

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDKRP) pozostaje najczęstszym nowotworem złośliwym w większości rozwiniętych krajów świata. Rokowanie w tym typie nowotworu nie uległo zmianie w ostatnich dziesięcioleciach i nadal pozostaje złe. Ze względu na dużą różnorodność NDKRP, praktycznie nie można przewidzieć przebiegu klinicznego choroby u poszczególnych chorych. Gen supresorowy *WAF1/CIP1* (*WAF1*, *Cip1*, *sdi1*, *CAP20*) zlokalizowany na chromosomie 6p21.2, koduje białko o masie cząsteczkowej 21 kDa. Produkt białkowy tego genu – białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> indukowane jest przez *dziką* formę białka p53 i uczestniczy w zahamowaniu cyklu komórkowego pomiędzy fazami G<sub>1</sub>/S. Zaburzenia regulacji stężenia białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> odgrywają ważną rolę w transformacji nowotworowej. Ze względu na zaangażowanie w zahamowanie apoptozy gen *WAF1/CIP1* pełni funkcję zarówno genu supresorowego, jak i protoonkogenu. Występowanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDKRP) oceniono w wielu badaniach, jakkolwiek tylko w pojedynczych oceniono wartość rokowniczą tego parametru. W przedstawionej pracy podsumowano dane na temat klinicznego znaczenia występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP.

**Słowa kluczowe:** p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, niedrobnokomórkowy rak płuca.

## Kliniczne znaczenie ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w niedrobnokomórkowym raku płuca

*The clinical significance of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression in non-small cell lung cancer*

Dorota Dworakowska

Klinika Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy, Akademia Medyczna, Gdańsk

Rak płuca, z uwagi na dużą i ciągle rosnącą liczbę zachorowań oraz niezadowalające wyniki leczenia, stanowi istotny problem medyczny i społeczny. W ostatnich kilku latach pojawiło się wiele doniesień wskazujących, że zastosowanie leczenia chemicznego w uzupełnieniu metod miejscowych może przyczynić się do niewielkiej, ale klinicznie istotnej poprawy wyników leczenia. Wiele danych wskazuje, że lepsze poznanie cech biologicznych tej grupy nowotworów mogłoby stanowić element pomocny w opracowaniu nowych strategii leczniczych, w tym terapii genowej. Terapia ta w przyszłości pozwoli prawdopodobnie na dobranie indywidualnego sposobu leczenia dla konkretnego chorego w odniesieniu do zaburzeń genetycznych, które u niego występują.

Gen supresorowy *WAF1/CIP1* (*WAF1*, *Cip1*, *sdi1*, *CAP20*), zlokalizowany na chromosomie 6p21.2, koduje białko o masie cząsteczkowej 21 kDa. Produkt białkowy tego genu – białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> indukowany jest przez *dziką* formę białka p53 i uczestniczy w zahamowaniu cyklu komórkowego pomiędzy fazami G<sub>1</sub>/S [1]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> inaktywując kinazy zależne od cyklin (cdk), powoduje zatrzymanie fosforylacji białka pRb [2]. Jest ono zaangażowane w regulację naprawy DNA [3], w proces różnicowania komórek [4] oraz w zahamowanie procesu apoptozy [5, 6]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> poprzez hamowanie białka PCNA, uczestniczy w zatrzymaniu replikacji DNA [3]. Zaburzenia regulacji stężenia białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> odgrywają istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej [7]. Ze względu na zaangażowanie w zahamowanie apoptozy gen *WAF1/CIP1* może prawdopodobnie odgrywać rolę, nie tylko jako gen supresorowy, ale również jako protoonkogen [6].

Po uszkodzeniu DNA, p53-zależna indukcja białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego [1]. W komórkach, które utraciły *dziką* formę białka p53 lub zawierają zmutowane białko p53, stężenie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest bardzo niskie lub p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest całkowicie nieobecne. Brak białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> przy równoczesnym braku funkcjonalnego białka p53 może spowodować przejście komórki do fazy S, bez zatrzymania w fazie G<sub>1</sub>, pomimo uszkodzenia nici DNA. W konsekwencji może dojść do niestabilności genetycznej komórki oraz indukcji onkogenezy [8]. Z drugiej strony białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może w różnych sytuacjach działać niezależnie od p53 [9] np. podczas fizjologicznego rozwoju tkanek czy różnicowania komórek [4].

