

PA 18535

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET
30.05.2004

UNIVERZITET U BEOGRADU BIOLOŠKI FAKULTET

Ovaj rad je urađena u Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju i radiologiju Srbije (OIRS) a saradnja se odvijala sa Kliničku i eksperimentalnu molekularnu genetiku i gensku inženjeringu Instituta za molekularnu ispitivanja VMI.

Izreko se zahvaljujem Dr. Mirjani Branković-Muglić, VNS, za saradnju u molekularnu genetiku, kako na saradnji i stalnoj stručnoj podršci pri izradi ovog rada, tako i na iskazanim prijateljstvu.

Koautorizacijom projekta "Klinička implikacija molekularne heterogenosti solidnih tumora", u okviru koga je urađeni ovaj rad, Dr. Saša Radulović, N. Sav, zahvaljujem se na zalaganju za dopostavljanje materijalnih uslova za izradu ovog rada, kao i na organizacionoj podršci ostalim istraživačima na OIRS-u.

Svim članovima, prof. dr. Saški Radošević sa Biološkog Fakulteta, zahvaljujem se na pažljivoj saradnji pri izradi ovog rada, kao i na kreativnim sugestijama koje su mi najveće pomoć u savremenom istraživanju. Zahvaljujem doc. dr. Marini Babić sa Biološkog Fakulteta, za saradnju u izradi ovog rada.

Radmila N. Janković

DETEKCIJA MUTACIJA U p53 GENU KOD BOLESNICA SA PRIMARNIM OPERABILNIM KARCINOMOM DOJKE

Doktorska disertacija

VMI, T. Janković, istraživačica u Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju, kao i glavnom istraživačicom u Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju, VMI, Mirjani Branković, zahvaljujem se na saradnji i stalnoj stručnoj podršci pri izradi ovog rada.

Dragom ocu, dr. Stani Radoševiću, doc. dr. OIRS-a, zahvaljujem se na pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

Svim saradnicima Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, zahvaljujem se na pažljivoj podršci.

Beograd, 2004.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ" - БЕОГРАД
И. Бр. 133802

UNIVERSITET F BEOGRAD
FIZIKOSMITHOLOGIJET

Prof. dr. M. Janković

INSTITUT ZA FIZIKU I ASTRONOMIJU
KARLOVAČKA ULICA 41, 11000 BEOGRAD

Beograd, 2014.



Beograd, 2014.

Ovaj rad je uradjen u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u saradnji sa Odeljenjem za kliničku i eksperimentalnu molekularnu genetiku i gensko inženjerstvo Instituta za medicinska istraživanja VMA.

Iskreno se zahvaljujem Dr Mirjani-Branković-Magić, VNS, šefu Laboratorije za molekularnu genetiku kako na nesebičnoj i stalnoj stručnoj pomoći pri izradi ovog rada, tako i na iskazanom prijateljstvu.

Rukovodiocu projekta "Klinička implikacija molekularne heterogenosti solidnih tumora", u okviru koga je uradjen ovaj rad, Dr Siniši Radulović, N Sav, zahvaljujem se na zalaganju za uspostavljanje materijalnih uslova za izradu ovog rada, kao i na permanentnoj podršci mladim istraživačima na IORS-u.

Svom mentoru, prof. dr Stanki Romac sa Biološkog fakulteta, zahvaljujem se na pruženoj samostalnosti pri izradi ovog rada, kao i na korisnim sugestijama koje su mi naročito pomogle u završnoj fazi izrade teze. Takođe se zahvaljujem doc. dr Marini Radak sa Biološkog fakulteta, na ličnom angažovanju, naročito u završnoj fazi izrade ove teze.

Zahvaljujem se načelniku Odeljenja za kliničku i eksperimentalnu molekularnu genetiku i gensko inženjerstvo VMA, prof. dr Zvonku Magiću, na pomoći koju mi je pružio u savladavanju prvih koraka u oblasti molekularne genetike kancera. Takođe se zahvaljujem svim saradnicima ovog Odeljenja na pruženoj pomoći.

VMLT Jelici Perović, laboratorijskom tehničaru Laboratorije za molekularnu genetiku, kao i glavnom laboratorijskom tehničaru Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, VMLT Milici Matas, zahvaljujem se na pomoći u eksperimentalnom radu i pripremi podataka tokom izrade teze.

Dragani Babić, dipl.ecc-statističaru Data centra IORS-a, zahvaljujem se na pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

Svim saradnicima Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, zahvaljujem se na pruženoj podršci.

DETECTION OF p53 GENE MUTATION IN OPERABLE BREAST CANCER PATIENTS

Background: the main function of normal p53 gene product is to preserve genome integrity by acting as the “guardian of the genome”. It has been shown that in p53-defective cells DNA aberrant replication is followed by genome instability. Loss of p53 function seems to be connected not only with abrogation of DNA repair, but also with abrogation of apoptosis. The evidence indicates that p53 play a critical role in implementing apoptosis in response to treatment with different chemotherapeutics in breast cancer. **The aim** of this study was to evaluate whether tumor’s p53 mutations affect response to chemotherapy, and whether p53 mutations provide prognostic information for breast cancer patients.

Patients and methods: 100 breast cancer patients, among 70 lymph node-positive and 30 lymph node-negative were included. All except one node-positive patients underwent chemotherapy as adjuvant treatment. 65/70 patients received CMF (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) modified intravenous protocol, and 5/70 FAC (5-fluorouracil, adriablastine, cyclophosphamide) protocol. The patients were followed-up from 6 to 127, median 48 months. DNA was isolated by phenol extraction from samples routinely collected for steroid receptor determinations. Specific DNA regions corresponding to exons 5-8 were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Detection of mutations was done by single stranded conformation polymorphism – SSCP – electrophoresis. Gels were silver stained. C-myc amplification was detected by differential PCR. Steroid receptors were measured by five- point dextrane coated charcoal (DCC) assay. Chi-square and Fisher exact test, as well as Kaplan-Meir and Log-Rank tests were used for statistical evaluation.

Results: p53 mutations were detected in 21/100 patients. Totally 25 mutations were found (in 4 patients double mutations were detected). They were not equally spread within examined exons - 10 in exon 5, 6 in exon 6, 8 in exon 7 and only one mutation in exon 8. The incidence of p53 mutations was significantly higher in lymph node-positive than in lymph node-negative patients. Further, p53 mutations were predominantly located in invasive ductal histological type. Since the node-negative patients only one mutation was found, the correlation between detected mutations and the course of disease was examined in lymph node-positive group of patients. Among them, 32/70 patients developed relapse of disease. In the first 24 months of follow-up, patients with p53 mutations had significantly shorter disease free interval (DFI), than the patients without p53 mutations. Also, significantly shorter progression free interval (PFI) in relapsed patients with p53 mutations than in relapsed patients without p53 mutation was found. Concerning overall survival (OS), significantly shorter OS was found in the patients with p53 and/or c-myc gene alterations than in the patients without gene alterations.

Conclusion: In conclusion, occurrence of early relapse in chemotherapy treated patients with p53 mutations, supports data about p53 predictive value. The results obtained for OS indicate importance of simultaneous screening for multiple gene alterations in attempt to define specific tumor molecular profile, finally resulting with individual therapeutic approach.

DETEKCIJA MUTACIJA U p53 GENU KOD BOLESNICA SA PRIMARNIM OPERABILNIM KARCINOMOM DOJKE

Uvod: Zbog svoje uloge u očuvanju genomskeg integriteta, produkt normalnog p53 gena se često naziva i "čuvar genoma". Pokazano je da u ćelijama gde je p53 izmenjen dolazi do aberantne replikacije DNK, što je praćeno genomskom nestabilnošću. Gubitak funkcije p53 povezan je ne samo sa nemogućnošću popravke DNK, već i sa apoptozom. Podaci ukazuju da p53 ima kritičnu ulogu u aktiviranju apoptoze pri odgovoru na različite vidove hemioterapije u karcinomu dojke.

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi da li p53 mutacije utiču na odgovor na hemioterapiju i da li p53 mutacije mogu dati informaciju o prognozi bolesnica sa karcinomom dojke.

Bolesnice i metode: U rad je bilo uključeno 100 bolesnica, od toga 70 sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima i 30 bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Sve osim jedne bolesnice sa metastazama u limfnim čvorovima su primile adjuvantnu hemioterapiju. 65/70 bolesnica je primilo CMF (ciklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracil) po modifikovanom intravenoznom protokolu, i 5/70 je primilo FAC (5-fluorouracil, adriablastin, ciklofosfamid). Bolesnice su praćene u intervalu 6-127 meseci, medijana 48 meseci. DNK je izolovana fenolskom ekstrakcijom iz uzoraka rutinski prikupljenih za određivanje receptora za steroidne hormone. Specifični DNK regioni p53 gena koji odgovaraju eksonima 5-8, umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Detekcija mutacija izvršena je SSCP (konformacioni polimorfizam jednolančane DNK) elektroforezom. Gelovi su bojeni srebrom. Amplifikacija c-myc gena određena je diferencijalnim PCR-om. Receptori za steroidne hormone određivani su biohemijskom saturacionom metodom sa aktivnim ugljem. Hi-kvadrat i Fisher-ov egzaktni test, kao i Kaplan-Meir-ov i Log-Rank test su korišćeni za statističku obradu podataka.

Rezultati: p53 mutacije detektovane su kod 21/100 bolesnica. Ukupno je pronađeno 25 mutacija (po dve mutacije detektovane su kod 4 bolesnice), i njihova raspodela po ispitivanim eksonima nije bila jednaka: 10 u eksonu 5, 6 u eksonu 6, 8 u eksonu 7 i samo jedna mutacija u eksonu 8. Učestalost p53 mutacija bila je znatno viša kod bolesnica sa metastazama u limfnim čvorovima u odnosu na bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima. p53 mutacije bile su predominantno locirane kod bolesnica sa invazivnim duktalnim tipom karcinoma dojke. S obzirom da je kod bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima pronađena samo jedna mutacija, korelacija između detektovanih mutacija i kliničkog toka bolesti analizirana je samo kod bolesnica sa metastazama u limfnim čvorovima. Od ovih bolesnica, 32/70 je imalo ponovno javljanje bolesti (relaps). U prvih 24 meseci praćenja, bolesnice sa p53 mutacijama su imale značajno kraći period do ponovnog javljanja bolesti (DFI), u odnosu na bolesnice bez p53 mutacija. Takođe, u grupi bolesnica sa relapsom pokazan je značajno kraći period do progresije bolesti (PFI) kod bolesnica sa p53 mutacijama u odnosu na bolesnice bez mutacija. U odnosu na ukupno preživljavanje (OS), značajno kraće preživljavanje zabeleženo je kod bolesnica sa p53 i/ili c-myc alteracijama u odnosu na bolesnice bez detektovanih genskih alteracija.

Zaključak: Pojava ranog relapsa kod bolesnica sa p53 mutacijama koje su primile hemioterapiju, ukazuje na prediktivni značaj p53. Rezultati dobijeni za OS, ističu značaj istovremenog određivanja alteracija više gena u nastojanju da se definiše molekularni profil svakog tumora, što za krajnji cilj ima individualni terapijski pristup.

