

Gen kodujący supresorowe białko p53 jest najczęściej uszkodzonym genem w ludzkich komórkach nowotworowych. U 30 do 40 proc. osób ze zmutowanym genem p53 obserwuje się występowanie surowicznych przeciwciał przeciwko białku p53, należących najczęściej do podklas IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>. Kluczową rolę w rozwoju odpowiedzi humoralnej skierowanej przeciwko białku p53 przypisuje się wydłużonemu czasowi półtrwania zmutowanego p53 i idącej za tym akumulacji białka w komórce. Do chwili obecnej nie udało się zdefiniować przyczyn odpowiedzialnych za występowanie Ab anty-p53 tylko u części osób z mutacją w genie p53; wykluczono jedynie rodzaj mutacji jako przyczynę różnic w rozwoju odpowiedzi humoralnej na białko p53.

Przeciwciała anty-p53 występują niezmiernie rzadko w populacji osób zdrowych (z częstością poniżej 0,5 proc.) i są uważane za marker nowotworowy. Wielu autorów podejmuje próby wykorzystania oznaczania Ab anty-p53 jako parametru rokowniczego. Związek występowania Ab anty-p53 z gorszym rokowaniem stwierdzono m.in. w przypadku raka przełyku, jelita grubego i żołądka.

Na przykładzie badań osób z grup wysokiego ryzyka stwierdzono, że przeciwciała przeciwko białku p53 w przypadku niektórych nowotworów (m.in. raka płuc, piersi, wątroby i prostaty) mogą pojawiać się w surowicy co najmniej na kilka miesięcy przed rozwojem klinicznych symptomów choroby nowotworowej i jej diagnozy. Oznaczanie przeciwciał przeciwko białku p53, skojarzone z badaniem innych wczesnych markerów nowotworowych, w tym również innych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom związanym z nowotworami, jest obiecującą drogą prowadzącą do wczesnego wykrywania nowotworów i poprawy wyników leczenia.

**Słowa kluczowe:** surowicze przeciwciała przeciwko białku p53, diagnostyka nowotworów, odpowiedź humoralna na antygeny nowotworowe.

# Przeciwciała przeciwko białku p53 (Ab anty-p53)

*Antibodies against p53 protein (anti-p53 Ab)*

Zuzanna Dobrzańska-Paprocka, Jacek Bigda

Zakład Biologii Komórki, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG

Jądrowa fosfoproteina p53, kodowana przez jeden z najważniejszych znanych genów supresorowych nowotworów, uczestniczy w reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Mutacje w genie p53 notuje się w większości ludzkich nowotworów. Badania z przełomu lat 70. i 80., przeprowadzone na zwierzęcych modelach nowotworowych, wskazywały na istnienie humoralnej odpowiedzi na białko p53 [1–3]. W roku 1982 opisano po raz pierwszy obecność przeciwciał przeciwko ludzkiemu białku p53 (Ab anty-p53), występujących u 9 proc. chorych na raka sutka [4]. Kolejna praca dotycząca tego zjawiska pojawiła się w roku 1987 i donosiła o przeciwciałach przeciwko p53, występujących w surowicach u dzieci z różnymi postaciami nowotworów [5]. W badaniach tych nie poszukiwano związku między występowaniem Ab anty-p53 a klinicznymi cechami nowotworu; nie stały się one również przedmiotem szerszego zainteresowania. Dopiero odkrycie faktu, iż mutacje w genie p53 prowadzą do gromadzenia białka p53 w komórce i są najczęściej obserwowanym uszkodzeniem DNA we wszystkich rodzajach ludzkich nowotworów, rzuciło nowe światło na wcześniejsze obserwacje, dotyczące występowania przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicach chorych z nowotworami i stało się przesłanką do podjęcia dalszych badań.

