji w genie *p53* na bazie DNA, pochodzącego od 140 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego [61]. W raku pęcherza moczowego, tak jak w przypadku innych nowotworów litych, mutacje w genie *p53* występują głównie w egzonach od 5 do 8 [62]. Najczęściej obserwuje się mutacje punktowe (transycje lub transwersje) typu: G:C → A:T 37%, G:C → T:A 4%,

RAK PĘCHERZA MOCZOWEGO



Ryc. 2. Rozkład mutacji w genie *p53* w raku pęcherza moczowego. Oś odciętych reprezentuje 393 kodony genu *p53*. Liczby rzymskie (I-V) oznaczają położenie konserwatywnych domen genu *p53*, natomiast N całkowitą ilość mutacji

G:C→ C:G 21%, A:T→G:C 9%, A:T→T:A 3%, A:T→C:G 2%, delecje/insercje 14%, tranzycje w dinukleotydach CpG 16%, zaś kodonem najczęściej ulegającym mutacjom, jest kodon 280 (Ryc. 2).

Analiza immunohistochemiczna białka p53 w raku pęcherza moczowego

Wydłużenie się czasu półtrwania białka p53 z 5-20 minut do kilku godzin, częstokroć wynik zmiany konformacji pod wpływem mutacji, umożliwia wykrycie stabilnego białka w jądrze komórkowym, przy zastosowaniu techniki immunohistochemicznej. Związek pomiędzy obecnością mutacji, a podwyższonym poziomem białka p53 został także odnotowany w przypadku raka pęcherza moczowego [63]. Należy jednak pamiętać, że nie wszystkie mutacje punktowe wywołują podwyższenie poziomu białka p53 [64], jak również nie są one jedynym mechanizmem jego stabilizacji, albowiem modyfikacje kowalencyjne białka p53 oraz oddziaływanie z licznymi białkami komórkowymi i wirusowymi wpływają także na stabilność p53, regulując tym samym jego funkcję transaktywacyjną. Do białek komórkowych, wpływających na stabilność p53, należą: Mdm2 [65], N-terminalna kinaza c-Jun (JNK) [66], produkt genu *WT1* [67], p300/CBP [68], p19 ARF [69]. Kluczowym regulatorem jest białko Mdm2, które umożliwia przyłączenie ubikwityny do niezmutowanego białka p53 „wyznaczając” p53 do degradacji [70]. Z badań Fuchs i wsp. wynika, że kinaza JNK, poprzez oddziaływanie z p53, prowadzi także do ubikwitynacji i proteolitycznego rozpadu białka p53 [66]. W odpowiedzi na stres i uszkodzenia DNA, fosforylacja białka p53 przez kinazy DNA-PK [71], ATM [72], Chk1 i Chk2 [73] zmienia konformację p53, uniemożliwiając asocjację z Mdm2 lub JNK i tym samym degradację p53 [66]. Czynniki stabilizującymi

p53 są białka komórkowe p19ARF, WT1 i p300/CBP oraz białka wirusowe czyli duży antygen T wirusa SV40 [74] i białko E1B adenowirusa Ad5 [75].