SADRŽAJ

1. UVOD	
1.1. <i>Evolucija kancera</i>	1
1.1.1. c-myc indukovana apoptoza	2
1.2. <i>p53 tumor supresorni gen</i>	4
1.2.1. Strukturne osobine p53 proteina	4
1.2.2. Osobine mutiranog p53	7
1.2.3. Bazalna p53-Mdm2 sprega	11
1.2.4. Aktivacija p53 onkogenima	11
1.2.5. p53-Akt-Mdm2 sprega	12
1.3. <i>Korišćenje p53 signalnog puta u cilju poboljšnja anti-kancerskih tretmana</i>	14
1.3.1. Regulacija funkcije p53 stabilizacijom proteina	15
1.3.2. Agensi koji oštećuju DNK	16
1.3.3. Inhibitori transkripcije	17
1.3.4. Inhibitori metabolizma RNK	17
1.3.5. Inhibitori otpremanja p53 iz jedra	17
1.3.6. Hipoksija	17
1.3.7. Agensi koji oštećuju mikrotubule	18
1.4. <i>Mutirani p53 kao terapeutski cilj u ćelijama tumora</i>	18
1.4.1. Genska terapija sa p53	18
1.4.2. Korišćenje malih molekula inhibitora p53 odgovora	19
1.4.3. Imitiranje funkcije nishodnog gena	19
1.4.4. Reaktivirajući p53 mutanti	19
1.4.5. Tretman tumora sa wt 53	20
1.4.6. Inhibicija ekspresije Mdm2	21
1.5. <i>Apoptoza: veza između genetike kancera i odgovora na hemioterapiju</i>	21
2. CILJ	25
3. MATERIJAL I METODE	26
3.1. <i>Bolesnice sa primarnim operabilnim karcinomom dojke</i>	26
3.1.1. Grupa bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N ₀)	27
3.1.2. Grupa bolesnica sa metastazama u regionalnim limfni čvorovima (N ₊)	28
3.2. <i>Odredjivanje koncentracije receptora za estrogen i progesteron</i>	29
3.2.1. Uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke	30
3.2.2. Homogenizacija tkiva i izdvajanje citosolne frakcije	30
3.2.3. Reakcija vezivanja hormona za receptore u citosolu malignih ćelija	30
3.2.4. Odvajanje viška nevezanog (slobodnog) hormona	31
3.2.5. Odredjivanje radioaktiviteta u β scintilacionom brojacu	32
3.2.6. Analiza rezultata – izračunavanje koncentracije	32
3.2.7. Odredjivanje koncentracije proteina	32
3.3. <i>Izolacija DNK iz uzoraka karcinoma dojke</i>	33
3.3.1. Digestija jedarnog taloga sa proteinazom K	33

3.3.2. Izolacija DNK fenol-hloroformskom metodom	33
3.3.4. Određivanje koncentracije izolovane DNK	34
3.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	34
3.4.1. Optimizacija PCR sistema	35
3.4.2. PCR procedura – umnožavanje 5, 6, 7 i 8 eksona p53 gena	37
3.4.3. Diferencijalni PCR – amplifikacija c-myc gena	38
3.5. Detekcija PCR produkata agaroznom gel elektroforezom	39
3.5.1. Agarozna gel elektroforeza – procedura	39
3.5.2. Razlivanje gela na nosač gela	40
3.5.3. Priprema i nanošenje uzoraka	40
3.5.4. Detekcija produkata UV-zracima	40
3.6. Detekcija izmenjenih sekvenci SSCP metodom	42
3.6.1. SSCP – eksperimentalna procedura	43
3.6.2. Priprema poliakrilamidnog gela	43
3.6.3. Mešanje uzoraka DNK sa bojom i njihova denaturacija	43
3.6.4. Optimizacija uslova za SSCP elektroforezu	44
3.6.5. Bojenje gela srebrom	44
3.6.6. Detekcija izmenjenih sekvenci	44
4. REZULTATI	46
4.1. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke	46
4.1 a). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od veličine tumora	47
4.1 b). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od prisutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	47
4.1 c). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog tipa tumora	48
4.1 d). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od statusa steroidnih receptora	49
4.1 e). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog gradusa tumora	49
4.1.1 Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	50
4.1.2. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (N ₊)	51
4.1.2 a). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od veličine tumora kod N ₊ bolesnica	51
4.1.2 b). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog tipa tumora kod N ₊ bolesnica	52
4.1.2 c). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od statusa steroidnih receptora kod N ₊ bolesnica	53
4.1.2 d). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog gradusa tumora kod N ₊ bolesnica	54
4.2. Učestalost c-myc amplifikacije u tumorskom tkivu bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima	54
4.2 a). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od veličine tumora	55
4.2 b). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od histološkog tipa tumora	55
4.2 c). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od statusa steroidnih receptora	56
4.2 d). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od histološkog gradusa tumora	59

4.3. Korelacija ispitivanih alteracija gena (p53, c-myc) sa tokom maligne bolesti u N₊ grupi bolesnica	59
4.3.1. Period bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) kod bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu	60
4.3.2. Period bez ponovnog javljanja bolesti u prvih 24 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu	61
4.3.3. Period bez ponovnog javljanja bolesti u prvih 36 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu	62
4.3.4. Period bez ponovnog javljanja bolesti nakon 36 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu	63
4.3.5. Period do progresije bolesti kod bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u odnosu na prisustvo/odsustvo p53 mutacija	64
4.3.6. Period bez ponovnog javljanja bolesti kod ispitivane tri grupe bolesnica oformljene u odnosu na prisustvo/odsustvo p53 mutacija i amplifikacije c-myc onkogeno	65
4.3.7. Poredjenje ukupnog preživljavanja bolesnica sa (p53+/c-myc+) ili bez (p53-/c-myc-) detektovanih genskih alteracija	66
5. DISKUSIJA	68
5.1. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke	69
5.2. Zavisnost učestalosti mutacija u p53 genu od parametara tumora	71
5.3. c-myc i karcinom dojke	74
5.4. Korelacija ispitivanih alteracija gena (p53, c-myc) sa tokom maligne bolesti u N ₊ grupi bolesnica	76
5.4.1. p53 kao prognostički faktor u karcinomu dojke	76
5.4.2. p53 kao prediktivni faktor u karcinomu dojke	80
6. ZAKLJUČAK	89
7. LITERATURA	90

1. UVOD

1.1. Evolucija kancera

Od svojih početaka, molekularne studije kancera su vodjene u smislu definisanja preciznije i efikasnije terapije kancera. Imajući u vidu da se kancer razvija iz različitih vrsta tkiva sa višestrukim etiologijama, i da dalja progresija tumora podrazumeva beskrajne kombinacije genetskih i epigenetskih promena, dajući šansu razvitku velikom broju vrsta kancera, jasno je da antikancerski agensi moraju biti raznovrsni kao i sama bolest. Kancer nije jedinstvena bolest i nemoguće je definisati jedinstveni lek za njegovo izlječenje te su s toga jasni napori koji se moraju uložiti za otkrivanje novih vrsta terapija. Međutim, iako je kancer izrazito heterogeno oboljenje, pretpostavlja se da u osnovi te varijabilnosti leži relativno mali broj kritičnih događaja čija je konvergencija neophodna za razviće svih tipova kancera. Mada kancer uključuje i mnoge druge procese koji takodje predstavljaju ciljeve antikancerske terapije, deregulisana ćelijska proliferacija i suprimirana ćelijska smrt, zajedno obezbeđuju temelj neoplastičnoj progresiji. Izazov koji se postavlja pred sve istraživače je identifikacija i razumevanje molekularne anatomije prvih koraka u tumorskoj progresiji, kao i razviće terapija koje direktno deluju na određene ciljeve. Nekontrolisana klonalna ekspanzija somatskih ćelija kod kancera, dovodi do oštećenja okolnog normalnog tkiva. Pokretačka snaga razvića kancera su mutacije somatskih ćelija u genima uključenim u kontrolu ćelijskog rasta. Procesi koji upravljaju genozom i progresijom kancera su evolucionarni i u njima prirodna selekcija deluje nasuprot nasledne ili stečene raznovrsnosti različitih klonova somatskih ćelija, ubrzavajući prekomerni rast onih klonova koji poseduju selektivnu prednost rasta.

Živim organizmima neophodna je znatna i kontinuirana ćelijska proliferacija, kako za razviće i održavanje organizma tako i za popravku eventualnih grešaka. Evolucionarni imperativ organizmima je nalaženje načina kako omogućiti ćelijsku proliferaciju onda kada je potrebna, a u isto vreme suprimirati genozom mutiranih ćelija koja bi dovela do nekontrolisanog rasta. Kada se poremeti ravnoteža između ovih događaja, razvitak kancera je neizbežan. Svesnost o evolucionarnoj prirodi kancera omogućava zanačajan uvid u osobine malignog procesa.

Kancer predstavlja bolest neregulisane ćelijske proliferacije. Svaki od signalnih puteva uključenih u proliferativni odgovor normalnih ćelija je izmenjen u većini kancera. Jedna grupa mutacija neophodnih za razviće tumora deluje tako što prekida potrebu somatskih ćelija za eksternim mitogenim signalima (Hunter et al., 2000). Ovaj tip mutacija može uključivati autokrinu produkciju normalno limitiranog mitogena, aktiviranjem mutacija u prenosiocima signala proteina, kao što je Ras, ili uključuje mutacije koje deluju na jedan od mnogih intermedijarnih signalnih molekula koji prenose mitogene signale do njihovih unutarćelijskih ciljeva. Druga klasa mutacija koje narušavaju rast obuhvata one mutacije čiji je cilj glavna, kasna-G1 signalna tačka regulisana sa pRB (Harbour et al., 2000). Poremećaji u ovom signalnom putu, koji mogu biti univerzalni u humanim kancerima, uključuju deleciju samog RB gena, kao i deregulaciju CDKs, koje fosforilišu i funkcionalno inaktiviraju pRB, bilo kroz direktnu aktivaciju CDKs, ili kroz genski gubitak njihovih inhibitora. Druga, često zastupljena proliferativna lezija koja može da dovede do deregulacije ćelijskog ciklusa je nekontrolisana ekspresija Myc (Baudino et al., 2001). Ekspresija Myc je strogo kontrolisana u normalnim ćelijama, ali je ekspresija u tumorskim ćelijama izmenjena i to uglavnom u smislu njegove povećane ekspresije. Pretpostavlja se da je Myc strateški kontrolor ćelijske proliferacije koji



