

Mutacje dziedziczne genu p53 są rzadkie. Na całym świecie stwierdzono ok. 250 takich mutacji. Są one silnie związane z zespołem Li-Fraumeni oraz Li-Fraumeni-podobnym. Występują również w tzw. zespole wielonowotworowym. Celem pracy było stwierdzenie częstości występowania mutacji genu p53 u osób z rodzinną historią wielonowotworową w populacji polskiej. DNA do badań izolowano z krwi pacjentów. Gen analizowano za pomocą metody PCR-SSCP. Użyto 7 par starterów, które obejmowały eksony 2–11. Próby o odmiennym migracji poddawano sekwencjonowaniu. W jednym preparacie znaleziono mutację w eksonie 11 genu p53. Mutacja została zidentyfikowana, jako insercja adenozyny w kodonie 385. Powoduje ona zmianę ramki odczytu, co skutkuje zmianą aminokwasów 385–389 w białku, a także pojawieniem się kodonu STOP w kodonie 390. W wyniku takiej zmiany białko p53 składa się z 389 aminokwasów i jest krótsze od formy prawidłowej o 3 aminokwasy. Mutacja zidentyfikowana u jednej osoby w badanej grupie 38 osób, określa częstość występowania mutacji na 2,6 proc. Stwierdzona mutacja nie figuruje w bazie mutacji p53 IARC. Dotychczas nie znaleziono żadnej mutacji w 11. eksonie genu. Na podstawie historii choroby probantki i jej historii rodzinnej, możemy stwierdzić, iż mutacja ta nie przejawia fenotypu o zwiększonej częstości występowania nowotworów.

Słowa kluczowe: p53, zespół wielonowotworowy, mutacje.

Nowa mutacja zarodkowa w genie p53

A novel germ-line mutation in p53 gene

Wojciech Roesler, Anna Przybyła, Andrzej Mackiewicz, Katarzyna Lamperska

Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań; Katedra Biotechnologii Medycznej, Akademia Medyczna, Poznań

Wstęp

Ludzki gen p53 jest umiejscowiony na krótkim ramieniu chromosomu 17. Zawiera 11 eksonów, z których pierwszy nie koduje sekwencji białka. Białko p53 zbudowane jest z 393 aminokwasów. 98 proc. z dotychczas wykrytych mutacji znajduje się pomiędzy eksonami 5. a 8. i są one zlokalizowane w czterech ewolucyjnie konserwatywnych domenach p53 [1]. Somatyczne mutacje w tym genie są często wykrywane w nowotworach sporadycznych, częstość tych zmian waha się od 10 do 60 proc. przypadków i zależy od typu nowotworu oraz badanej populacji. W genie p53 stwierdzono również mutacje o charakterze dziedzicznym, z których większość jest związana z zespołem Li-Fraumeni (LFS) lub z zespołem Li-Fraumeni-podobnym (LFS-L). Do 2003 r. [2] stwierdzono niezależnie prawie 250 mutacji, które zostały zebrane w bazie mutacji IARC (*International Agency for Research on Cancer*). W czerwcu 2005 r. baza ta została uaktualniona o kolejne 33 mutacje. Najwyższe sprzężenie pomiędzy mutacjami linii zarodkowej TP53 występuje w przypadkach nowotworu kory nadnerczy u dzieci (*adrenocortical carcinoma* ADCC). Spośród osób, u których stwierdzono ADCC ponad 80 proc. miało mutację zarodkową genu p53.

W 1969 r. Frederick Li i Joseph Fraumeni podczas badań przesiewowych zidentyfikowali 4 rodziny, u których stwierdzono uderzająco podobną historię raka piersi oraz innych rodzajów nowotworów [3]. Dalsze badania potwierdziły wysokie ryzyko zachorowania na nowotwory członków rodzin, w których występują typy nowotworów spełniające kryteria LFS [4]. Badania różnych populacji potwierdziły istnienie *nowego* zespołu [5, 6]. Przekrój nowotworów obejmował mięsaka mięśni poprzecznie prążkowanych, raka piersi, nowotwory tkanek miękkich, nowotwory mózgu i kości, białaczkę oraz raka kory nadnerczy. Aby można było zdiagnozować LFS, muszą być spełnione 3 podstawowe kryteria:

- nowotwór rozpoznany poniżej 45. roku życia,
- krewny I stopnia z nowotworem zdiagnozowanym poniżej 45. roku życia,
- kolejny krewny I lub II stopnia z jakimkolwiek guzem rozpoznany poniżej 45. roku życia lub nowotworem zdiagnozowanym w dowolnym wieku.