Kliniczne znaczenie występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP pozostaje tematem kontrowersji [10–13]. Dodatkowo niewiele jest prac dotyczących łącznej oceny współwystępowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wraz z pozostałymi białkami zaangażowanymi w regulację cyklu komórkowego (m.in. p53, pRb, mdm2, PCNA). Jak dotąd w odniesieniu do wielu białek (m.in. p53, pRb)

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common human malignancy in the majority of the developed countries. Prognosis in this tumor has virtually not changed during the last decades and still remains particularly gloomy. Due to heterogeneity of NSCLC, its clinical course and biological behavior are difficult to predict reliably in an individual patient.

Tumor suppressor gene *WAF1/CIP1* (*WAF1*, *Cip1*, *sdi1*, *CAP20*) localized on chromosome 6p21.2, codes 21 kDa protein. The product of this gene – p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein, is activated by wild-type p53 protein and is involved in cell cycle arrest between G1/S cell cycle phases. Alteration in p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein concentration seems to be very important in cancer transformation. Because of involvement in apoptosis inhibition, *WAF1/CIP1* is supposed to play a role not only as a tumor suppressor but also as a proto-oncogene. Expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> was assessed in many non-small cell lung cancer series, however, between these papers, only a few concerned its prognostic value. In this paper the clinical significance of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in NSCLC was summarized.

**Key words:** p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, non-small cell lung cancer.

dysponujemy niedoskonałymi przeciwciałami, które nie pozwalają w pełni ustalić z jakim zaburzeniem mamy do czynienia. Ocena współwystępowania czynników, które podlegają regulacji białka p53 i pRb, może w znacznym stopniu poszerzyć nasze rozumienie, które funkcje danego genu zostały zaburzone w komórce nowotworowej. I tak np. występowanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w lepszy sposób ocenia stan funkcjonalny genu P53 niż sama ocena występowania białka p53. Dzieje się tak dlatego, ponieważ białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ulega akumulacji w przypadku pobudzenia genu P53 [1, 14].

W piśmiennictwie światowym odsetek guzów z obecnością białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP wahał się pomiędzy 27 a 80 proc. [10, 11, 15–25]. Tak duża rozpiętość ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP może wynikać z różnic metodologicznych, dotyczących barwienia immunohistochemicznego. Drugą istotną kwestią jest przyjęcie przez różnych autorów niejednorodnych punktów odcięcia, w których preparaty zostały zakwalifikowane jako dodatnie. Stosowano punkty odcięcia od 0 proc. [26], przez 1 proc. [23], 5 proc. [10, 11] do 10 proc. [16, 18, 19].

W badaniach na liniach komórkowych wykazano, że białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jako inhibitor PCNA, blokuje replikację DNA komórki oraz jej proliferację [3, 27]. W pracach dotyczących NDKRP nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a wskaźnikiem proliferacji komórkowej, ocenianym za pomocą występowania białka PCNA [10, 22]. Nie stwierdzono również zależności pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a ilością komórek apoptotycznych [10].

Interesującą korelacją obserwowaną w komórkach NDKRP była zależność pomiędzy białkiem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a akumulacją produktu białkowego protoonkogenu *MDM2* [16]. W chwili obecnej trudno jest ocenić bezpośredni związek pomiędzy funkcjonowaniem białek p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz *mdm2*. Powstawanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [1, 14], podobnie jak i białka *mdm2* [28], ściśle zależy od białka p53. Być może wspólne nagromadzenie się białek p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz *mdm2* jest konsekwencją tego samego procesu – aktywacji genu *P53*. Z drugiej strony możliwe jest, że białka *mdm2* i p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wiążą się ze sobą w sposób niezależny od białka p53 [16, 17]. Ostatnia hipoteza znajduje potwierdzenie w pracy Aikawy i wsp., w której wykazano istnienie związku pomiędzy białkiem *mdm2* i p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, czemu nie towarzyszył związek pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a p53 oraz p53 a *mdm2* [16]. Brak zależności pomiędzy p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a p53 obserwowano również w innych pracach dotyczących NDKRP [10, 11, 15-20, 22, 26].

Kolejną interesującą korelacją w NDKRP jest współwystępowanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 [29]. Stwierdzono ją również w badaniach dotyczących raka pęcherza moczowego [27] oraz nowotworów jelita grubego i odbytnicy [30]. Do tej pory podkreślano jedynie wspólne uczestnictwo białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> oraz cykliny D1 w regulacji procesu fosforylacji białka pRb [1, 14]. Coraz więcej danych sugeruje jednak, że pomiędzy tymi białkami istnieje dodatkowo inny związek. Ustalenie tego związku wydaje się być szczególnie istotne, zwłaszcza że oba białka uczestniczą w regulacji tej samej fazy cyklu komórkowego oraz ze względu na postulowaną ostatnio rolę białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nie tylko jako genu supresorowego, ale również jako protoonkogenu [6].