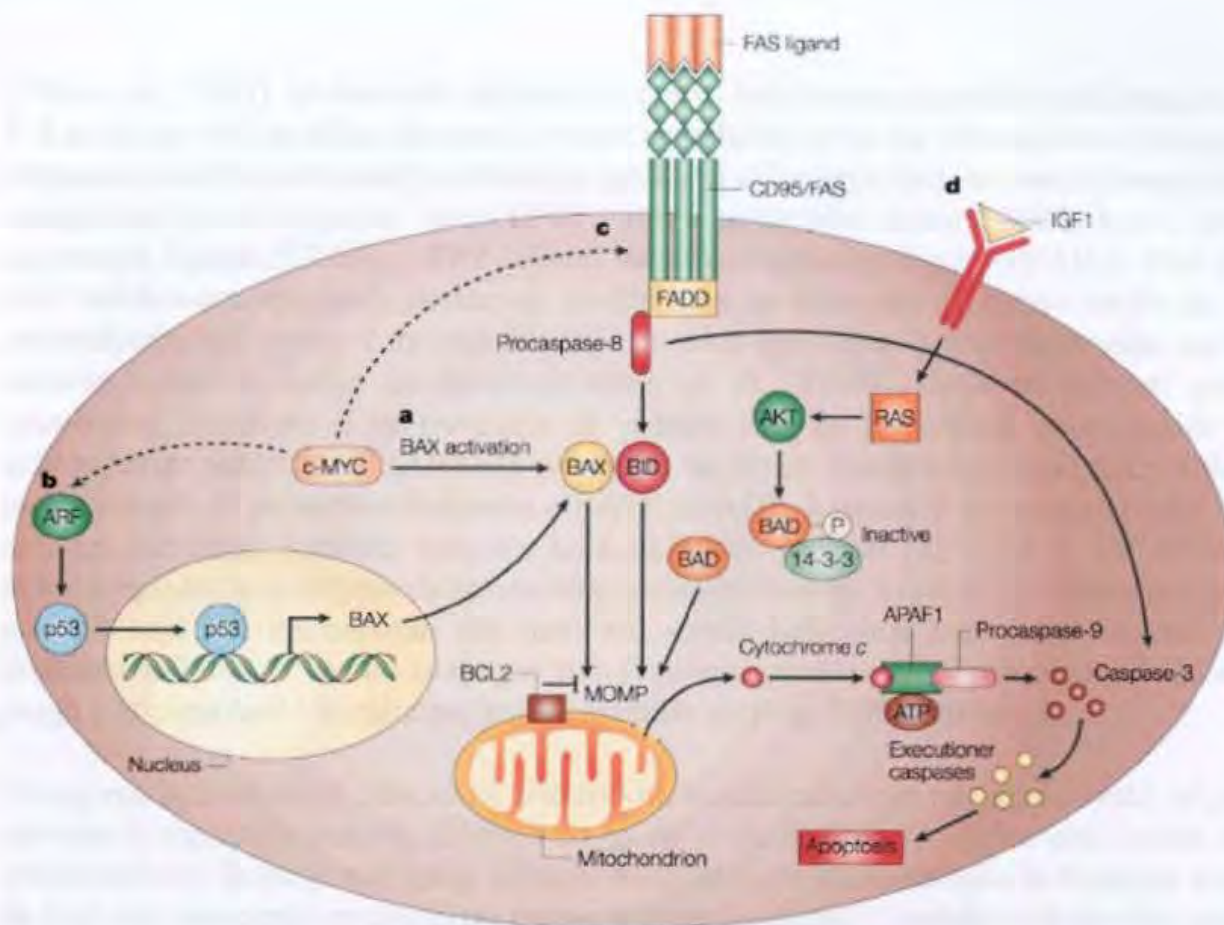
deluje plejotropno u smislu koordinacije ćelijskog rasta (Johnston et al., 2000; Evan and Vousden, 2001), i dalje progresije kroz ćelijski ciklus (Ellend et al., 1999).

1.1.1. *c-myc*- indukovana apoptoza

C-myc protoonkogen kodira c-myc transkripcioni faktor, prvi put identifikovan kao ćelijski homolog viralnog onkogenog (v-myc) ptičjeg retrovirusa (Vennstrom et al., 1982). U novijim istraživanjima pokazano je da je povećana ili neregulirana ekspresija c-myc detektovana u širokom spektru humanih kancera, i često je povezana sa agresivnim i slabo diferentovanim tumorima. Fiziološki, c-myc se ekspresira u visokim nivoima tokom embriogeneze kao i u tkivima odraslih osoba sa visokim proliferativnim kapacitetom (kao što su epidermis kože i želuca). Njegova ekspresija snažno koreliše sa ćelijskom proliferacijom. U *in vitro* uslovima, c-myc se brzo indukuje u odgovoru na razne mitogene stimuluse. Uporedo sa ubrzavanjem ćelijskog rasta i proliferacije, c-myc inhibira terminalnu diferencijaciju većine tipova ćelija i senzibilizuje ćelije za apoptozu. Ova poslednja funkcija povezana sa apoptozom, pod lupom je istraživača poslednjih godina, zbog moguće uloge c-myc u supresiji rasta tumora. Postavlja se pitanje kako c-myc ostvaruje ovako različite ćelijske ishode? Da li su ovi ćelijski događaji u zavisnosti od transkripcije ili represije specifičnog seta c-myc ciljnih gena? C-myc aktivira raznoliku grupu gena kao deo heterodimernog kompleksa sa svojim partnerom, proteinom max. Karboksi-terminalni domen c-myc se vezuje za max i formiraju se myc-max heterodimeri koji imaju sposobnost vezivanja za specifične DNK-sekvence, kao što je E-boks sekvenca CACGTG (Blackwood et al., 1991). Amino-terminalni region od 150 amino kiselina c-myc sadrži dva visoko konzervirana elementa, myc boks I (MBI) i MBII, koji su neophodni za transaktivaciju ciljnih gena. Mutacije u c-myc transaktivacionom regionu kao i u karboksi-terminalnom domenu, poništavaju delovanje c-myc na ćelijsku proliferaciju, transformaciju i apoptozu (Amati et al., 1993).

Jedna od ključnih bioloških funkcija c-myc je ubrzavanje progresije ćelijskog ciklusa (Amati et al., 2001). U mirujućim ćelijama, u *in vitro* uslovima, ekspresija c-myc je nedetektibilna. Posle mitogene stimulacije, ubrzo se indukuje c-myc mRNA i protein i ćelije ulaze u G1 fazu ćelijskog ciklusa. Nakon toga, nivoi mRNA i proteina su niski ali mogu da se detektuju, što održava stanje ravnoteže u proliferišućim ćelijama. Ako se uklone faktori rasta, nivo c-myc pada ispod tačke detekcije, i stopira se dalja proliferacija ćelija.

Pre desetak godina, više laboratorija je došlo do intrigantnog otkrića: onkoproteini kao što su c-myc i adenovirus E1A, oba potentni induktori ćelijske proliferacije, poseduju i apoptotske aktivnosti (Evan et al., 1992). Ekspresija c-myc u fibroblastima gajenim u odsustvu faktora preživljavanja dovodi do apoptoze, sa potencijalnim gubitkom cele ćelijske populacije. Onkogeni aktiviraju apoptozu ako je njihov proliferativni signalni put na neki način blokiran. Najprihvaćenija teorija o apoptozi aktiviranoj onkoproteinima je da indukcija ulaska u ćelijski ciklus, senzibilizuje ćelije na apoptozu: apoptotski i proliferativni signalni putevi su povezani. Apoptotski put je suprimiran sve dok odgovarajući faktori preživljavanja šalju anti-apoptotske signale. Prema tome, koji će od ova dva kontradiktorna procesa prevladati zavisice od raspoloživosti faktora preživljavanja.



Nature Reviews | Cancer

Slika 1. c-myc-indukovana apoptoza (Pelengaris et al., 2002).

Počev od ovih ranih eksperimenata, otkriveno je da i drugi pokretači ćelijske proliferacije (kao što je E2F), poseduju pro-apoptotsku aktivnost (Shan et al., 1994). Činjenica da ćelije sa mutacijama koje utiču na poremećaj regulacije rasta, *in vivo* poseduju tumor-supresornu funkciju, što pokriva ekspanziju potencijalnih malignih ćelija, privukla je veliku pažnju. Ovakva ćelijska populacija neće moći da preraste svoje parakrino okruženje ukoliko apoptoza nije inhibirana. Indirektni podaci podržavaju ovu ideju, što je pokazano jakim sinergizmom između proteina kao što je c-myc i mehanizama koji suprimiraju apoptozu – na primer, povećana ekspresija anti-apoptotskih proteina kao što su bcl-2 ili bcl-X₂ ili gubitak tumor supresora ARF ili p53. Neka novija istraživanja su pokazala da c-myc snažno koreliše sa gubitkom p53 (Blyth et al., 1995), ili gubitkom Arf (Jacobs et al., 1999), jer je inhibirana c-myc- indukovana apoptoza. Interesantno je da stimulacija apoptoze c-myc-om ne mora uvek biti direktno povezana sa ćelijskim ciklusom; takodje može biti posledica indirektnih događaja koji dovode do oštećenja DNK.

Novi podaci *in vitro* istraživanja povezuju c-myc sa reaktivnim jedinjenjima kiseonika (reactive oxygen species, ROS) kroz E2F1-posredovanu inhibiciju nukleranog faktora kB (NF-kB). Krajnji ishod ovih događaja, apoptoza ili zastoj u ćelijskom rastu, zavisice od vrste ćelija

(Vafa et al., 2002). Mehanizmi uključeni u c-myc indukovanu apoptozu prikazani su na Slici 1. Kao što se vidi sa slike, ekspresija c-myc senzibilizuje ćelije na čitav spektar pro-apoptotskih stimulusa, kao što su hipoksija, oštećenje DNK, ili uklanjanje faktora preživljavanja, a takodje omogućava protok signala kroz CD95, tumor nekrotični faktor (TNF), kao i kroz TNF-apoptotski ligand (TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand-TRAIL). Prvi uvid u c-myc indukovanu apoptozu potiče od studija koje su pokazale da c-myc može da indukuje oslobađanje citohroma c iz mitohondrija u toku apoptoze, a ova ekspresija citohroma c dodatno senzibilizuje ćelije na apoptozu (Juin et al., 1998). Kada se jednom oslobodi u citoplazmu, citohrom c se povezuje sa jednim drugim proteinom, apoptotskim proteaza aktivirajućim faktorom 1 (APAF1) pri čemu se stvara apoptozom, kompleks koji aktivira prokaspazu-9. U prisustvu citohroma c i ATP ili ADP, kaspaza 9 se autokatalitički aktivira. i aktivira nizvodnu kaskadu kaspaza koja uključuje kaspaze 2,3,6,7,8 i 10. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da se nekoliko molekula kao što su Apaf 1 i citohrom c organizuju u oblik koji liči na naboran zid (tzv. zid smrti) koji služi kao sidro za više molekula prokaspaze-9 koji se vezuju za njegov rub. Ovo omogućava svakoj prokaspazi-9 da se veže za drugu prokaspazu-9 i formira par koji konstituiše aktivnu formu enzima.

Postojanje individualnih tumora sa višestrukim mutacijama koje pogadjaju svaki od prethodno navedenih signalnih puteva, ukazuju na to da svaki pomenuti put na neki način doprinosi proliferativnoj funkciji malignog tumora. Medjutim, precizna priroda te funkcije kao i način na koji one interaguju medjusobno ostaje za sada nepoznat. U nekim slučajevima pojedinačni tip proliferativne lezije je dovoljan za drugačije upravljanje ćelijskom proliferacijom. Na primer, čak i mala promena u regulaciji c-myc, je barem kod miševa, dovoljna sama po sebi da indukuje i održava proliferaciju više tipova somatskih ćelija *in vitro* i *in vivo* (Pelengaris et al., 1999).