Wyniki, które opublikowano w 1994 r., oparto na analizie 5 rodzin z LFS [7]. Ryzyko wystąpienia jakiegokolwiek nowotworu w wieku od 0 do 16 lat wynosiło 42 proc., w wieku od 17 do 45 lat wynosiło 38 proc., natomiast po 45. roku życia 63 proc. Prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór przez całe życie pacjenta wyliczono na 85 proc. Mutacje TP53 w LFS są w większości mutacjami zmiany sensu (ok. 75 proc.). Rozrzucone są one w obrębie sekwencji kodującej genu, w tym 30 proc. mutacji obejmuje 8 kodonów *hot-spot*: 175, 176, 220, 245, 248, 249, 273 i 282.

Celem badań była analiza mutacji genu p53 u osób z wielonowotworową historią rodzinną.

Germline mutations of p53 gene are rare, worldwide there are reported about 283 of such changes. They are strongly connected with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni Like syndromes. They also may appear in multicancer syndrome. The aim of this study was to establish frequency of p53 mutations in multicancer families in polish population. DNA was extracted from patient's peripheral blood samples. Mutations were analyzed employing the PCR-SSCP method with 7 pairs of radioactive primers, which covered exons 2-11. DNA fragments showing a different migration pattern were sequenced. In one case we found a change in exon 11 of p53 gene. A mutation was identified as adenosine insertion in codon 385 which caused an alteration of amino acids from 385 to 389. The STOP codon appeared in position 390 causing shorter p53 protein. This mutation was found in one of 38 cases and frequency of this mutation was establish on 2.6%. Insertion A in codon 385 did not appear in p53 mutational database IARC. Moreover, no mutations in exon 11 were reported in this database. Based on the family interview with the carrier we concluded that insertion A in exon 11 was not involved in cancer phenotype.

Key words: p53, multicancer syndrom, mutation.

Materiał i metody

38 pacjentów do badań kwalifikowano na podstawie wywiadu rodzinnego. Na podstawie analizowanych ankiet badane osoby podzielono na odpowiednie grupy:

- BR-OV – dziedziczny zespół nowotworów piersi i jajników – 10 osób,
- HNPCC – dziedziczny zespół niepolipowych nowotworów jelita grubego – 1 osoba,
- LFL – zespół Li-Fraumeni-podobny – 1 osoba,
- FAC – zespół wielonowotworowy – 21 osób.

Pięcioro pacjentów nie kwalifikowało się do żadnej z ww. grup.

DNA izolowano z krwi obwodowej badanych z użyciem rutynowo stosowanych w Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów zestawów do izolacji DNA. Do analizy genu wykorzystano metodę PCR-SSCP z zastosowaniem 7 par radioaktywnie znakowanych na 5' końcu starterów, które obejmowały cały odcinek kodujący (eksyony od 2–11). Powstałe produkty reakcji poddawane były elektroforezie w 6-proc. żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 10 proc. glicerolu w warunkach niedenaturujących. Elektroforezę prowadzono przez noc w polu elektrycznym o napięciu 0,25 mV. Następnie żel przenoszono na bibułę typu Whatman 3MM, suszono i poddawano autoradiografii. Pasma wykazujące inną w stosunku do pozostałych migrację w żelu zostały wyekstrahowane, poddane reamplifikacji i sekwencjonowane z radioaktywnie znakowanym starterem. Produkty sekwencjonowania analizowano w 6-proc. żelu poliakryloamidowym, zawierającym 7,5M mocznik. Elektroforezę prowadzono przy natężeniu prądu 42 mA przez 2 godz. Po zakończeniu elektroforezy żel przenoszono na bibułę, suszono i poddawano autoradiografii. Po 24 godz. wywoływano kliszę i odczytywano sekwencję nukleotydów.

Wyniki

W 4 preparatach genomowego DNA zaobserwowano zmiany w szybkości migracji fragmentów. Zmiany wystąpiły we fragmentach A, F oraz G, obejmujących eksyony 2, 3, 10 i 11. Sekwencjonowanie, które przeprowadzono dla fragmentów A i F nie wykazało zmiany sekwencji w porównaniu do sekwencji typu dzikiego.

We fragmencie G stwierdzono mutację w eksonie 11. genu. Mutacja została zidentyfikowana jako insercja adenozyiny w kodonie 385. Powoduje ona zmianę ramki odczytu, co skutkuje zmianą aminokwasów 385-389 w białku, a także pojawieniem się kodonu STOP w kodonie 390. W wyniku takiej zmiany białko p53 składa się z 389 aminokwasów i jest krótsze od formy prawidłowej o 3 aminokwasy. Zmiany w sekwencji mRNA i białka przedstawiono na ryc. 1.