Do tej pory występowanie Ab anty-p53 zostało przeanalizowane w wielu typach ludzkich nowotworów. W początkowych badaniach, przy niewielkiej liczbie prób, stosowano techniki immunoprecypitacji bądź Western-blottingu. Analiza dużych serii prób stała się możliwa dzięki rozwojowi technik ELISA. W pracy obejmującej ponad 1 000 prób, Lubin i wsp. wykazali, iż Ab anty-p53 występują w surowicach osób zdrowych niezmiernie rzadko, bo z częstością poniżej 0,5 proc. oraz, że ich obecność u pacjentów z nowotworami koreluje dodatnio z częstością występowania mutacji w genie p53 [6]. Przeciwciała anty-p53 występują u około 30 do 40 proc. osób ze zmutowanym genem p53 [6]. W komórkach nowotworowych większości pacjentów z Ab anty-p53 obserwuje się akumulację białka p53 [7, 8]. Początkowo brak odpowiedzi humoralnej na uszkodzone białko p53 próbowano tłumaczyć zależnością tego zjawiska od rodzaju mutacji [9]. Dalsze badania, w których wykazano, że podobne mutacje mogą powodować różną odpowiedź humoralną, wskazywały na konieczność weryfikacji tej hipotezy oraz na potencjalny wpływ innych, poza mutacjami, czynników, jak chociażby specyficzna dla każdego pacjenta kombinacja genów MHC klasy I i II [7, 8, 10, 11].

W badaniach z użyciem fragmentów białka p53 i syntetycznych peptydów udowodniono, że prze-

*The gene coding p53 tumor suppressor protein is the most often damaged gene in human cancer cells. Serum antibodies against p53 protein are observed in 30 to 40% of patients with mutated p53 gene. The antibodies belong most frequently to IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> subclasses. The crucial role in the development of the anti-p53 humoral response is attributed to a prolonged half life of altered p53 protein and cellular accumulation of that protein. There are no well defined reasons why the major group of patients with damaged p53 gene does not produce antibodies against p53 protein. Anti-p53 Ab are hardly ever present in healthy controls (frequency below 0.5%) and are considered to be a tumor marker. In the case of some cancer types the presence of serum antibodies against p53 protein can be a negative prognostic factor. Furthermore, studies on populations at high risk of cancer demonstrated the appearance of antibodies against p53 protein several months before the clinical diagnosis of cancer. Determination of anti-p53 Ab and panel of other antibodies against tumor associated antigens in the patient's serum is a promising way to early cancer detection and improvement of treatment results.*

*Key words: serum antibodies against p53 protein, cancer diagnostics, humoral response directed to tumor associated antigens*

ciwcała przeciwko białku p53 wią-  
żą się z końcem aminowym (za-  
wierającym domeny odpowiedzial-  
ne za interakcję z innymi białkami,  
jak mdm2 czy TBP) lub karboksyl-  
owym białka (z domeną odpowie-  
działną za oligomeryzację p53),  
a więc z regionami, w których nie  
występują mutacje [6, 12].

Fakt ten znajduje potwierdzenie  
w obserwacji, iż Ab anti-p53 po-  
równywalnie rozpoznają zarówno  
białko natywne, jak i zmutowane  
[12, 13]. Podobną lokalizację epito-  
pów zaobserwowano podczas im-  
munizacji myszy i królików ludzkim  
białkiem p53 [14]. Tak więc akumu-  
lacja białka p53 może być głównym  
czynnikiem odpowiedzialnym za  
rozwiniecie humoralnej odpowiedzi  
przeciwko białku p53 u chorych na  
nowotwory. Wydaje się, że toleran-  
cja immunologiczna na endogenne  
białko p53 jest bardzo niska (biał-  
ko p53 w normalnych warunkach  
występuje w bardzo małych ilo-  
ściach). Przeciwciała anti-p53  
obecne w surowicach chorych na-  
leżą głównie do podklas IgG<sub>1</sub>  
i IgG<sub>2</sub>, choć u niektórych pacjen-  
tów dominują immunoglobuliny kla-  
sy IgA. U niektórych osób wykry-  
wano również przeciwciała klasy  
IgM, choć nigdy nie stanowiły one  
jedynego izotypu. Wśród Ab anti-  
p53 nie znaleziono natomiast prze-  
ciwciał podklasy IgG<sub>3</sub> i IgG<sub>4</sub> [6].