1.2. p53 tumor supresorni gen

1.2.1. Strukturne osobine p53 proteina

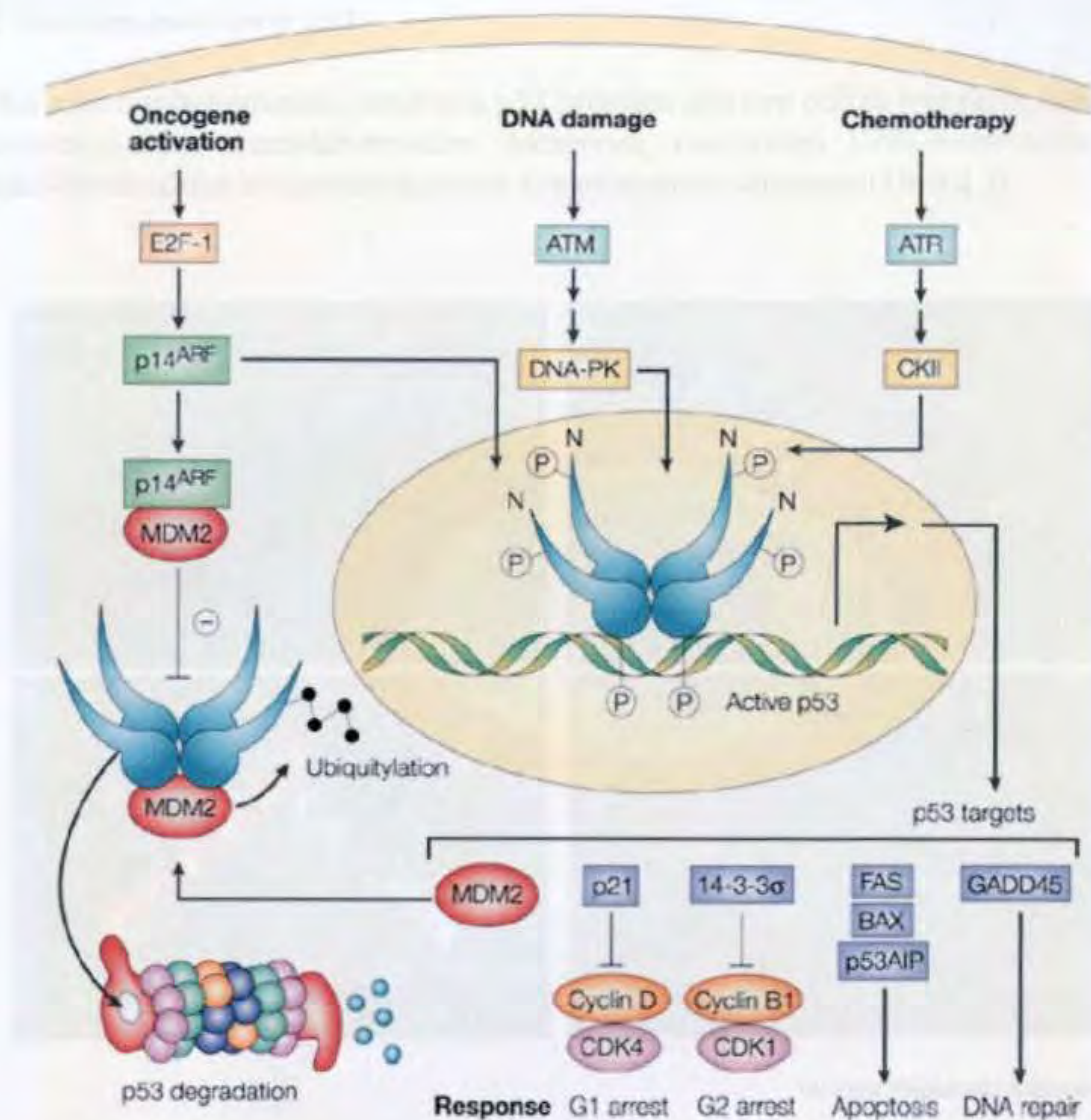
Humani p53 protein sastoji se od 393 aminokiseline, i može se podeliti u pet strukturnih i funkcionalnih domena. N-terminalni region proteina interaguje sa komponentama bazalnog transkripcionog mehanizma i ima funkciju transkripcionog aktivacionog domena. N-terminalni region takodje ima vezujuće mesto za Mdm2 protein, koji reguliše funkciju p53, kroz prekid transkripcione aktivnosti i degradaciju p53 proteina u proteozomima. Centralni domen p53 proteina se vezuje za specifičnu sekvencu DNK. Takodje, kroz više vezujućih mesta preko kojih se p53 protein vezuje za više ćelijskih promotora, ovaj region učestvuje u p53-zavisnoj aktivaciji transkripcije (Field et al., 1990). Izmedju transaktivacionog i DNK vezujućeg domena postoji oblast bogata prolinom, koja funkcioniše kao vezujuće mesto za druge proteine. C-terminalni region sadrži signale za nuklearnu lokalizaciju kao i oligomerizacioni domen, koji omogućava p53 proteinu da formira tetramere, što dovodi do efikasnog vezivanja za DNK i realizacije transkripcione aktivnosti (Wang et al., 1994). Na krajnjem C-terminusu proteina, desno od oligomerizacionog regiona, nalazi se još jedan domen, za koji se pretpostavlja da je odgovoran za regulaciju DNK-vezujuće aktivnosti centralnog domena.

Upoređivanjem strukture p53 proteina između različitih vrsta, došlo se do saznanja da postoji pet regiona čija se struktura sačuvala kroz evoluciju. Četiri od pet regiona locirano je u okviru centralnog DNK-vezujućeg domena (Soussi et al., 1990). Interesantno je da je većina mutacija (uglavnom tačkastih mutacija), kod humanih kancera, locirana upravo u ovim regionima. Za razliku od mutacija u drugim tumor supresornim genima koje esencijalno eliminišu ekspresiju datog proteina, mutacije u p53 genu rezultiraju ekspresijom visokih nivoa mutirane forme p53 proteina koja ne može da se veže za DNK i na taj način ostvari svoju funkciju. Većina do sada otkrivenih tačkastih mutacija u p53 genu ne pogadja oligomerizacioni domen. U eksperimentalnim sistemima je pokazano da ovakvi p53 mutanti mogu da oligomerišu i na taj način inaktiviraju divlji tip (wt) p53. Sposobnost mutiranog p53 proteina da funkcioniše na dominantno negativni način, može rezultirati selektivnom prednošću ćelija koje ekspimiraju jedan mutantni i jedan wt tip alela, iako gubitak wt alela kod većine kancera ukazuje da dominantno-negativni efekat nije kompletan. Postojanje mutiranog p53 proteina u ćelijama kancera, sugerise da mutacije u p53 genu mogu rezultirati pokretanjem pozitivne transformišuće aktivnosti, nezavisno od dominantno negativnog efekta da se inhibira funkcija wt p53 proteina (Vousden and Lu, 2002).

1979. godine p53 protein je identifikovan kao 53-kDa protein koji se vezuje za veliki T antigen sarkoma virusa SV40 (Lane et al., 1979). Bilo je potrebno deset godina da se p53 prepozna kao tumor supresorni gen i da stvaranje kompleksa sa T antigenom inaktivira p53 (Lane, Genes Dev, 90). Viralni protein maskira DNK-vezujuću površinu p53, sprečavajući na taj način njegovu funkciju transkripcionog faktora za gene uljučene u popravku DNK, zaustavljanje rasta i apoptozu. Kod cervikalnog kancera, u 90% slučajeva, drugi viralni protein-human papiloma virus E₆, aktivira degradaciju p53 (Scheffner et al., 1990).

Povećana ekspresija protoonkogenog mdm2 utiče na degradaciju wt p53. Mdm2 protein normalno reguliše ćelijski nivo p53 sprečavajući nepotrebnu p53-indukovanu apoptozu. Prema tome, suviše male količine p53 dozvoljavaju ćelijama kancera da proliferišu, dok prevelika koncentracija p53 može biti letalna, što je pokazano u eksperimentima sa miševima deficijentnim za mdm2 gen (de Rozières et al., 2000). Funkcionalno, p53 je u centru široke mreže prenosnika signala i efektor, povezanih sa G1 i G2 restrikcijama tačkama ćelijskog ciklusa (Slika 2), i diktira njihovo međusobno interreagovanje, što razviće kancera čini kompleksnim, višestepenim procesom (Vogelstein et al., 2000).

Slika 2; negativna regulatorna povratna sprega kontroliše ćelijske nivoe p53. U normalnim ćelijama, p53-zavisna transkripcija mdm2, ubrzava degradaciju p53. Onkogeno aktivirana, oštećenje DNK, npr. hemioterapijskim agensima, aktivira proteinske kinaze (ATM ili ATR), koje kroz DNK-zavisnu kinazu DNK-PK i kazein-kinazu 2 (CKII), fosforilišu amino-terminalni deo p53, što sprečava vezivanje mdm2. Ovi događaji dovode do povećanja nivoa p53 koji potom aktivira transkripciju svojih ciljnih gena. p21 i 14-3-3 dovode do zastoja ćelijskog ciklusa u G1 i G2 kontrolnim tačkama inhibiranjem ciklin-zavisnih protein kinaza (CDK); FAS, BAX i p53 AIP ubrzavaju apoptozu, ukoliko nije moguće ukloniti nastalo oštećenje DNK.



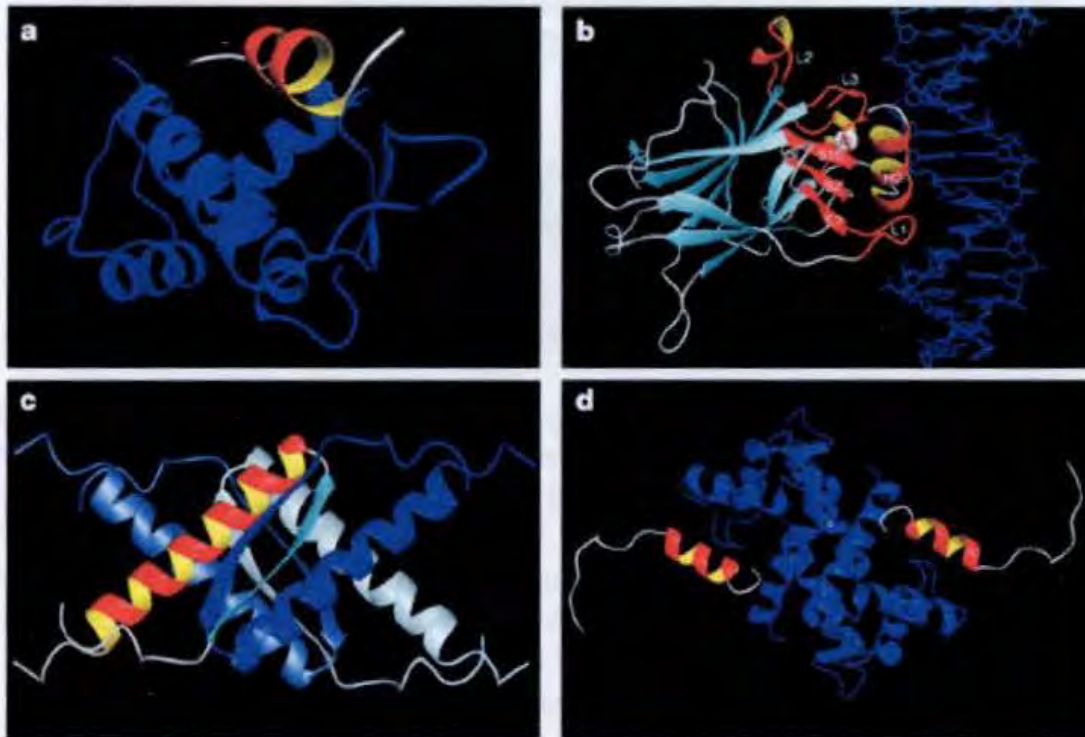
Nature Reviews | Cancer

Slika 2. Uloga p53 kao tumor supresornog gena (Bullock et al., 2001)

Prva mutacija u p53 genu kod osobe obolele od kancera, zabeležena je 1989 (Baker et al., 1989). Sada se zna da više od polovine svih kancera ima mutirani p53 gen. Kanceri sa inaktivnim, mutiranim p53 su agresivni i često rezistentni na zračnu i hemioterapiju. Loša prognoza ovih kancera je rezultat nepostojanja p53-zavisne apoptoze, a što ima važne implikacije za druge vrste antikancerskih terapija. Jasno je da mutirani p53 predstavlja jedan od najvažnijih kliničkih targeta za delovanje novih terapija, mada tu postoji mnogo nepoznanica. Jedno od najčešće postavljenih pitanja je kako toliko različitih tačkastih mutacija izaziva isti inhibitorski efekat i da li je uopšte moguće vratiti proces unazad?