Dane na temat zależności pomiędzy białkiem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a cechami klinicznymi chorych na NDKRP są rozbieżne. Autorzy analizowali częstość występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w odniesieniu do wieku i płci chorych, stopnia zaawansowania klinicznego choroby, rodzaju histopatologicznego oraz stopnia zróżnicowania guza nowotworowego.

W dostępnym piśmiennictwie nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a wiekiem i płcią chorych na NDKRP [10, 11, 21], w wielu pracach nie przeprowadzono jednak tej analizy [16, 18, 19, 22, 24, 26].

W jednym z badań białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej u chorych z I oraz II stopniem zaawansowania klinicznego choroby w porównaniu z chorymi z stopniem zaawansowania IIIA (40,2 proc. vs 22,5 proc.,  $p=0,048$ ) [11]. W innym badaniu uzyskano przeciwne wyniki, ponieważ białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej w u chorych z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby [16]. W kolejnych pracach nie wykazano związku pomiędzy nagromadzeniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu [10, 21, 22, 24, 26].

W pracy Aikawy i wsp. białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej w gruczolakorakach niż raku płaskonabłonkowym [16]. Autorzy tej pracy ocenili występowanie białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> u chorych z różnymi stopniami zaawansowania klinicznego, a obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> stwierdzili w 38 proc. gruczolakoraków w porównaniu do 15 proc. raków płaskonabłonkowych ( $p<0,01$ ) [16]. W innych badaniach nie potwierdzono związku pomiędzy występowaniem białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a rodzajem histopatologicznym guza nowotworowego [10, 11, 21, 22, 24, 26].

Kolejną zależnością ocenianą przez autorów była korelacja pomiędzy ekspresją białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a stopniem zróżnicowania guza nowotworowego. W jednej z prac wykazano, że białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> występowało częściej w guzach o wyższym stopniu zróżnicowania komórek nowotworowych [26], podczas gdy w innych badaniach obecność białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> stwierdzana była częściej w guzach o niskim stopniu zróżnicowania [22, 24]. W kolejnych pracach nie wykazano związku pomiędzy występowaniem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a stopniem zróżnicowania guza nowotworowego [10, 21].

W piśmiennictwie światowym istnieje wiele prac dotyczących obecności białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach NDKRP [10, 11, 15–26], natomiast zaledwie kilka z nich dotyczy rokowniczego znaczenia tego parametru [10, 11, 21, 24–26]. Wyniki tych prac są rozbieżne. Część autorów sugeruje brak rokowniczego znaczenia ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w NDKRP [11, 16, 26], jakkolwiek inni uważają, że obecność p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wiąże się z lepszym rokowaniem w tym nowotworze [10, 24, 25]. Lepsze rokowanie obserwowano również w podgrupie chorych z fenotypem p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+/p53, w porównaniu do grupy o fenotypie p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-/p53+ [10]. W innych pracach dotyczących NDKRP, nie stwierdzono wpływu na przeżycie żadnego ze złożonych fenotypów p21<sup>WAF1/CIP1</sup> /p53 [11, 24, 26].

W największym badaniu dotyczącym występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> przeprowadzonym w NDKRP wykazano, że jego obecność wiąże się z lepszym rokowaniem ( $n=233$ ,  $p=0,006$ ). Związek ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z przeżyciem chorych potwierdzono również w analizie wieloczynnikowej [10]. W badaniu tym, po podziale chorych na podgrupy w zależności od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego, lepsze rokowanie obserwowano tylko w stopniu IA ( $n=64$ ,  $p=0,007$ ) oraz w II ( $n=26$ ,  $p=0,038$ ) w przeciwieństwie do stopnia IB ( $n=71$ ,  $p=0,440$ ) oraz IIIA ( $n=72$ ,  $p=0,972$ ) [10]. Badania naszego zespołu, po podziale chorych na podobne podgrupy, nie potwierdziły tych obserwacji [21]. W ostatniej pracy badana grupa była prawie dwu-

krotnie mniejsza niż w badaniu Shoji i wsp. (109 vs 233). Składała się z chorych w I, II i IIIA stopniu zaawansowania klinicznego odpowiednio w 44 proc., 15 proc. i 41 proc. chorych [21], podczas gdy w badaniu Shoji i wsp., I, II i IIIA stopień zaawansowania klinicznego występował odpowiednio w 58 proc., 11 proc. i 31 proc. przypadków [10]. W badaniu Shoji i wsp. prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia dla całej grupy wynosiło 68 proc., podczas gdy w naszym badaniu wynosiło zaledwie 42 proc. [21].