W trakcie badań nad występo-  
waniem Ab anti-p53 w surowicach  
osób ze schorzeniami nowotworo-  
wymi podejmowano próby wykorzy-  
stania tego parametru do celów ro-  
kowniczych. W raku sutka obec-  
ność przeciwciał przeciwko białku  
p53 nie tylko wiąże się z prawdop-  
odobieństwem krótszego przeży-  
cia chorych, ale i koreluje z innymi  
niekorzystnymi czynnikami prog-  
nostycznymi, jak brak receptorów  
estrogenowych [15]. Współzależ-  
ność występowania Ab anti-p53  
z gorszym rokowaniem stwierdzo-  
no również, m.in. w nowotworach  
przełyku [16], jelita grubego [17],  
głowy i szyi [18] oraz żołądka [19].  
Istnieje również wiele prac, w któ-

rych nie zanotowano rokowniczej  
wartości oznaczania Ab anti-p53,  
jak też korelacji między obecnością  
tych przeciwciał a innymi paramet-  
rami klinicznymi [20-22].

W chwili obecnej dwie dziedzi-  
ny: wczesna diagnostyka nowotwo-  
rowa i monitorowanie przebiegu le-  
czenia wydają się być najbardziej  
obiecującymi zastosowaniami ozna-  
czania przeciwciał przeciwko biał-  
ku p53 w onkologii.

Mimo pojawiających się w nie-  
których pracach sugestii co do  
braku absolutnej specyficzności  
występowania Ab anti-p53 u pa-  
cjentów chorych na nowotwory, za-  
równo uważny przegląd dostępnej  
literatury, jak i wyniki najnowszych  
badań, rozwiewają te wątpliwości  
[23, 24]. W bieżącym roku grupa  
japońskich badaczy opracowała  
test ELISA, o bardzo wysokiej czu-  
łości oraz specyficzności i użyła  
go do przebadania ponad 1 000  
pacjentów z różnymi postaciami  
nowotworów. Pozytywny wynik uzy-  
skano w blisko 20 proc. przypad-  
ków, potwierdzając tym samym  
przydatność oznaczeń Ab anti-p53  
w diagnostyce nowotworowej [23].

Analiza obecności Ab anti-p53,  
będących wyrazem uszkodzeń ge-  
nu p53, a więc częstego i wcze-  
snego wydarzenia w kaskadzie  
zmian prowadzących do powstania  
nowotworu, wydaje się być również  
obiecującym narzędziem diagno-  
stycznym. Modelową grupą wyso-  
kiego ryzyka w próbach wykorzy-  
stania oznaczeń Ab-anty p53 do  
wczesnego wykrywania zmian no-  
wotworowych, są palacze tytoniu.  
Lubin i wsp. opisali 2 przypadki  
wykrycia Ab anti-p53 u osób pał-  
ących, u których w 5 i 15 mies. od  
ujawnienia obecności Ab anti-p53  
rozwinął się nowotwór złośliwy płuc  
[25]. W retrospektywnym badaniu  
grupy osób palących z przewlekłą  
obturacyjną chorobą płuc opisano  
również występowanie surowicznych  
Ab anti-p53 na 5 (w przypadku ra-  
ka sutka) 6 i 7 (w przypadku raka  
płuca) oraz 11 mies. (w przypadku  
raka prostaty) przed zdiagnozowa-

niem raka [26]. Trivers i wsp. badając grupę osób zawodowo narażonych na kontakt z chlorkiem winylu wykazali, że obecność przeciwciał przeciwko białku p53 jest wczesnym markerem naczyniakomięsaka wątroby [27]. Wykazano również, że przeciwciała mogą pojawiać się jeszcze przed objawami klinicznymi nowotworu w przypadku osób z przelykiem Barretta [28].

Do chwili obecnej zidentyfikowano wiele białek będących antygenami nowotworowymi, zdolnymi do indukcji odpowiedzi humoralnej i stanowiących potencjalnie obiecujący obiekt diagnostyczny [29]. Jednym z takich antygenów jest surwiwina (ang. *survivin*). Cząsteczka ta jest białkiem występującym preferencyjnie w zmienionych nowotworowo tkankach, zdolnym do bezpośredniego hamowania aktywności kaspaz. Przeciwciała przeciwko temu białku są obecne w surowicy pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi częściej, niż ma to miejsce w przypadku białka p53, a jednocześnie nie są wykrywane w populacji osób zdrowych [30]. Problemem pojawiającym się podczas oceny przydatności oznaczania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom nowotworowym w diagnostyce nowotworowej jest fakt, iż przy rozpatrywaniu odpowiedzi na pojedyncze antygeny, odsetek chorych, u których stwierdza się występowanie przeciwciał rzadko przekracza 20 proc. Jeśli jednak stosuje się badanie panelu autoprzeciwciał, odsetek ten można zwiększyć ponaddwukrotnie. W bieżącym roku Zhang i wsp. opublikowali badania, przeprowadzone na grupie ponad 500 chorych z różnymi postaciami nowotworów, w których analizowali obecność surowicznych przeciwciał przeciwko 7 antygenom nowotworowym: c-myc, p53, cyklinie B1, p62, Koc, IMP1 i surwiwinie. W tym kompleksowym badaniu odsetek osób z wykrywalnymi przeciwciałami stanowił 44–68 proc. Dodatkowo uzyskano też informacje na te-