1.2.2. Osobine mutiranog p53

Kao što smo ranije pomenuli, struktura p53 proteina ima sve odlike transkripcionog faktora, sa amino-terminalnim transaktivacionim domenom, centralnim DNK-vezujućim domenom i karboksi-terminalnim oligomerizacionim i regulatornim domenom (Slika 3).

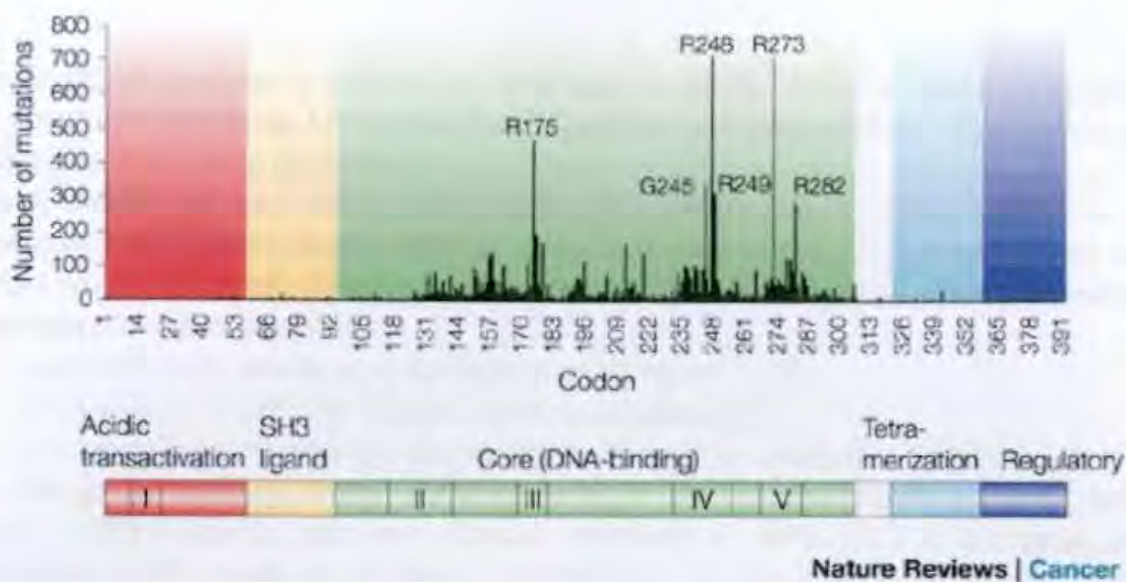


Nature Reviews | Cancer

Slika 3. Struktura četiri p53 domena (3D) (Bullock et al., 2001)

- a) Amino-terminalni domen za koji se vezuje mdm-2 protein
- b) Centralni domen p53 vezan za DNK
- c) p53 domen odgovoran za tetramerizaciju
- d) Karboksi-terminalni domen

Do danas je identifikovano više od 10 000 različitih somatskih mutacija u p53 genu (Olivier et al., 2002). Oko 95% svih mutacija, lokalizovano je u centralnom DNK-vezujućem domenu (Slika 4), što potvrđuje da je ključna uloga p53 u aktivaciji transkripcije. 75% mutacija su tačkaste mutacije, dok ostatak čine, ali u mnogo manjoj meri delecije, insercije ili frameshift mutacije.



Slika 4. Učestalost i distribucija p53 mutacija (Bullock et al., 2001)

Kristalna struktura središnjeg DNK-vezujućeg domena p53 proteina, potvrđena je 1994 godine (Cho et al., 1994), što je stvorilo novu osnovu za razumevanje funkcije mutiranog p53. Ovaj domen čine jezgro sastavljeno od β - sendvič strukturnih motiva i DNK-vezujuća površina, koja uključuje LSH motiv (engl. Loop-sheet-helix; petlja-ravna struktura-heliks) i dve petlje (L2 i L3), spojene jednim atomom Zn. Može se definisati šest tzv. «vrućih zona» gde se mutacije najčešće javljaju: dve su u direktnom kontaktu sa DNK, mutacije R248 (L3) i R273 (LSH), dok se preostalih četiri nalazi u okružujućoj strukturi, mutacije R175 (L2), G245 (L3), R249 (L3) i R282 (LSH), (Slika 4). Iz ove podele proizilaze dve klase mutacija: DNK-kontaktne mutacije i strukturne mutacije. Ove dve klase mutacija mogu se razlikovati i pomoću dva poliklonska antitela, PAb1620 i PAb240, sintetisana na osnovu nativnog i denaturisanog p53. Kontaktni mutanti uglavnom vezuju PAb1620 zato što poseduju intaktno nativno uvijanje, dok strukturni mutanti specifično vezuju PAb240 kontinuirani epitop delimično razgradjen i nepristupačan u nativnom stanju (Milner et al., 1995). Strukturni mutanti centralnog regiona p53, bez obzira na vrstu mutacije, imaju istu konformaciju. Termodinamičke studije širokog spektra mutacija centralnog regiona p53 ukazuju na postojanje tri tipa mutacija odnosno tri vrste fenotipa u odnosu na uvijanje DNK:

- DNK-kontaktne mutacije koje u maloj meri imaju ili uopšte nemaju efekat na uvijanje
- Mutacije koje narušavaju lokalnu strukturu i
- Mutacije koje uzrokuju denaturaciju DNK (više od 50% lanaca DNK je u odmotanoj formi) (Bullock et al., 2000).

Mutacije u okviru β - sendvič strukture sve pripadaju poslednjoj grupi, pa je denaturacija jedini mehanizam kojim one inaktiviraju p53. Nasuprot njima mutacije na DNK-vezujućoj površini mogu se svrstati u sve tri kategorije, što objašnjava njihovu dominantnost kod kancera.

Ova razlika se može videti upoređivanjem mutacija u okviru β - sendviča sa mutacijama u delu koji okružuje vezujuće mesto za Zn: svi β - sendvič mutanti vezuju se za promotor DNK na 20°C, temperaturi koja je optimalna za uvijanje, dok mutanti Zn-vezujućeg mesta imaju narušenu strukturu koja onemogućava njihovo vezivanje za DNK (Bullock et al., 2000). Oba tipa mutacija denaturišu protein na 37°C. Podela pomenuta tri fenotipa na kompetentne,

odnosno nekompetentne u odnosu na vezivanje za DNK, definiše jedan wt centralni region p53 i pet grupa mutanata. Ove grupe mogu predstavljati potencijalna ciljna mesta u p53, čija se funkcionalnost može povratiti.

Povraćaj funkcionalnosti mutantima predstavlja veliki izazov: kako učiniti reverzibilnim proces supstitucije jedne amino kiseline u centralnom domenu p53? Korišćenjem racionalnog dizajna (Wieczorek et al., 1996) i genske selekcije (Brachmann et al., 1998), identifikovana su tri tipa supresornih mutacija:

- mutacije koje uvode nove kontaktne površine sa DNK
- mutacije koje koriguju lokalne strukturne distorzije i
- mutacije koje povećavaju ukupnu termodinamičku stabilnost centralnog domena

Prve dve grupe mutacija mogu delovati samo u slučaju specifičnih genskih alteracija. Na primer, T248R mutacija povećava afinitet vezivanja za DNK R273H mutanta, dok H168R omogućava R249S mutantu da spreči preturbaciju L₃ petlje (Nikolova et al., 2000). Treća grupa mutacija obuhvata opšte supresore koji mogu vratiti funkcionalnost bilo kom mutantu osetljivom na promenu temperature. Pronadjene su dve takve mutacije N239Z i N268D. Zajedno ove mutacije povećavaju stabilnost centralnog domena p53 i obnavljaju funkciju mutanta V143A (Brachmann et al., 1998).

Obnavljanje centralnog domena tretira defektni p53 na njegovom najvažnijem mestu, ali kako se ovaj model uklapa u širu sliku p53 tetramera? Već smo pomenuli da germinativna mutacija u samo jednom od dva p53 alela, narušava funkciju p53 i stvara predispoziciju za nastanak kancera (Li-Fraumeni sindrom). Dominantno negativni efekat mutanata implicira da mutant i wt protein formiraju funkcionalno neaktivne hetero-oligomere. DNK-kontaktne mutacije i kao konstrukti bez centralnog domena, takodje ispoljavaju dominantno negativni efekat, ukazujući da smanjenje afiniteta tetramera za vezivanje za DNK nije dovoljno za dominantnost (Chene et al., 2000).

Dominantno negativni efekat može onemogućiti jedan drugi pristup obnavljanju funkcije p53 – gensku terapiju (Ghaneh et al., 2001). Negativna dominantnost u ovim slučajevima može nadvladati efekat genske terapije, uvodjenjem varijanti koje imaju nove tetramerizacione domene koji hibridizuju sami sa sobom (Mateu et al., 1999).

p53 tetramer normalno se nalazi u latentnoj inaktivnoj kvartenarnoj formi (Hupp et al., 1994). Ekstremni C-terminalni domen inhibira aktivnost proteina vezivanjem za DNK bez specifičnosti sekvence i verovatno regulacijom proteinskih kontakata unutar tetramera. Aktivacija podrazumeva N-terminalnu fosforilaciju koja inhibira vezivanje za mdm2, a samim tim povećava poluživot proteina i modifikaciju C-terminusa (fosforilacija i acetilacija), što anulira aktivnost negativnog regulatornog domena. Dodavanje sintetičkog peptida napravljenog na osnovu C-terminalnog domena takodje ima stimulatorni efekat. DNK-kontaktne mutacije R273H ima najslabiji dominantno negativni efekat pa dodavanje ovog aktivirajućeg peptida može omogućiti vezivanje za DNK i indukovati apoptozu in vivo (Kim et al., 1999).

Analiza efekta mutacija na drugom mestu koje mogu povratiti funkciju mutanta sa hot spot mutacijama, implicira da je moguće stabilizovati na generički način mnoge destabilizovane p53 mutante. Dalje, specifične mutacije koje narušavaju nativnu strukturu takodje mogu biti revertirane. Aktivacija p53 tetramera peptidom koji se vezuje za C-terminus može biti dovoljna za vraćanje funkcije kontaktnom mutantu R273H koji je zadržao intaktno, nativno uvijanje. Postavlja se pitanje koji bi od ovih pristupa bio najuspešniji u odredjivanju terapije lekovima. Verovatno je najprihvatljiviji pristup pronaći male molekule koji imitiraju efekat globalnih supresornih mutacija. Ovi molekuli se moraju snažno vezivati za nativnu

formu a slabo za denaturisanu. Kakva je teorijska osnova ovog pristupa? U svakom slučaju terapijska sredstva imaju pristup i zdravim i malignim ćelijama, što povećava stabilnost i wt i mutantnog proteina. Strategija počiva na tri funkcionalne razlike između wt i mutantnog p53: prvo, na akumulaciji mutantnog p53 u odsustvu mdm2; drugo, na aktivaciji p53 kvartarne strukture u odgovoru na oštećenje DNK; i treće na aktivaciji drugih ćelijskih proteina kao što je E2F-1 koji deluje sinergistički sa p53. Ovi faktori mogu stimulisati p53-zavisan apoptotički odgovor koji je tumor specifičan. Wt p53 protein ima nativnu strukturu, svaka promena konformacije a samim tim i aktivnosti ukazuje na prisustvo mutiranog p53 u ćeliji. Stepenu u kojem su normalne ćelije senzitivne na apoptozu zavisice od kombinacija tradicionalnih terapija (hemio i radioterapije) i p53 specifičnih tretmana.