Akumulacja białka p53 obserwowana jest zarówno w raku powierzchniowym (TCC) z naciekaniami mięśniówkami, jak również w przypadku zmian dysplastycznych i raku *in situ* [76, 77]. Podwyższony poziom białka p53 obserwowany jest w przedziale od 20% [78] do 63% [79] w raku pęcherza moczowego. Ponadto w 25% przypadków akumulacji białka p53 nie towarzyszy mutacja w kodującym je genie, zaś w 10% stwierdzono obecność mutacji, lecz brak zwiększonej ekspresji w badaniu immunohistochemicznym. Duże rozbieżności dotyczą także korelacji pomiędzy akumulacją białka p53, a stopniem złośliwości i zaawansowania nowotworu. Immunoreaktywność białka p53 według niektórych autorów może być niezależnym czynnikiem prognostycznym nawrotu choroby w przypadku pacjentów, u których z powodu inwazyjnego raka pęcherza moczowego wykonano radykalną cystektomię [80], podczas gdy inni nie obserwują korelacji pomiędzy mutacjami w genie *p53* i/lub akumulacją białka p53, a przebiegiem choroby [81, 82]. Tym samym rokownicze znaczenie immunohistochemicznej ekspresji białka p53 w raku pęcherza moczowego jest zagadnieniem kontrowersyjnym. Spośród 138 artykułów opublikowanych na ten temat i dostępnych w bazie Medline w latach 1991-1999, obejmujących populację 3764 chorych, trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski dotyczące prognostycznego aspektu akumulacji białka p53 w raku pęcherza moczowego [83]. Zgodnie jednak z większością badań, immunoreaktywność białka p53 związana jest z agresywnym stadium choroby nowotworowej. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z braku standaryzacji metody oraz różnic w sposobach interpretacji obrazów immunohistochemicznych. Powtarzalność oraz dokładność metody w dużym stopniu zależy od sposobu przygotowania i utrwalenia materiału, jak również zastosowanych przeciwciał anty-p53 oraz metody detekcji kompleksu antygen – przeciwciało. Ponadto należy uwzględnić fakt, że negatywne wyniki analizy immunohistochemicznej mogą być rezultatem obecności skróconej formy białka p53. Na podstawie istniejących rozbieżności, dotyczących prognostycznego znaczenia akumulacji białka p53, wydaje się, że rozwiązaniem tego problemu może być jedynie skompleksowana, ośrodkowa, perspektywna analiza korelacji pomiędzy immunoreaktywnością białka p53, a przebiegiem raka pęcherza moczowego, z uwzględnieniem stopnia zaawansowania i złośliwości.

Autoprzeciwciała anty – p53 w raku pęcherza moczowego

Opracowanie nieinwazyjnych metod diagnostycznych raka pęcherza moczowego jest przedmiotem wielu prac naukowych. Duże nadzieje wiąże się z analizą defektów genowych w genie *p53*, wykorzystując do tego celu złuszczone komórki nabłonka, występujące w osadach moczu u osób chorych [59]. Dogodnym materiałem do badań jest także surowica ludzka i w tym miejscu należy zwrócić

uwagę na analizę serologiczną, związaną z występowaniem w surowicy pacjentów autoprzeciwciał anti-p53. W 1982 roku Crawford i wsp. odnotowali humoralną odpowiedź immunologiczną, skierowaną przeciwko białku p53 u 9% kobiet z rakiem piersi [84]. Późniejsze badania Caron de Fromentel i wsp. wykazały obecność przeciwciał anti-p53 w surowicy 12% dzieci z różnymi rodzajami nowotworów i 20% w przypadku chłoniaka Burkitta [85]. Prace te zapoczątkowały nowy nurt badań nad właściwościami białka p53 i doprowadziły do analizy serologicznej 9489 pacjentów z różnymi typami nowotworów, w okresie od 1979 do sierpnia 1999 roku [86]. Pomimo występowania mutacji w genie *p53*, w 50% nowotworów [54] częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 obserwuje się w granicach 15-20 procent [86]. Badania korelacji pomiędzy obecnością mutacji, akumulacją białka p53, a obecnością przeciwciał skupiają uwagę wielu laboratoriów. Jak dotąd nie zostały wyjaśnione nieliczne, aczkolwiek spotykane przypadki obecności przeciwciał anti-p53, którym nie towarzyszy mutacja w genie *p53*, jak i akumulacja białka p53 [87, 88]. Prawdopodobnym jest jednak istnienie mutacji poza regionem, który został użyty do analizy molekularnej, ponadto czułość zastosowanej metody, jak również duża heterogenność materiału może uniemożliwiać dokładną analizę prób. Nie jest jednak wykluczone, że stan ten informuje o rozwoju drugiej choroby, w której akumulacja białka p53 zaindukowała odpowiedź immunologiczną.

Pomimo istnienia wielu kontrowersyjnych doniesień na ten temat autoprzeciwciała anti-p53 są specyficznym markerem procesu nowotworowego ($p < 0,0001$), jak również obserwuje się tendencję w kierunku istnienia korelacji pomiędzy ich obecnością, a słabym zróżnicowaniem nowotworu i krótszym czasem przeżycia [86]. Z badań Sanchez-Carbayo i wsp. wynika, że obecność przeciwciał anti-p53 w raku pęcherza moczowego, sięgająca 24%, koreluje ze stopniem złośliwości i zaawansowania nowotworu oraz skróconym czasem przeżycia [89].