Podsumowując powyższe rozważania wydaje się, że ocena klinicznego znaczenia oraz wartości rokowniczej występowania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w NDKRP wymaga dalszych badań, ponieważ gen *WAF1/CIP1* z jednej strony pełni funkcję genu supresorowego, z drugiej zaś może uczestniczyć w aktywacji onkogenezy [6].

#### Piśmiennictwo

1. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE i wsp. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
2. Dotto GP. p21 (WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000; 1471: M43-56.
3. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; 371: 534-7.
4. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995; 9: 935-44.
5. Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 1996; 10: 1945-52.
6. Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179: 1-14.
7. Papandreou CN, Bogenrieder T, Loganzo F, Albino AP, Nanus DM. Expression and sequence analysis of the p21 (WAF1/CIP1) gene in renal cancers. *Urology* 1997; 49: 481-6.
8. Marx J. New link found between p53 and DNA repair. *Science* 1994; 266: 1321-2.
9. Michieli P, Chetid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-5.
10. Shoji T, Tanaka F, Takata T i wsp. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3865-71.
11. Komiya T, Hosono Y, Hirashima T i wsp. p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1831-5.
12. Saitoh G, Sugio K, Ishida T, Sugimachi K. Prognostic significance of p21waf1, cyclin D1 and retinoblastoma expression detected by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 737-43.
13. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3974-86.
14. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM i wsp. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-74.
15. Vonlanthen S, Heighway J, Kappeler A, Altermatt HJ, Borner MM, Betticher DC. p21 is associated with cyclin D1, p16INK4a and pRb expression in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2000; 16: 951-7.

16. Aikawa H, Sato M, Fujimura S i wsp. MDM2 expression is associated with progress of disease and WAF1 expression in resected lung cancer. *Int J Mol Med* 2000; 5: 631-3.
17. Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M i wsp. p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 1996; 12: 1319-24.
18. Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, Oyama T, Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in squamous cell carcinomas of lung. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 285-92.
19. Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, Saito M, Oyama T, Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung. *Pathol Int* 2002; 52: 103-9.
20. Takeshima Y, Yamasaki M, Nishisaka T, Kitaguchi S, Inai K. p21WAF1/CIP1 expression in primary lung adenocarcinomas: heterogeneous expression in tumor tissues and correlation with p53 expression and proliferative activities. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1755-61.
21. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J i wsp. Absence of prognostic significance of p21 (WAF1/CIP1) protein expression in non-small cell lung cancer. *Acta Oncol* 2005; 44: 75-9.
22. Groeger AM, Caputi M, Esposito V i wsp. Expression of p21 in non small cell lung cancer relationship with PCNA. *Anticancer Res* 2000; 20: 3301-5.
23. Akita K, Inagaki H, Sato S i wsp. p185 (HER-2/neu) and p21 (CIP1/WAF1) expression in primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1007-11.
24. Caputi M, Esposito V, Baldi A, De Luca A, Dean C, Signoriello G, Baldi F, Giordano A. p21waf1/cip1mda-6 expression in non-small-cell lung cancer: relationship to survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 213-7.
25. Esposito V, Baldi A, Tonini G i wsp. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 58-63.
26. Bennett WP, el-Deiry WS, Rush WL i wsp. p21waf1/cip1 and transforming growth factor beta 1 protein expression correlate with survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1499-506.
27. Liukkonen T, Lipponen P, Raitanen M, Kaasinen E, Ala-Opas M, Rajala P, Kosma VM. Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. *Fin-bladder Group. Urol Res* 2000; 28: 285-92.
28. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; 7: 1126-32.
29. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16 (INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999; 188: 351-60.
30. Holland TA, Elder J, McCloud JM, Hall C, Deakin M, Fryer AA, Elder JB, Hoban PR. Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21 (WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival. *Int J Cancer* 2001; 95: 302-6.

#### Adres do korespondencji

dr med. **Dorota Dworakowska**  
Klinika Chorób Wewnętrznych,  
Endokrynologii i Zaburzeń Hemostazy  
Akademia Medyczna  
ul. Dębinki 7  
80-211 Gdańsk  
tel. +48 58 349 28 42  
faks +48 58 349 29 41  
e-mail: [ddw@amg.gda.pl](mailto:ddw@amg.gda.pl)