Mutacije u β -nabranoj strukturi čine 25% svih tačkastih mutacija i uzrok su pojave temperaturno osetljivog fenotipa čija se funkcija može povratiti gore navedenim pristupom. Pošto otprilike jedna petina pacijenata sa p53 mutacijama razvija ovaj tip mutantnog p53, ova klasa predstavlja značajan terapijski cilj. Neke mutacije koje pogadjaju DNK-vezujuću površinu proteina takodje mogu destabilizovati protein malim strukturnim distorzijama i na taj način omogućiti strategiju povraćaja funkcionalnosti. Mutacije u Zn-vezujućem mestu ne pripadaju ovoj kategoriji, one izazivaju promene koje su suviše velike da bi bile reverzibilne (Bullock et al., 2001).

Zahvaljujući velikom interesovanju za p53 poslednjih godina rasvetljen je skoro svaki aspekt njegove biologije i biohemije. Najveća saznanja su svakako da je p53 za sekvencu specifičan transkripcioni faktor i da kao takav nakon vezivanja za definisane konsenzusne DNK sekvence aktivira transkripciju određenih, ciljnih gena. Broj potvrđenih i pretpostavljenih p53 ciljnih gena stalno raste, a karakterizacija proteina kodiranih ovim genima omogućava uvid u funkciju p53. Takodje p53 može suprimirati ekspresiju nekih gena, mada su mehanizmi takvog delovanja mnogo manje poznati. Sa biološke tačke gledišta, p53 je sposoban za izazivanje dramatičnih promena u ćeliji, počev od zastoja rasta, permanentnog prekida ćelijskog ciklusa, terminalne diferencijacije do apoptoze. Glavna osobina p53 je da je on u normalnim ćelijama esencijalno u latentnom stanju i nema uticaja na sudbinu ćelije. Kada ćelije budu izložene različitim vidovima stresa, p53 se brzo prebacuje u aktivno stanje, što rezultira snažnim fenotipskim efektima. Ova aktivacija je ključ funkcije p53 kao tumor supresora. Istraživanja biohemijske osnove prebacivanja p53 iz latentne u aktivnu formu otkrila su čitavu mrežu molekularnih interakcija koje pozicioniraju p53 u centar kompleksne mreže signalne transdukcije (Vogelstein et al., 2000).

Uprkos velikom broju informacija o p53, preostaje još mnogo ključnih pitanja. Nastojanja da se definišu precizni odgovori na ova pitanja formiraju fokus mnogih aktuelnih p53 istraživanja. Neka od tih pitanja su:

- Na koji način p53 "oseća" da treba da se aktivira i umeša u sudbinu ćelije?
- U čemu se aktivirana p53 forma razlikuje od "latentne" forme?
- Kako aktivacija p53 dovodi do različitih bioloških ishoda, ili na koji način aktivirani p53 u nekim slučajevima dovodi do zastoja u ćelijskom ciklusu a u drugim do apoptoze?
- Zašto neki individualni tumori zadržavaju wt p53 gen, dok u isto vreme drugi tumori sa sličnim patobiološkim karakteristikama podležu mutacionoj inaktivaciji oba alela p53 gena?

- Da li mutantne forme p53 koje se u visokim nivoima nagomilavaju u mnogim tumorima, doprinose osobinama tumora?
- Da li određivanje p53 statusa tumora može biti osnova za donošenje preciznijih terapijskih odluka?

1.2.3. Bazalna p53-Mdm2 sprega

U ćelijama koje nisu izložene stresnim situacijama aktivnost p53 je subjekat efektivne represije, koja protein održava u biološki latentnom stanju. Represija p53 aktivacije je većim delom rezultat akcije Mdm2 proteina, produkta proto-onkogenog. Mdm2 je sa p53 povezan mnogim specifičnim načinima. S jedne strane Mdm2 protein se vezuje za p53 i deluje kao njegov glavni ćelijski antagonist. Ovo se postiže delom kroz direktnu interferencu vezanog Mdm2 sa transkripcionim aktivnostima p53, a uglavnom kroz sposobnost Mdm2 da učini p53 podložnim brzom proteolizi. Mdm2 može da funkcioniše kao p53-specifična E3 ubikvitin ligaza, koja pričvršćuje ubikvitin ostatke na p53 i šalje ga na degradaciju u 26S proteozom. S druge strane mdm2 gen je direktni cilj za pozitivnu transkripcionu aktivaciju sa p53. Ova međusobna povezanost između p53 i Mdm2 definiše bazalnu p53-Mdm2 spregu, koja predstavlja samo "srce" p53 regulacione mreže (Slika 2). Sve dok je petlja potpuno zatvorena, ravnoteža između p53 i Mdm2 naginje ka Mdm2, što rezultira kontinuiranom represijom aktivnosti p53 i njegovim održavanjem u biološki inertnom stanju. Svaka promena u ovoj delikatnoj ravnoteži, naročito promene koje redukuju interakciju između dva proteina, mogu povećati ćelijsku p53 aktivnost i potencijalno povećati fenotipski p53 odgovor. Zajedničko je da veliki broj stres signala utiče na bazalnu spregu na različite načine, ali svi u krajnjem slučaju smanjuju restriktivni efekat Mdm2, što za posledicu ima indukciju p53 aktivnosti (Oren et al., 2002).

1.2.4. Aktivacija p53 onkogenima

Jedna od situacija koja se često javlja pri narušavanju aktivnosti p53, je nedozvoljena, konstitutivna aktivacija signalnih puteva koji stimulišu rast, kao u slučaju kad određeni proto-onkogeni usled aktivirajuće mutacije postanu aktivni onkogeni. Kada se onkogen nepravilno aktivira u naizgled normalnoj ćeliji, p53 se alarmira i pokreće fenotipski odgovor koji sprečava takvu potencijalno neoplastičnu ćeliju od daljeg napredovanja do maligne ćelije. U ćelijama u kojima je pokazana povezanost između onkogene aktivacije i indukcije p53, aktivirani onkogen će slobodno ispoljiti svoj aberantni efekat i dovesti do konverzije ka neoplazmi. Sprega između onkogene aktivacije i indukcije p53, definiše ključnu ulogu p53 kao tumor supresora.

Iako aktivirani onkogeni verovatno izazivaju odgovor p53 na više načina, najbolje proučeni mehanizam uključuje ARF tumor supresorni protein (Lowe et al., 1999). INK4a/ARF lokus je odmah posle p53 po frekvenci nadjenih mutacija u humanim kancerima. Ovaj lokus kodira p16^{INK4a}, inhibitor ciklin-zavisne kinaze, koji deluje posle retinoblastoma proteina (Rb), i

dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa. Dok postojeći podaci ukazuju da je p16^{INK4a} važni tumor supresor, INK4a/ARF lokus kodira i drugi protein, translatovan iz drugog okvira čitanja, i označen kao p19^{ARF} (Quelle et al., 1995). p16^{INK4a} i p19^{ARF} su često zajedno deletirani u tumorskim ćelijama, mada je pokazano da su miševi samo bez p19^{ARF} ekstremno prijemčivi za kancer. Više istraživanja sugeriraju da p19^{ARF} može funkcionisati kroz genske i biohemijske puteve koji uključuju p53. Na nivou organizma, posledice delecije p53 i p19^{ARF} su izrazito slične (Kamijo et al., 1997). Mutirani miš se razvija normalno, ali ima visoku predispoziciju za maligne tumore sličnih osobina. Na ćelijskom nivou, pojačana ekspresija p19^{ARF} može indukovati zastoje ćelijskog ciklusa u ćelijama koje imaju wt p53 ali ne i u ćelijama koje ekspimiraju mutirani p53. S druge strane p19^{ARF} može biti fizički povezan sa samim p53, sa Mdm2 i na taj način menjati nivoe p53 i njegovu aktivnost (Kamijo et al., 1998). ARF se vezuje za Mdm2 i inhibira njegovu aktivnost, što omogućava p53 da se otrgne Mdm2-posredovanoj represiji i akumulira u nivoima koji su dovoljni da izazovu p53 zavisni odgovor. Ranije studije su identifikovale određeni broj onkogeni čija je aktivacija povezana sa indukcijom p53; tu se ubrajaju myc, Ras, adenovirus E1A i E2F1 (Lowe et al., 1999). Novija istraživanja pokazuju da slična povezanost postoji u slučaju još jednog onkogeni, beta katenina. Dok je beta katenin u normalnim uslovima strukturna komponenta u mestima adhezije ćelija-ćelija, on ponekad može imati ulogu transkripcionog faktora u nukleusu. Ovo se normalno događa u određenim fazama razvika, a abnormalno u ćelijama kancera kad usled mutacija dolazi do deregulacije beta katenina. Deregulisani beta katenin ne samo da upravlja procesima koji dovode do kancera, već i omogućava akumulaciju transkripciono aktivnog p53. Kao i drugi onkogeni, izmenjeni beta katenin može da stimuliše transkripciju ARF mRNK, što dovodi do inhibicije Mdm2 i konsekvantne akumulacije aktivnog p53 (Damalas et al., 2001). Imajući u vidu da povezanost između beta katenina i p53 ima funkciju anti kancerskog mehanizma, višak beta katenina ispoljava inhibitorne efekte u ćelijama sa intaktnom funkcijom p53. Kako u stvari beta katenin dovodi do stvaranja kancera? Jedan način je mutaciona inaktivacija p53. Ova inaktivacija primećena je u mnogim tumorima sa deregulisanim beta kateninom (Esteller et al., 2000).

Inaktivacija ARF omogućava ćelijama kancera da izbegnu protektivni p53 odgovor. Neka novija istraživanja na kolorektalnim tumorima otkrila su značajnu proporciju ćelija koje ne ekspimiraju ARF usled gašenja transkripcije zbog metilacije promotora (Esteller et al., 2000). Izgleda da se gašenje funkcije ARF dešava rano u progresiji tumora, paralelno sa deregulacijom beta katenina, što zajedno čini inicijalni događaj u progresiji ovog tipa kancera. Kao i kod svih regulatornih mreža i ovde postoji niz nerazjašnjenih pitanja. Zašto je neophodna direktna inaktivacija p53 ako ga povezivanje sa deregulisanim beta kateninom ionako razara? Jedan od verovatnijih odgovora je da takvi tumori imaju više karakteristika genomske nestabilnosti, uključujući velike hromozomske aberacije i aneuploidiju. Pošto ovakva genska oštećenja mogu indukovati p53 čak i u odsustvu ARF, pretpostavka je da je moguća direktna inaktivacija p53 nezavisno od statusa ARF. Gašenje funkcije ARF dešava se rano u kancerogenezi tako da nije u mogućnosti da inhibira aktiviranje deregulisanog beta katenina, dok se mutacije p53 gena javljaju u kasnijim fazama paralelno sa postepenim povećanjem ukupne genomske nestabilnosti. Atraktivnije objašnjenje za pojavu p53 mutacija u kasnijim fazama tumorske progresije omogućeno je otkrićem drugog kraka petlje beta katenin-p53. Visoki nivoi aktiviranog wt p53, kao odgovor na veće oštećenje DNK, mogu dovesti do proteolize beta katenina verovatno kroz dejstvo višestrukih E3 ubikvitin ligaza (Sadot et al., 2001). U slučaju kad se p53 u proliferišućim tumorima aktivira u odgovoru na

akumulirana genska oštećenja, on smanjuje aktivnost hiperaktivnog beta katenina i na taj način poništava signal koji je inicirao neoplastični proces. Takođe, mutirani p53 proteini koji se akumuliraju u tumorskim ćelijama mogu biti mnogo više od "mrtvog" p53. Postoje podaci da posle poništavanja tumor supresorne funkcije wt p53, mutacije u p53 genu koje su česte u kancerskim ćelijama, daju nove, onkogene osobine mutiranim proteinima (Sigal et al., 2000). Ovo "povećanje funkcije" može biti dodatna pokretačka snaga za pojavu p53 mutacija u kasnijim fazama tumorske progresije.