Sekwencja po wprowadzeniu insercji A

382	383	384	385	386	387	388	389	390
CTC	ATG	TTC	AAA	GAC	AGA	AGG	GCC	TGA
L	M	F	K	D	R	R	A	STOP

Prawidłowa sekwencja

382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393
CTC	ATG	TTC	AAG	ACA	GAA	GGG	CCT	GAC	TCA	GAC	TGA
L	M	F	K	T	E	G	P	D	S	D	STOP

Ryc. 1. Porównanie sekwencji z insercją A z sekwencją typu dzikiego
Fig. 1. A comparison between mutated and wild type sequence

Omówienie wyników

Badania genu p53 przeprowadzone w Zakładzie Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii objęły grupę 38 osób. Probandów wybrano ze względu na historię rodzinną. Wśród badanych znalazło się 13 osób chorych i 25 zdrowych. Po analizie ok. 3 tys. dostępnych wywiadów rodzinnych, jedynie 21 osób spełniało kryteria zespołu LFS-L. Nie znaleziono rodzin spełniających klasyczne kryteria zespołu Li-Fraumeni. Wszystkie badane osoby można zaliczyć do grupy średniego ryzyka wystąpienia mutacji genu p53. Mutacja zidentyfikowana u 1 osoby w badanej grupie określa częstość występowania mutacji na 2,6 proc. Podobny wynik uzyskali Evans i wsp. [9], którzy również badali osoby ze średnim ryzykiem wystąpienia mutacji p53 i wykryli mutację genu u jednej z 274 badanych osób, co stanowi częstość wystąpienia mutacji 0,36 proc.

W badaniach przeprowadzonych w grupach wysokiego ryzyka mutacji p53 w populacji polskiej, nie stwierdzono mutacji dziedzicznych [10]. Badanie obejmowało 237 osób (189 dzieci, 48 osób dorosłych) z rodzinną historią wielonowotworową. Badania przeprowadzone w Wielkopolskim Centrum Onkologii wykazały częstość takich zmian na poziomie 2,6 proc. dla grupy osób o średnim ryzyku mutacji. Wyniki te sugerują niską częstość występowania mutacji o charakterze dziedzicznym w populacji polskiej.

Zidentyfikowana insercja nie figuruje w bazie mutacji p53 IARC [11], nie ma tam również innych mutacji znajdujących się w eksonie 11. genu. Większość znanych mutacji p53 to mutacje zmiany sensu (72 proc.), oraz delecje (10 proc.), insercje to tylko 2,7 proc. wszystkich mutacji. Podczas badań stwierdzono, że osoby z mutacjami w genie p53 są predysponowane do guzów mózgu i cewy nerwowej [12] oraz w młodszy wiek, w stosunku do średniej w populacji, występują u nich nowotwory. Stwierdzona mutacja wystąpiła u zdrowej kobiety w wieku 46 lat. W rodzinie pacjentki jest tylko 1 przypadek nowotworu: matka badanej miała raka piersi w 63. roku życia. Nie można stwierdzić czy znaleziona insercja A ma wpływ na prawidłowe funkcjonowanie białka p53, czy ma charakter patogenny.

Podsumowując, z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, iż częstość występowania określonej w naszych badaniach mutacji (insercja A w eksonie 11.) w genie p53 jest porównywalna wynikami analiz przeprowadzonymi dla osób ze średnim ryzykiem wystąpienia mutacji. Insercja A w eksonie 11. jest nową mutacją, nienotowaną wcześniej w bazie mutacji p53 komórek linii zarodkowej IARC. Na podstawie historii osoby z mutacją i jej wywiadu rodzinnego, można wnioskować, iż mutacja ta nie przejawia fenotypu patogennego. Dopiero dalsze badania mogłyby pozwolić na określenie wpływu wykrytej mutacji na metabolizm i funkcję białka p53.

- Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71: 747-52.
- Li FP, Fraumeni JF Jr. Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA* 1982; 247: 2692-4.
- Birch JM, Hartley AL, Marsden HB, Harris M, Swindell R. Excess risk of breast cancer in the mothers of children with soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1984; 49: 325-31.
- Birch JM, Hartley AL, Blair V, Kelsey AM, Harris M, Teare MD, Jones PH. Identification of factors associated with high breast cancer risk in the mothers of children with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1990; 8: 583-90.
- Le Bihan C, Bonaiti-Pellie C. A method for estimating cancer risk in p53 mutation carriers. *Cancer Detect Prev* 1994; 18: 171-8.
- Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63: 6643-50.
- Evans DG, Birch JM, Thorncroft M, McGown G, Lalloo F, Varley JM. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2002; 39: 941-4.
- Fischer-Maliszewska L, Czernik J, Sawicz-Birkowska K, et al. Screening for germline p53 mutations in pediatric and adult patients of high-risk groups in Poland. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48: 309-15.
- <http://www-p53.iarc.fr> – International Agency for Research on Cancer.
- Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63: 6643-50.
- Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, Greenblatt MS. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 1999; 18: 211-8.

Adres do korespondencji

dr **Katarzyna Lamperska**
Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów
Wielkopolskie Centrum Onkologii
Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: kasialam@o2.pl

Piśmiennictwo

- Frebourg T, Friend SH. Cancer risks from germline p53 mutations. *J Clin Invest* 1992; 90: 1637-41.
- Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003; 21: 313-20.