

Analiza ekspresji genów zależnych od p53 w rakach jajnika

Słowa kluczowe: rak jajnika, *TP53* mutacje, p53 akumulacja, ekspresja genów zależnych od p53

WSTĘP: Rak jajnika jest jednym z najczęstszych i najgorzej rokujących nowotworów występujących u kobiet. Stanowi główną przyczynę zgonów z powodu nowotworów ginekologicznych. Według danych GLOBOCAN w 2020 roku w Polsce z powodu raka jajnika zmarło ponad 3 000 pacjentek, a rozpoznano blisko 4 700 nowych przypadków.

Dotychczasowe badania wskazują, iż status zarówno białka p53, jak i genu *TP53* znacząco wpływa na biologię oraz obraz kliniczny raka jajnika. Białko p53 reguluje najistotniejsze procesy zachodzące w komórce poprzez bezpośrednią interakcję z innymi białkami oraz przez regulację transkrypcji genów związanych z ważnymi procesami komórkowymi, w tym regulujących proces naprawy DNA, cykl komórkowy oraz apoptozę. Obecność mutacji w genie *TP53* bądź akumulacja białka p53 może istotnie wpływać na ekspresję zależnych od niego genów, w tym upośledzając procesy, w których biorą udział kodowane przez nie białka. W raku jajnika notuje się jeden z najwyższych odsetków przypadków z mutacjami *TP53*, przy czym w guzach o typie surowiczym sięga on ponad 90%. Spektrum mutacji genu *TP53* w komórkach nowotworowych jest bardzo szerokie, a poszczególne mutacje mogą powodować upośledzenie funkcjonowania białka bądź spowodować nabycie nowej onkogennej funkcji, przyczyniając się do rozwoju nowotworów.

CEL PRACY: Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy statusem genu *TP53* i statusem białka p53 w komórkach raka jajnika. Ponadto zamierzałam ocenić wpływ statusu genu *TP53* i statusu białka p53 w komórkach nowotworowych na poziom transkrypcji zależnych od niego genów. Kolejnym celem było zbadanie znaczenia klinicznego ekspresji wybranych genów oraz próba identyfikacji nowych markerów molekularnych, które potencjalne mogą mieć znaczenie prognostyczne lub/i predykcyjne u pacjentek z rakiem jajnika.

MATERIAŁ: Materiał do badań stanowiło 135 nabłonkowych guzów jajnika, dobrze scharakteryzowanych pod względem histologicznym i klinicznym. W tej grupie mutację w genie *TP53* miało 114 badanych przypadków, a prawidłowa sekwencja genu była obecna w 21 guzach. Akumulacja białka p53, uprzednio oznaczona immunohistochemicznie,

występowała w 86 przypadkach, natomiast brak akumulacji charakteryzował 49 przypadków. W badanej grupie 103 pacjentki leczone były taksanami z pochodnymi platyny, a 32 terapią opartą na pochodnych platyny skojarzonych z cyklofosfamidem.

METODY: W ramach niniejszego projektu wytypowano 31 genów kodujących białka zależne od p53, w tym regulujących proces apoptozy, cykl komórkowy oraz naprawę DNA, ponadto do badania włączono geny uprzednio wytypowane przez zespół Pracowni w badaniach mikromacierzy ekspresyjnych. Materiał genetyczny został wyizolowany ze skrawków mrożonych. Badania molekularne prowadzone na poziomie DNA i RNA zostały poparte analizami statystycznymi. Zastosowane metody obejmowały: izolację DNA i sekwencjonowanie genu *TP53*, izolację RNA oraz odwrotną transkrypcję i ocenę ekspresji genu z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR. W wielowariantowej analizie statystycznej zastosowany został model regresji logistycznej w ocenie wrażliwości na terapię oraz model regresji Cox'a w ocenie czasu przeżycia i czasu wolnego od choroby. W analizie zależności ekspresji badanego genu od statusu p53 były użyte testy Kruskala-Wallisa i Manna-Whitneya.

WYNIKI: Większość (n=76/114; 67%) mutacji obecnych w badanym materiale raków jajnika zaklasyfikowano do zmian typu ZB (zmieniające białko). Do tej grupy, poza substytucjami w pojedynczych nukleotydach (n=74/76; 97%), zaliczono również delecje i insercje, które nie powodowały zmiany ramki odczytu (*in frame*, n=2/76; 3%). Wśród rzadszych (n=38/114; 33%) mutacji typu EB (eliminujące białko) wykryto zmiany, które prowadziły do powstania przedwczesnego kodonu terminującego translację (*nonsense*, n=10/38; 26%, *frameshift*, n=21/38; 55%) oraz mutacje zlokalizowane w miejscu łączenia eksonu z intronem (*splice*, n=7/38; 18%).