Za razliku od apoptoskog odgovora koji često prati indukciju ARF i aktivaciju p53 drugim onkogenima, deregulisani beta katenin favorizuje viabilni izlaz iz ćelijskog ciklusa. Ovo sugerise da paralelno sa pozitivnom regulacijom p53, beta katenin takodje može ispoljavati anti-apoptotski efekat koji sprečava letalni ishod. Ovu pretpostavku potvrdilo je skorašnje otkriće proteina WISP-1, čija je ekspresija pod uticajem deregulisanog beta katenina a koji poseduje potentna anti-apoptoska svojstva (Su et al., 2002). Aktivnost WISP-1 je uslovljena aktivacijom Akt protein kinaze koja je komponenta još jedne p53-zavisne autoregulatorne petlje. Ovim objašnjenjem priča se ne završava. Osim promena na p53 i beta kateninu, prosečna ćelija kancera sadrži značajan broj dodatnih genskih alteracija. Veliki broj njih može imati uticaja na petlju beta katenin-p53, menjajući ravnotežu različitih komponenata. Relevantni primer je Ras onkogen, koji je često aktiviran u humanim tumorima. Pronadjeno je da Ras može pokrenuti transkripciju mdm2 gena, povećavajući nivo Mdm2 i tako uticati na aktivnost p53 (Ries et al., 2000). Značajno je i da Ras indukuje ekspresiju ARF. Pokazano je da u ćelijama kojima nedostaje ARF, Ras suprimira funkciju p53 tako što pozitivno reguliše Mdm2; s druge strane ako je ARF funkcionalan i eksprimiran u dovoljnoj količini može nadvladati funkciju Mdm2 i onemogućiti protektivni p53 odgovor.

1.2.5. p53-Akt-Mdm2 sprega

Izučavanja posvećena regulaciji p53-posredovane apoptoze, identifikovala su još jednu kontrolnu spregu koja može igrati važnu ulogu u određivanju ishoda ćelijskih događaja posredovanih p53. Ova sprega uključuje Akt/PKB protein kinazu, za koju se zna da favorizuje anti-apoptotske efekte i posreduje u signalima preživljavanja (Datta et al., 1999). Aktivacija Akt-a signalima preživljavanja postiže se uglavnom kroz kinaznu kaskadu koja uključuje PI3-kinazu i nishodne protein kinaze. Noviji radovi otkrili su da Akt ima preklapanja sa p53 signalnim putem. U tom slučaju kao što je slučaj i sa ARF, direktni cilj nije sam p53 već pre Mdm2. Akt može da se veže za Mdm2, i fosforiliše ga na najmanje dva mesta u okviru centralnog domena Mdm2 (Gottlieb et al., 2002). Ovo onemogućava Mdm2 da se translocira iz citoplazme u jedro, gde treba da se veže za p53 i na taj način obezbedi njegovu inaktivaciju, ubikvitinaciju i degradaciju. Prema tome Akt je neophodan za punu aktivnost Mdm2. Signali preživljavanja koji povećavaju Akt aktivnost mogu potencirati inhibitorni efekat Mdm2 i smanjiti p53 odgovor, što objašnjava sposobnost Akt-a da interferira sa p53-posredovanom apoptozom (Sabbatini et al., 1999). S druge strane kad se p53 aktivira odgovarajućim signalima, može negativno da reguliše ćelijske nivoe Akt-a. Po ovom scenariju, indukcija visoke aktivnosti p53, što se dešava kad se ćelije izlože velikim oštećenjima DNK, pokreće brzo i efikasno proteolitičko cepanje Akt-a posredovano kaspazama, što rezultira dramatičnim padom ukupnog nivoa Akt-a. Kaspazama posredovana degradacija Akt-a česta je u kasnijim fazama apoptotskog procesa, i pretpostavlja se da predstavlja sekundarnu posledicu masovne aktivacije kaspaza koja je karakteristična za ovaj proces. U slučaju aktiviranog p53 ova

degradacija se dešava znatno ranije, što podržava činjenicu da ovaj proces ima kritičnu ulogu u omogućavanju p53-zavisne apoptoze. Sličan sled događaja postoji i u slučaju pRB tumor supresornog proteina, čija p53-zavisna brza degradacija kaspazama takodje olakšava apoptozu u nekim tipovima ćelija.

Sledeći učesnik ove sprege je PTEN. PTEN, takodje tumor supresorni gen kodira fosfatidilinozitol fosfatazu koja učestvuje u delovanju PI3 kinaze (Simpson et al., 2001). PTEN sprečava aktivaciju Akt-a, što omogućava apoptozu. Novija istraživanja su pokazala da p53 može da transaktivira PTEN gen (Stambolic et al., 2001). To implicira, da kad p53 postane aktiviran on može uzrokovati povećanje ćelijskih nivoa PTEN, na taj način smanjujući aktivnost Akt i omogućavajući apoptozu. U stvari pokazano je da PTEN može efikasno da štiti p53 od inhibitornih efekata Mdm2 i povećava p53-zavisno ubijanje ćelija hemioterapijom (Mayo et al., 2002).

P53-Mdm2-Akt sprege može predstavljati s jedne strane mesto integracije signala preživljavanja, a s druge strane mesto integracije pro-apoptotskih stresnih signala. Ova petlja definiše drugu vrstu balansa, gde sudbina ćelije može dramatično varirati, u zavisnosti od ćelijskog sadržaja. U odsustvu signala preživljavanja, intenzivni stres će dovesti do uspešne aktivacije p53, inaktivacije i proteolitičke degradacije Akt-a, i eventualne apoptoze. S druge strane, potentni signali preživljavanja aktiviraće Akt, potencirati Mdm2, i eventualno smanjiti funkciju p53 onemogućavajući njegov biološki efekat. Prema tome, ravnoteža izmedju različitih komponenata sprege odrediće izbor izmedju ćelijskog života i smrti.

Potpuno je jasno da se p53 nalazi u centru kompleksne mreže regulatornih puteva. Deo ove mreže predstavljen autoregulatornim petljama prethodno je opisan. U svakom slučaju, ma kako komplikovano izgledale ove sprege, one su znatno pojednostavljene. Verovatno je da poznati regulatorni putevi interkaliraju sa dodatnim, još neotkrivenim, kao što je ilustrovano WISP-1 proteinom koji indukovani deregulisanim beta kateninom, inhibira p53-zavisnu apoptozu. Nemoguće je predvideti eventualni biološki ishod p53 odgovora jednostavnim praćenjem jedne ili nekoliko komponenti. Trenutno raspoložive informacije ukazuju da je u normalnim ćelijama, ukupna ravnoteža izmedju suprotnih signalnih puteva, uspostavljena tako da p53 obično "pobedi". To omogućava proteinu p53 da bude efikasni integrator stresnih signala i uspešni tumor supresor. Čak i u takvim normalnim ćelijama, ova delikatna ravnoteža može biti poremećena mnoštvom faktora, uključujući i signale iz spoljašnje sredine. U ovim slučajevima, inhibicija aktiviranja p53 je poželjna, jer dopušta neophodnu ćelijsku proliferaciju i spašava ćelije neželjene smrti. Medjutim, ravnoteža u nekim slučajevima može biti permanentno pomerena, kao što se dešava kada je funkcija ARF-a smanjena, ili je PTEN deletiran ili je sam p53 mutiran. U takvim situacijama ćelija je lišena protektivnog delovanja p53, ostavljajući otvoren put nastanku kancera.

1.3. Korišćenje p53 signalnog puta u cilju poboljšanja anti-kancerskih tretmana

Analize mogućih genskih alteracija p53 uveliko se koriste u evaluaciji efikasnosti anti-kancerskih tretmana. Više od polovine poznatih mutacija u p53 genu, inaktivira normalnu funkciju proteina. Germinativne mutacije u p53 karakteristične su za nasledno oboljenje, Li-Fraumeni sindrom. p53 protein je snažan transkripcioni faktor koji se vezuje za više od 300 različitih promotorskih elemenata, menjajući na taj način ekspresiju mnogih gena (Zhao et al., 2000). Put p53-indukovane genske ekspresije može uzrokovati zastoj ćelijskog ciklusa i/ili apoptozu. Skorašnja istraživanja ukazuju da indukcija p53 počiva na osetljivoj ravnoteži

između procesa starenja i razvića kancera. Na primer, miševi sa visoko aktivnim p53 lokusom nikad ne dobijaju kancer ali pokazuju znake preranog starenja, dok miševi sa redukovanom p53 aktivnošću razvijaju kancer u ranoj dobi i umiru (Tyner et al., 2002). Iako je p53 bez sumnje tumor supresorni gen, on ne podržava doslovce Knudsen-ov model za funkcionisanje tumor supresornih gena, po kome oba genska alela moraju biti inaktivisana da bi došlo do razvića tumora. Kod Li-Fraumeni sindroma i u p53 pozitivnim/negativnim miševima, jedan wt alel nije uvek izgubljen, ukazujući da haplo-insuficijencija (redukovana forma p53 gena), može biti dovoljna za neoplastičnu transformaciju. Kompleksnost genskih alteracija p53 potiče i od toga što su mnoge i germinativne i somatske mutacije u p53 genu tačkaste mutacije. Izmenjeni protein je često eksprimiran u visokim nivoima u tumorima i može imati negativno dominantni efekat na endogeni normalni p53, ili delovati nezavisno na druge ćelijske procese. Ovu postavku podražava otkriće da su određene germinativne tačkaste mutacije povezane sa retkom naslednom prijemčivošću za adreno-kortikalni kancer (Varley et al., 1999).

U proteklih deset godina, genske i biohemijske analize p53 signalnog puta koji vodi od ćelijskih signala stresa (preko aktivacije p53), do zastoja ćelijskog rasta i apoptoze, identifikovale su mnoge ciljeve za razviće novih terapijskih pristupa. Takodje, vršena su mnoga istraživanja koja su potvrdila da su toksičnost i efikasnost mnogih rutinski korišćenih anti-kancerskih terapija visoko uslovljene p53 regulatornom putanjom. Mnogi citotoksični lekovi indukuju p53 odgovor u normalnom tkivu, dok su tumori koji zadržavaju normalnu funkciju p53 u mnogim slučajevima osetljiviji na tretman.