Wydaje się, że analiza serologiczna może stanowić bazę dla efektywnych metod uzupełniających obecnie stosowane badania lekarskie oraz istniejące już testy kliniczne. Potwierdzają to badania Volkmana i wsp., które wykazały, że analiza obecności przeciwciał anti-p53 u chorych na raka wątroby może uzupełniać konwencjonalną metodę, badającą stężenie markera onkopłodowego, jakim jest alfa-fetoproteina (AFP) [87]. Przeprowadzono także analizę porównawczą pomiędzy takimi markerami różnicowania, jak: CA-125 (antygen raka jajnika), CEA (antygen karcinoembrionalny), a poziomem przeciwciał anti-p53 [90]. Zmiany stężenia CA-125, obserwowane w trakcie terapii pacjentów z rakiem jajnika, pokrywały się ze zmianami stężenia przeciwciał anti-p53. W przypadku pacjentki chorej na raka piersi, u której poziom CEA mieścił się w granicy wartości prawidłowych, obserwowano ciągły wzrost stężenia przeciwciał anti-p53. Obserwacje te potwierdzają hipotezę, że śledzenie poziomu autoprzeciwciał anti-p53 może okazać się niezwykle cennym w przypadkach, w których stężenia standardowo używanych markerów mieszczą się w granicy wartości pra-

widłowych. Obiecująca jest również możliwość wykorzystania autoprzeciwciał anti-p53 w monitorowaniu skuteczności terapii, co zostało wykazane w raku płuca [91], przelyku [92] oraz okrężnicy [93]. Szybki spadek poziomu autoprzeciwciał anti-p53 w tych nowotworach zaobserwowano w przypadku zastosowania skutecznej terapii, zaś wzrost ich poziomu świadczył o progresji choroby nowotworowej. Badania kliniczne wykazały, że przeciwciała te są niezależnym czynnikiem prognostycznym krótkiego czasu przeżycia w raku piersi [94] oraz nowotworach głowy i szyi [95]. Ponadto możliwym jest wykorzystanie autoprzeciwciał anti-p53 we wczesnej diagnostyce w przypadku osób należących do grupy zwiększonego ryzyka [96, 97].

Duża skłonność do nawrotów w przypadku powierzchownego raka pęcherza moczowego stwarza możliwość wykorzystania analizy poziomu autoprzeciwciał anti-p53 do wczesnego wykrycia wznowy, nie ma jednak na ten temat żadnych informacji, jak również nie ma danych wskazujących na możliwość zastosowania tego typu skryningu serologicznego u osób ze zwiększonym ryzykiem (np. czynniki zawodowe) raka pęcherza moczowego. Na podstawie ostatnich badań, wykazujących u osób chorych na raka wątrobowokomórkowego obecność autoprzeciwciał, skierowanych przeciwko więcej niż jednemu antygenowi nowotworowemu [98], interesującym jest opracowanie metody polegającej na wzajemnie uzupełniających się badaniach poziomu kilku różnych autoprzeciwciał i tym samym zwiększenie czułości oraz wartości diagnostycznej analizy serologicznej.

p53 a terapia genowa

Rozwój skutecznej terapii musi opierać się na zrozumieniu podłoża molekularnego leżącego u podstaw transformacji i progresji nowotworu, jak również na poznaniu mechanizmów regulujących neoplastyczny wzrost. Mutacje w genie *p53*, prowadzące do utraty przez białko p53 funkcji supresorowych, czynią je interesującym obiektem badań, umożliwiającym opracowanie nowych terapii antynowotworowych. Podejść do tego zagadnienia jest wiele i polegają one między innymi na wykorzystaniu wiedzy dotyczącej rodzaju mutacji w genie *p53*. Poznanie mechanizmu oddziaływania białka p53 z DNA zapoczątkowało nowy nurt badań, zmierzający do opracowania związków przywracających mutantom p53 funkcję charakterystyczną dla prawidłowego białka [99]. Należą do nich między innymi peptydy, przeciwciała i związki syntetyczne, reaktywujące mutanty p53 [100].