W badanej grupie guzów potwierdziłam istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy obecnością mutacji *TP53*, a akumulacją p53 w komórkach ($p < 0,001$). Pośród 114 guzów z mutacją większość wykazywała się akumulacją białka (74%). Stwierdziłam natomiast, że obecność mutacji nie zawsze manifestuje się akumulacją białka p53 w komórkach, co wykazałam w 26% guzów. Wśród 21 guzów z prawidłową sekwencją genu w niemal wszystkich, poza dwoma, białko p53 nie akumulowało się (90%).

Analiza porównawcza statusu genu *TP53* i białka p53 wykazała, że akumulacja p53 w komórkach nowotworowych była związana z obecnością mutacji typu ZB ($p < 0,001$). We wszystkich guzach z mutacją zmiany sensu miała miejsce akumulacja białka (100%). Z kolei w guzach z mutacją typu EB, białko p53 gromadziło się w 21% przypadków.

Analizę spektrum mutacji genu *TP53* wykonano dla 118 zidentyfikowanych zmian. Wyższa liczba mutacji niż guzów, w których je zidentyfikowano, wynika z faktu, iż w 4 przypadkach były po dwie zmiany. Największy odsetek zmian (77%), stanowiły jednonukleotydowe substytucje, wśród których przeważającą część reprezentowały mutacje zmiany sensu (84%). Substytucje typu *nonsense* wykryto w 9 przypadkach (10%). Pozostałe podstawienia były umiejscowione w miejscu łączenia eksonu z intronem (7%). Wśród delecji (14%), większość należała do zmian typu *frameshift* (81%). Dwie delecje (13%) zaklasyfikowano do typu *in frame*, jedna zaś (6%) obejmowała region łączenia eksonu z intronem. Duplikacje stanowiły mniejszość odnalezionych zmian (4%), wszystkie z nich należały do typu *frameshift*. Insercje (3%) obejmowały mutacje powodujące zmianę ramki odczytu (67%) i jedną, gdzie doszło do powstania kodonu terminującego translację (33%). Pośród mutacji złożonych (3%), dwie należały do typu *in frame* (66%), jedna zaś została zaklasyfikowana do typu *frameshift* (33%).

Porównanie spektrum mutacji w poszczególnych eksonach wykazało różnice w częstotliwości występowania zmian w poszczególnych rejonach genu. W przeważającej części nieprawidłowości wykryto w domenie centralnej (85%), wśród nich najczęstsze były mutacje zmieniające białko. Najwyższą liczbą zmian charakteryzował się ekson 5 (33%), natomiast najniższą ekson 6 (17%). Eksony 7 i 8 miały identyczny odsetek mutacji (dla każdego z nich 25%). Prawie 1/3 (28%) spośród wszystkich wykrytych mutacji kumulowała się w siedmiu kodonach: 175, 176, 220, 242, 248, 282 oraz 273. Wszystkie omówione powyżej mutacje, oprócz zmian w kodonie 242 oraz jednego z wariantów w kodonie 176, były jednonukleotydowymi substytucjami.

Wyniki analizy ekspresji, w kontekście statusu genu *TP53* lub białka p53, były istotne statystycznie dla 11 z 31 przebadanych genów. W przypadku genów związanych z cyklem komórkowym, statystycznie istotne różnice w ekspresji zaobserwowałam dla czterech z nich: *CDKN1A*, *KIF23*, *CCNE1*, *PLK1*. Zmiana ekspresji tych genów zależała częściej od statusu mutacji genu *TP53* niż statusu białka p53. Jeden gen – *PLK1*, wykazywał również statystycznie istotną różnicę poziomu mRNA w guzach z akumulacją białka p53. Wśród genów

regulujących proces apoptozy statystycznie istotne różnice w ekspresji stwierdziłam dla sześciu z nich: *TP73*, *TCEA3*, *TP53INP1*, *AIFM2*, *PIDD1*, *BBC3*. We wszystkich przypadkach, poza *BBC3*, niższa ekspresja badanych genów była związana z akumulacją białka p53. W trzech przypadkach *TP73*, *PIDD1*, *BBC3* niższa ekspresja korelowała z mutacją *TP53*. W przypadku genów zaangażowanych w proces naprawy DNA, statystycznie istotne różnice wykryto tylko w jednym z nich – *DDB2*. Obniżony poziom transkryptu związany był zarówno z akumulacją białka jak i mutacją genu *TP53*.