mat różnic w profilu odpowiedzi humoralnej na antygeny nowotworowe pomiędzy poszczególnymi rodzajami nowotworów, co mogłoby sugerować nawet możliwość różnicowania między typami nowotworów [31]. Wydaje się więc, że wczesne testy przesiewowe w kierunku nowotworów, oparte na analizie surowicznych przeciwciał przeciwko antygenom nowotworowym, będą musiały być konstruowane z myślą o badaniu osób z grup wysokiego ryzyka, pod kątem wystąpienia konkretnych typów nowotworów [32]. W swojej pracy La Naour i wsp. zaproponowali taki właśnie zestaw przeciwciał przydatnych do monitorowania osób z grupy wysokiego ryzyka zachorowania na raka wątroby, obejmujący przeciwciała przeciwko kalretikulinie, cytokeratynie 8, kinazie A difosforanów nukleozydów oraz podjednostce beta syntazy F<sub>1</sub>-ATP [33]. Poziom przeciwciał przeciwko białku p53 może być również wykorzystany do monitorowania chorego podczas terapii: opisano ponowne pojawienie się Ab anty-p53 w surowicy poprzedzające nawrót raka sutka [15].

Precyzyjna odpowiedź na pytanie o związek mutacji w genie p53, akumulacji produktu genu p53 i istnienia humoralnej odpowiedzi skierowanej przeciwko białku p53, pozostaje więc wciąż kwestią przyszłości, podobnie jak zastosowanie na szeroką skalę analizy występowania Ab anty-p53 jako narzędzia diagnostycznego, a szczególnie wykorzystanie tego parametru w rutynowych badaniach przesiewowych w kierunku chorób nowotworowych. Wszystko wskazuje jednak na to, że badanie obecności Ab anty-p53 może stać się przydatną procedurą w nowoczesnej diagnostyce, zajmującej się wczesnym wykrywaniem schorzeń nowotworowych. Rozwój diagnostyki nowotworów, oparty m.in. na opracowaniu kompleksowych testów służących do wykrywania odpowiedzi humoralnej na zestaw antygenów zwią-

zanych z nowotworami może być jedną ze skutecznych dróg prowadzących do poprawy wyników leczenia nowotworów.

## PIŚMIENNICTWO

1. De Leo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 2420-4.
2. Kress M, May E, Cassingena R, May P. *Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum*. J Virol 1979; 31: 472-83.
3. Rotter V, Witte ON, Coffman R, Baltimore D. *Abelson murine leukemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, P50*. J Virol 1980; 36: 547-55.
4. 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.
5. Caron de Fromentel C, May-Levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. *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.
6. Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild CP. *p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification, and characterization*. Clin Cancer Res 1995; 1: 1463-9.
7. Wild CP, Ridanpaa M, Anttila S, Lubin R, Soussi T, Husgafvel-Pursiainen K, Vainio H. *p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue*. Int J Cancer 1995; 64: 176-81.
8. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. *Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation*. Cancer Res 1992; 52: 4168-74.
9. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. *Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 3439-42.
10. Guinee DG Jr, Travis WD, Trivers GE, et al. *Gender comparisons in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and C-erbB-2*