Trwają prace zmierzające do zahamowania transformacji nowotworowej, polegające na wykorzystaniu wektorów adenowirusowych (Ad5CMV-P53), umożliwiających transfer ludzkiego, niezmutowanego genu *p53* do komórek rakowych. Tego typu badania zostały przeprowadzone *in vitro* oraz *in vivo*, w tym także dla raka pęcherza moczowego [101, 102]. Mechanizm zahamowania wzrostu nie jest w tym przypadku do końca poznany. Przypuszcza się, że dopęcherzowo wprowadzony gen *p53* hamuje cykl komórkowy i indukuje proces starzenia [103]. Ponadto zaob-

serwowano wzrost wrażliwości na cisplatynę w komórkach TCC, co sugeruje, że transfer genu *p53* może promować apoptozę i działać synergistycznie z zastosowanym w tym przypadku lekiem. Połączenie terapii genowej z chemioterapią i/lub radioterapią stwarza nowe, obiecujące perspektywy dla rozwoju skutecznej terapii w raku pęcherza moczowego.

Uwagi końcowe

Wraz z postępowaniem w zrozumieniu mechanizmów leżących u podstaw nowotworzenia jednym z najważniejszych kierunków działania biologii molekularnej w onkologii jest dokładna ewaluacja istniejących oraz poszukiwanie nowych markerów nowotworowych. Na szczególną uwagę zasługują badania prospektywne, które umożliwią identyfikację markerów, ułatwiających wczesne wykrycie raka pęcherza moczowego w grupach zwiększonego ryzyka oraz markerów pomocnych w wyborze i monitorowaniu skuteczności terapii. Wydaje się, że obok szczegółowych analiz defektów genowych, w tym mutacji w onkogenach lub supresorach transformacji nowotworowej, bardziej ogólne markery zmian genomowych, takie jak utrata heterozygotyczności, niestabilność mikrosatelitarna oraz metylacja DNA będą bardzo użyteczne w badaniach zmierzających do opracowania efektywnych metod diagnostycznych i prognostycznych.

Dr Beata Schlichtholz
Katedra i Zakład Biochemii AMG
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk
e-mail: bsch@amg.gda.pl