W analizie znaczenia klinicznego ekspresji badanych genów zaobserwowałam, że w przypadku długości okresu całkowitego przeżycia, wyższa ekspresja genów *E2F7* i *AIFM2* w całej badanej grupie pacjentek była negatywnym czynnikiem prognostycznym. Ponadto wyższa ekspresja genu *AIFM2* w podgrupie z mutacją *TP53* wiązała się z krótszym okresem całkowitego przeżycia. Zwiększona ekspresja genów *E2F7*, *AIFM2*, *TCEA3*, *GADD45A* związana była z krótszym czasem wolnym od choroby w całej badanej grupie pacjentek. Wraz ze wzrostem ekspresji genu *CDK2* w podgrupie bez akumulacji p53 wzrasta również ryzyko nawrotu choroby u pacjentek z rakiem jajnika. Wyższy poziom transkryptu genu *AIFM2* i *GADD45A* wiązał się z krótszym czasem wolnym od choroby wśród pacjentek z akumulacją p53. Wyższa ekspresja genów *E2F7*, *AIFM2* korelowała z krótszym DFS w podgrupie z mutacją *TP53*.

WNIOSKI: Niniejsza praca potwierdziła, że nowotwory jajnika charakteryzują się wysoką częstością mutacji w genie *TP53*, a najczęściej obserwowanymi zmianami są mutacje zmieniające białko (ZB), głównie typu *missense*. Ponadto badania potwierdziły, że obecność mutacji ZB koreluje pozytywnie z akumulacją białka p53, natomiast brak akumulacji białka p53 wykazanej metodami immunohistochemicznymi nie wyklucza obecności mutacji w genie *TP53*. Stwierdziłam również, że większość przypadków z obecnością mutacji eliminujących białko (EB) nie wykazują jego akumulacji p53. Ocena ekspresji badanych genów wykazała, że upośledzenie funkcji supresora *TP53* wpływa na poziom mRNA zależnych od niego genów, tym samym modyfikując procesy, w których biorą udział kodowane przez nie białka. Ekspresja genów zaangażowanych w cykl komórkowy była częściej istotnie zależna od statusu genu *TP53*, natomiast w grupie genów apoptotycznych – od akumulacji białka p53. I tak, mutacja genu *TP53* koreluje z obniżeniem ekspresji jednego genu z grupy regulującej cykl komórkowy: *CDKN1A*, trzech genów apoptotycznych: *TP73*, *PIDD1*, *BBC3*, jednego genu

zaangażowanego w proces naprawy DNA: *DDB2* oraz z podwyższeniem ekspresji trzech genów cyklu komórkowego: *KIF23*, *CCNE1* i *PLK1*. Z kolei akumulacja białka p53 jest związana z obniżeniem ekspresji pięciu genów zaangażowanych w proces apoptozy: *TP73*, *TCEA3*, *TP53INP1*, *AIMF2* i *PIDD1*, jednego genu naprawy *DDB2* oraz podwyższeniem ekspresji jednego genu cyklu komórkowego: *PLK1*.

Analiza znaczenia klinicznego ekspresji badanych genów wykazała, że część z nich może być negatywnym czynnikiem prognostycznym. Wyższy poziom ekspresji genu *E2F7*, negatywnego regulatora cyklu komórkowego, koreluje z krótszym czasem całkowitego przeżycia i krótszym czasem wolnym od choroby w całej badanej grupie pacjentek. Zaobserwowałam również, że z wyższą ekspresją genu *E2F7* wiązało się wyższe ryzyko nawrotu choroby wśród chorych z mutacją *TP53*. Wyższy poziom transkryptu genu *AIFM2*, uczestniczącego w procesie apoptozy, w całej badanej grupie pacjentek, a w szczególności wśród tych z mutacją *TP53* w guzie, korelował z krótszym okresem całkowitego przeżycia oraz krótszym czasem wolnym od choroby. Natomiast podwyższona ekspresja *AIFM2* w grupie pacjentek z akumulacją p53 była związana z krótszym czasem wolnym od choroby i wiązała się z większym ryzykiem zgonu. Potencjalne znaczenie prognostyczne statusu genu *AIFM2* wykazałam dla raków jajnika jako pierwsza. Wyższa ekspresja genu *CDK2*, zaangażowanego w regulację cyklu komórkowego, w guzach bez akumulacji p53 związana była z krótszym czasem wolnym od choroby. Podwyższona ekspresja genu *TCEA3*, zaangażowanego w śmierć komórki, w całej badanej grupie pacjentek współgrała z krótszym czasem wolnym od choroby. Wyższa ekspresja genu *GADD45A*, regulującego proces naprawy DNA, korelowała z krótszym czasem wolnym od choroby wśród całej badanej grupy pacjentek, głównie w podgrupie z akumulacją p53.

Uzyskane przeze mnie wyniki wydają się być obiecujące, a zatem po ich weryfikacji na większej grupie przypadków i ewentualnej, pogłębionej analizie w kierunku standaryzacji, mogą w przyszłości przyczynić się do wytypowania nowych, użytecznych klinicznie markerów prognostycznych.