- expression. *Carcinogenesis* 1995; 16: 993-1002.
11. Preudhomme C, Lubin R, Lepelley P, Vanrumbeke M, Fenaux P. *Detection of serum anti p53 antibodies and their correlation with p53 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia*. *Leukemia* 1994; 8: 1589-91.
  12. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, Gaillard C, Marty M, Lane D, Calvo F, Soussi T. *The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot*. *Cancer Res* 1992; 52: 6380-4.
  13. Labrecque S, Naor N, Thomson D, Matlashewski G. *Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients*. *Cancer Res* 1993; 53: 3468-71.
  14. Legros Y, Lafon C, Soussi T. *Linear antigenic sites defined by the B-cell response to human p53 are localized predominantly in the amino and carboxy-termini of the protein*. *Oncogene* 1994; 9: 2071-6.
  15. Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. *Prognostic significance of circulating P53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer*. *Lancet* 1995; 345: 621-2.
  16. Bergqvist AS, Bergqvist M, Brattstrom D, Hesselius P, Larsson A, Brodin O, Wagenius G. *Serum p53 autoantibodies as prognostic marker in patients with oesophageal carcinoma*. *Anticancer Res* 2001; 21: 4141-5.
  17. Houbiers JGA, Vanderburg SH, Vandewatering LMG, Tollenaar RAEM, Brand A, Vandeveld C, Melief CJM. *Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer*. *Br J Cancer* 1995; 72: 637-41.
  18. Werner JA, Gottschlich S, Folz BJ, Goeroegh T, Lippert BM, Maass JD, Rudert H. *p53 serum antibodies as prognostic indicator in head and neck cancer*. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44: 112-6.
  19. Wurl P, Weigmann F, Meye A, et al. *Detection of p53 autoantibodies in sera of gastric cancer patients and their prognostic relevance*. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1147-51.
  20. Skrzypski M, Szymanowska A, Janowicz A, et al. *Serum anti-P53 antibodies (AB-anti-P53) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Pneumonol Alergol Pol* 2002; 70: 353-8.
  21. Jassem E, Bigda J, Dziadziuszko R, Schlichtholz B i wsp. *Serum p53 antibodies in small cell lung cancer: the lack of prognostic relevance*. *Lung Cancer* 2001; 31: 17-23.
  22. Abendstein B, Marth C, Muller-Holzner E, Widschwendter M, Daxenbichler G, Zeimet AG. *Clinical significance of serum and ascitic p53 autoantibodies in epithelial ovarian carcinoma*. *Cancer*. 2000; 88: 1432-7.
  23. Shimada H, Ochiai T, Nomura F. *Titration of serum p53 antibodies in 1,085 patients with various types of malignant tumors: a multiinstitutional analysis by the Japan p53 Antibody Research Group*. *Cancer* 2003; 97: 682-9.
  24. Soussi T. *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. *Cancer Res* 2000; 60: 1777-88.
  25. Lubin R, Zalzman G, Bouchet L, Trédaniel J, Legros Y, Cazals D, Hirsh A, Soussi T. *Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer*. *Nature Med* 1995; 1: 701-2.
  26. Trivers GE, De Benedetti VMG, Cawley HL i wsp. *Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer*. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1767-75.
  27. Trivers GE, Cawley HL, De Benedetti VMG, et al. *Anti-p53 antibodies in sera of workers occupationally exposed to vinyl chloride*. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1400-7.
  28. Cawley HM, Meltzer SJ, De Benedetti, et al. *Anti-p53 antibodies in patients with Barrett's esophagus or esophageal carcinoma can predate cancer diagnosis*. *Gastroenterology* 1998; 115: 19-27.
  29. Tan EM. *Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis*. *J Clin Invest* 2001; 108: 1411-5.
  30. Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP. *Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients*. *Cancer Res* 2000; 60: 1815-7.
  31. Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM. *Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 136-43.
  32. Naour FL, Brichory F, Beretta L, Hanash SM. *Identification of tumor-associated antigens using proteomics*. *Technol Cancer Res Treat*. 2002; 1: 257-62.
  33. Naour FL, Brichory F, Misk DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. *A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis*. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**

dr hab. **Jacek Bigda**  
 prof. nadzw. AMG  
 Zakład Biologii Komórki  
 Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
 UG-AMG  
 ul. Dębinki 1  
 80-211 Gdańsk  
 tel. 0 prefiks 58 349 14 34  
 lub 0 prefiks 58 349 14 38  
 faks 0 prefiks 58 349 14 45  
 e-mail: jbigd@amg.gda.pl