Piśmiennictwo

- Zatoński W, Tyczyński J. Zarejestrowane zachorowania na nowotwory złośliwe – 1996. W: Zatoński W, Tyczyński J (red): *Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 roku*. Warszawa: Pracownia Poligraficzna Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, 1999: 4.
- Ross RK, Jones PA, Yu MC. Bladder cancer epidemiology and pathogenesis. *Semin Oncol* 1996; 23: 536-45.
- Skinner D G, Stein P, Lieskovsky G i wsp. 25-year experience in the management of invasive bladder cancer by radical cystectomy. *Eur Urol* 1998; 33: 25-6.
- Alfthan O, Jauhiainen K, Kaasinen E i wsp. Current concepts in the role of intravesical instillations in the therapy and prophylaxis of superficial transitional-cell cancer of the bladder. The Finnbladder Research Group. *World J Urol* 1997; 15: 89-5.
- Heney N M, Ahmed S, Flanagan M J i wsp. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983; 130: 1083-6.
- Crew JP, O'Brien T, Bicknell R i wsp. Urinary vascular endothelial growth factor and its correlation with bladder cancer recurrence rates. *J Urol* 1999; 161: 799-04.
- Hruban R H, Riet P, Erozan Y S i wsp. Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder – The case of Hubert H. Humphrey. *NEJM* 1994; 330: 1276-8.
- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271: 659-62.
- Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K i wsp. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 129-33.
- Sandberg AA, Berger CS. Review of chromosome studies in urological tumors II Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol* 1994; 151: 545-60.
- Cairns P, Tokino K, Eby Y i wsp. Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994; 54: 1422-4.
- Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ i wsp. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1524-9.
- Ruppert JM, Tokino K, Sidransky D. Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9. *Cancer Res* 1993; 53: 5093-5.
- Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW i wsp. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 1990; 50: 7081-3.
- Spruck CH, Ohneseit PF, Gonzales-Zulueta M i wsp. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54: 784-8.
- Lothe RA. Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol Med Today* 1997; 3: 61-8.
- Sardi I, Bartoletti R, Occhini I i wsp. Microsatellite alterations in superficial and locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 1999; 6: 901-5.
- Utting M, Werner W, Dahse R i wsp. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: A minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 35-40.
- Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogen* 1991; 6: 2305-9.
- Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak Diw. Altered expression of the retinoblastoma gene product: Prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-6.
- Michieli P, Chedid M, Lin D i wsp. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-5.
- Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD i wsp. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1072-9.
- Ravery V, Colombel M, Popov Z i wsp. Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 196-200.
- Neal DE, Mellon K. Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: a review. *Urol Int* 1992; 48: 365-71.
- Neal DE, Sharples L, Smith K i wsp. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65: 1619-25.
- Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W i wsp. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 166.
- Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE i wsp. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 3241-5.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 303-8.
- Hong RL, Pu YS, Hsieh TS i wsp. Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol* 1995; 153: 2025-8.
- Otto T, Birchmeier W, Schmidt U i wsp. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3120-3.
- Woodman AC, Sugiyama M, Yoshida K i wsp. Analysis of anomalous CD44 gene expression in human breast, bladder, and colon cancer and correlation of observed mRNA and protein isoforms. *Am J Pathol* 1996; 149: 1519-30.
- Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
- Miyake H, Eto H, Arakawa S i wsp. Over expression of CD44V8-10 in urinary exfoliated cells as an independent prognostic predictor in patients with urothelial cancer. *J Urol* 2002; 167: 1282-7.
- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H i wsp. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-6.
- Lee J, Dull TJ, Lax I i wsp. HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in chimeric receptor. *EMBO J* 1989; 8: 167-73.
- Gorgoulis VG, Barbatis C, Poulas I i wsp. Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene product in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: a study in Greek patients. *Mod Pathol* 1995; 8: 758-64.
- Underwood M, Bartlett J, Reeves J i wsp. C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res* 1995; 55: 2422-30.

38. Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T i wsp. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 1991; 145: 423-7.
39. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 1994; 69: 1120-5.
40. Watt RA, Shatzman AR, Rosenberg M. Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 448-56.
41. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T i wsp. Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 1198-1201.
42. Lipponen PK. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J Pathol* 1995; 175: 203-10.
43. Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res* 1993; 53: 133-9.
44. Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K i wsp. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 129-33.
45. Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW i wsp. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 1990; 50: 7081-3.
46. Farmer G, Bargonetti J, Zhu H i wsp. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*. 1992; 358: 83-6.
47. Livingstone LR, White A, Sprouse J i wsp. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992; 70: 923-35.
48. Mack DH, Vartikar J, Pipas JM i wsp. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 1993; 363: 281-3.
49. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T i wsp. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-67.
50. Hall PA, Meek D, Lane DP. p53--integrating the complexity. *J Pathol* 1996; 180: 1-5.
51. Jacks T, Weinberg RA. Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996; 381: 643-4.
52. Takenaka I, Morin F, Seizinger BR i wsp. Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem* 1995; 270: 5405-11.
53. Wahl GM, Linke SP, Paulson TG i wsp. Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* 1997; 29: 183-219.
54. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B i wsp. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
55. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61: 759-67.
56. Sozzi G, Miozzo M, Donghi R i wsp. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 1992; 52: 6079-82.
57. 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: 1-4.
58. Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR i wsp. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol* 1996; 23: 571-84.
59. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC i wsp. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.
60. Spruck CH, III, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M i wsp. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54: 784-8.
61. Wikman FP, Lu ML, Thykjaer T i wsp. Evaluation of the performance of a p53 sequencing microarray chip using 140 previously sequenced bladder tumor samples. *Clin Chem* 2000; 46: 1555-61.
62. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M i wsp. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
63. Esrig D, Spruck CH, III, Nichols PW i wsp. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 1389-97.
64. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME i wsp. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 7555-9.
65. Haupt Y, Maya R, Kazaz A i wsp. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296-9.
66. Fuchs SY, Adler V, Buschmann T i wsp. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 1998; 12: 2658-63.
67. Maheswaran S, Englert C, Bennett P i wsp. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 1995; 9: 2143-56.
68. Grossman SR, Perez M, Kung AL i wsp. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998; 2: 405-15.
69. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ i wsp. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92: 713-23.
70. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000; 242: 15-29.
71. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y i wsp. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91: 325-34.
72. Banin S, Moyal L, Shieh S i wsp. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281: 1674-7.
73. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S i wsp. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000; 287: 1824-7.
74. Tiemann F, Zerrahn J, Deppert W. Cooperation of simian virus 40 large and small T antigens in metabolic stabilization of tumor suppressor p53 during cellular transformation. *J Virol* 1995; 69: 6115-21.
75. Querido E, Marcellus RC, Lai A i wsp. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* 1997; 71: 3788-98.
76. Schmitz-Drager BJ, van Roeyen CR, Grimm MO i wsp. P53 accumulation in precursor lesions and early stages of bladder cancer. *World J Urol* 1994; 12: 79-83.
77. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C i wsp. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994; 152: 388-92.
78. Pfister C, LaRue H, Moore L i wsp. Tumorigenic pathways in low-stage bladder cancer based on p53, MDM2 and p21 phenotypes. *Int J Cancer* 2000; 89: 100-4.
79. Morita T, Tachikawa N, Kumamaru T i wsp. Serum anti-p53 antibodies and p53 protein status in the sera and tumors from bladder cancer patients. *Eur Urol* 2000; 37: 79-84.
80. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE i wsp. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1384-90.
81. Vet JA, Bringuier PP, Poddighe PJ i wsp. p53 mutations have no additional prognostic value over stage in bladder cancer. *Br J Cancer* 1994; 70: 496-500.
82. Lipponen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993; 53: 365-70.
83. Schmitz-Drager BJ, Goebell PJ, Heydthausen M. p53 immunohistochemistry in bladder cancer. Combined analysis: a way to go? *Urol Oncol* 2000; 5: 204-10.
84. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982; 30: 403-8.
85. Caron dF, May-Levin F, Mouriessé H i wsp. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1987; 39: 185-9.
86. Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000; 60: 1777-88.
87. Volkman M, Muller M, Hofmann WJ i wsp. The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-fetoprotein status. *Hepatology* 1993; 18: 559-65.
88. Wild CP, Ridanpaa M, Anttila S i wsp. p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *Int J Cancer* 1995; 64: 176-81.
89. Sanchez-Carbayo M, Chulia MT, Niveiro M i wsp. Autoantibodies against P53 protein in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 1999; 19: 3531-7.
90. Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ i wsp. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994; 58: 480-7.
91. Zalcman G, Schlichthol B, Tredaniel J i wsp. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1359-66.
92. Shimada H, Takeda A, Arima M i wsp. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1677-83.
93. Takeda A, Shimada H, Nakajima K i wsp. Serum p53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 45-9.
94. Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R i wsp. Prognostic significance of circulating P53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995; 345: 621-2.
95. Burhis J, Lubin R, Roche B i wsp. Burhis J, Lubin R, Roche B i wsp. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88: 1228-33.
96. Lubin R, Zalcman G, Bouchet L i wsp. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat Med* 1995; 1: 701-2.

97. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Serum p53 antibodies in patients with oral lesions: correlation with p53/HSP70 complexes. *Int J Cancer* 1997; 744: 609-13.
98. Zhang JY, Zhu W, Imai H i wsp. De novo humoral immune response to cancer – associated autoantigens during transition from chronic liver disease to hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 3-9.
99. Abarzua P, LoSardo JE, Gubler ML i wsp. Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* 1996; 13: 2477-82.
100. Bullock AN, Fresht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 68-76.
101. Miyake H, Hara I, Hara S i wsp. Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by adenovirus-mediated P53 gene transfer in human bladder cancer model. *Urology* 2000; 56: 332-6.
102. Pagliaro LC. Gene therapy for bladder cancer. *World J Urol* 2000; 18: 148-51.
103. Sugrue MM, Shin DY, Lee SW i wsp. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9648-53.

Otrzymano: 23 sierpnia 2001 r.

Przyjęto do druku: 15 maja 2002 r.