Transkripciona aktivnost p53 indukovana je raznim vrstama signala, uključujući hemijske oksidanse (slobodni radikali), niski ekstracelularni pH, hipoksiju i visoku temperaturu. Uobičajeni antikancerski agensi koji na sličan način oštećuju ćeliju, uključujući adriamicin, 5-fluorouracil, jonizujuće zračenje i etopozid, mogu indukovati p53 aktivnost, ukazujući da ovaj tumor supresorni put može odgovarati na egzogene agense koji suprimiraju rast tumora (Hupp et al., 2000). Uprkos činjenici da različiti agensi koji oštećuju ćeliju i same ćelijske komponente pokazuju slične osobine u regulaciji funkcije p53, ne može se uzeti nijedan pojedinačni primer da bi se spoznale sve komponente p53 regulatorne putanje. Konstruisanje genskog profila korišćenjem oligonukleotidnih mikroareja jasno je pokazalo razlike i sličnosti u produktima gena indukovanih ili represiranih delovanjem p53 proteina u različitim tipovima ćelija pod različitim uslovima (Zhao R, Genes Dev 2000). Istraživanja na ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma pokazala su da je za 5-fluorouracil-indukovanu apotozu neophodan wt p53 ali ne i njegov efektorni protein p21^{WAF1}, dok adriamicin-zavisna apotoza može biti inhibirana međusobnim delovanjem p53- p21^{WAF1} (Bunz et al., 1999). Ovi rezultati jasno ukazuju na neophodnost precizne analize p53 gena (gensko profilisanje) u cilju najboljeg odabira optimalne terapije za svakog pacijenta.

1.3.1. Regulacija funkcije p53 stabilizacijom proteina

Aktivnost wt p53 uglavnom je regulisana degradacijom p53 proteina (Oren et al., 1999). Pod normalnim uslovima, wt p53 se brzo razgrađuje proteozomima, agensima koji oštećuju DNK, inhibitorima transkripcije i u manjem stepenu agensima koji izazivaju hipoksiju kao i agensima koji deluju na mikrotubule jer uzrokuju stabilizaciju p53 i samim tim i njegovu akumulaciju. Za razliku od p53 proteina, p53 mRNA u ovim slučajevima nije indukovana. Nakon translacije p53 mRNA, blokiranje degradacije p53 rezultira akumulacijom p53. Kada se degradacija p53 i sinteza p53 (translacija) simultano blokiraju, nemoguća je akumulacija

ovog kratko živećeg proteina. Postoji pogrešno verovanje da inhibitori translacije indukuju p53. Inhibitori translacije smanjuju ekspresiju p53. Za razliku od njih inhibitori transkripcije ne spečavaju akumulaciju p53 zato što je već postojeća RNK u mogućnosti da izvrši sintezu DNK. Inhibiranjem degradacije p53, aktinomycin D na primer uzrokuje stabilizaciju p53.

Wt p53 indukuje transkripciju više gena uključujući Mdm2. Mdm2 protein, regulator degradacije p53, vezuje se za N-terminalni deo p53 proteina, prouzrokujući ubikvitinaciju i degradaciju p53 proteozomima. Vezavši za sebe više molekula ubikvitinina (Ub), p53 biva označen za degradaciju posredovanu proteozomima. Imajući u vidu da je Mdm2 produkt p53-inducibilnog gena, uspostavlja se negativna povratna sprega: p53 aktivira sopstvenu degradaciju (Blagosklonny, 2002).

Mutirani p53 se ekspimiraju u visokim nivoima zato što nije u mogućnosti da transaktivira Mdm2. Antikancerski lekovi ne mogu dalje povećavati nivo mutiranog p53. U slučajevima visoke ekspresije, egzogeni mutirani p53 može inhibirati transfunkcionisanje p53 (dominantno negativni efekat). U svakom slučaju endogeni mutirani p53 ne ispoljava dominantno negativni efekat (Blagosklonny et al., 2001). Gubitak drugog alela p53 gena neophodan je za potpunu eliminaciju funkcija wt p53 u ćelijama kancera. To rezultira stabilizacijom i overekspresijom mutiranog p53, koji zadobija nove funkcije različite od wt p53.

1.3.2. Agensi koji oštećuju DNK

Wt p53 se indukuje zračenjem (gama i UV-zračenje) i hemioterapeuticima koji oštećuju DNK uključujući one koji se koriste u kliničkoj praksi: doksorubicin, daunomicin, daktinomycin (aktinomycin D), etopozid, topotekan, mitomicin C, cis-platina, karboplatina, melfalan, hlorambucil, bisulfan, ciklofosfamid, ifosfamid, i nitrozourea. Ovi brojni lekovi su osnova standardne hemioterapije. Višestruki i preklapajući mehanizmi delovanja ovih lekova uključuju interkalaciju DNK (doksorubicin, daunomicin i daktinomycin), inhibiciju topoizomeraze II (doksorubicin, daunomicin i etopozid), inhibiciju topoizomeraze I (topotekan) i umrežavanje DNK (cis-platina i karboplatina). Melfalan, hlorambucil, bisulfan, ciklofosfamid, ifosfamid i nitrozourea su svi alkilirajući agensi koji svije citotoksične efekte ostvaruju kroz kovalentno vezivanje alkil grupa za DNK. Mnogi lekovi koji izazivaju promene na DNK (posebno u visokim koncentracijama), inhibiraju transkripciju. Prekid u lancu DNK je najčešća lezija koja indukuje aktivaciju p53. Izlaganje limfocita slobodnim radikalima azotnih oksida uzrokuje stabilizaciju wt p53 pretežno u ćelijama koje se nalaze u G1 fazi ćelijskog ciklusa, što dovodi do zastoja u G1 i apoptoze u ćelijama čiji se ćelijski ciklus nalazi posle tačke prekida (S i G2/M ćelije) (Bhatia et al., 1995). Nakon snažnog oštećenja DNK, interakcije između p53 i Mdm2 dovode do oscilaranja ravnoteže između dva proteina. ATM preko kinaza Chk2/Cds1 fosforiliše p53 na serinskim ostacima 20, 15 i 37, onemogućavajući vezivanje za Mdm2. Fosforilacija Mdm2 je jedan od načina za regulaciju stabilnosti p53. Medjutim, rezultati više studija su pokazali da fosforilacija p53 ne mora biti neophodna za stabilizaciju p53 (Blattner et al., 1999). Da bi se objasnile ove protivurečnosti, pretpostavka je da neki agensi koji oštećuju DNK indukuju p53 ne poništavanjem njegovog vezivanja za Mdm2, već negativnom regulacijom Mdm2, odnosno inhibicijom transkripcije.

1.3.3. Inhibitori transkripcije

Svi signalni putevi koje reguliše p53 konvergiraju u jednoj tački; Mdm2- posredovanoj degradaciji p53. Mutirani p53 je stabilan zato što je transkripciono neaktivan i u nemogućnosti da indukuje Mdm2 koji je neophodan za degradaciju p53 (Blagosklonny, 2002). Wt p53 se stabilise u prisustvu inhibitora transkripcije jer inhibitori transkripcije smanjuju nivo Mdm2. Aktinomycin D je antitumorski antibiotik sa osobinama DNK-oštećujućeg agensa, i snažni inhibitor transkripcije. On interkalira u DNK i interferira sa RNK polimerazama i DNK polimerazama I i II. Flavopiridol, inhibitor ciklin-zavisnih kinaza, takodje inhibira transkripciju (Bible et al., 2000). Flavopiridol se vezuje za dvolančanu DNK i indukuje wt p53. UV-zračenje i visoke koncentracije agenasa koji oštećuju DNK inhibiraju transkripciju. Etopozid, inhibitor topoizomerase II negativno reguliše Mdm2 (Arriola et al., 1999).

1.3.4. Inhibitori metabolizma RNK

Inhibitori RNK i DNK metabolizma, uključujući 5-fluorouracil (5-FU), citozin arabinozid (AraC), metotreksat i hidroksiureu (HU), su standardno korišćeni hemioterapeutici u lečenju kancera. Inhibitori metabolizma RNK uzrokuju p53-zavisni i p21-zavisni reverzibilni G1 zastoj u odsustvu detektovanog oštećenja DNK (Linke et al., 1996). Iako 5-FU dovodi do izmena u metabolizmu i DNK i RNK, promene u metabolizmu RNK iniciraju događaje koji kulminiraju ekspresijom p53. Sličnim mehanizmom i UV-zračenje inhibira transkripciju (Zeng et al., 2000). Pretpostavlja se da su mehanizmi stabilizacije p53, uzrokovani antimetabolitima pri dejstvu UV-zračenja i transkripcionih inhibitora skoro identični, jer sve ove supstance redukuju nivo Mdm2.

1.3.5. Inhibitori otpremanja p53 iz jedra

Prema prihvaćenim modelima delovanja, subćelijska lokalizacija p53 je kritična za njegovu degradaciju. Otpremanje p53 iz nukleusa je prvi neophodni korak u degradaciji p53. Mdm2 sadrži signal za uklanjanje p53 iz nukleusa i predstavlja sponu između jedra i citoplazme (Vousden et al., 2000). Degradacija p53 odigrava se u citoplazmi, iako su i p53 i Mdm2 jedarni proteini. Ubikvitin-ligazna aktivnost Mdm2 neophodna je za otpremanje p53, jer se ubikvitinacijom oslobadja sekvenca odgovorna za uklanjanje iz jedra a koja se nalazi na C-terminalnom kraju p53. Leptomycin B (LMB), antibiotik, inhibira otpremanje iz jedra onih proteina koji sadrže karakterističnu signalnu sekvencu odgovornu za ovaj proces. LMB dovodi do akumulacije p53 u jedru i njegove stabilizacije (Smart et al., 1999).

1.3.6. Hipoksija

Indukovanjem hipoksije, inhibitori angiogeneze suprimiraju rast tumora. Jaka hipoksija dovodi do stabilizacije wt p53, preko hipoksijom-inducibilnog faktora I (HIF-1) (An et al., 1998). Takodje, hipoksija negativno reguliše Mdm2, što dovodi do akumulacije p53. Kao p53 i Mdm2, HIF-1 α se degraduje proteozomima tako što Mdm-2 obeleži HIF-1 α za degradaciju (Ravi et al., 2000). Imajući u vidu činjenicu da se Mdm2 pozitivno reguliše sa p53 i da Mdm2

obeležava za degradaciju i HIF-1 α i p53, može da se predvidi sledeći redosled događaja: a) HIF-1 α dovodi do stabilizacije wt p53 uklanjanjem Mdm2 i b) wt p53 uzrokuje destabilizaciju HIF-1 α zato što wt p53 indukuje Mdm2.

1.3.6. Agensi koji deluju na mikrotubule

Wt p53 je uključen u mitotičku kontrolnu tačku ćelijskog ciklusa i postmitotički zastoje. Inhibicijom dinamike mikrotubula, lekovi koji deluju na njih uzrokuju mitotički zastoje i ćelijsku smrt. Ni mitotički zastoje ni ćelijska smrt ne zahtevaju wt p53.

Lekovi koji deluju na mikrotubule kao što su paclitaksel i vinkristin indukuju wt p53 u nekim ćelijskim linijama kancera (A549 i MCF-7) i u normalnim fibroblastima (Torres et al., 1998). Kao i drugi DNK-oštećujući agensi, lekovi koji deluju na mikrotubule stabilizuju wt p53. Za razliku od DNK-oštećujućih agenasa, lekovi koji deluju na mikrotubule ne mogu da indukuju wt p53 u prisustvu «heat shock» proteina 90, geldanamicina (Blagosklonny et al., 1995). Postavlja se pitanje šta je tačni mehanizam stabilizacije p53 lekovima koji deluju na mikrotubule? a) U mitotičkom zastoju, brojni proteini su hiperfosforilisani na ostatku serina (Blagosklonny et al., 1999). Pretpostavlja se da fosforilacija p53 može sprečiti interakciju između p53 i Mdm2. Po ovom scenariju, lekovi koji deluju na mikrotubule ne indukuju p53 u mirujućim ćelijama koje ne ulaze u mitozu. b) Delovanjem na transport p53 posredovan mikrotubulama, lekovi koji deluju na mikrotubule mogu sprečiti degradaciju p53 (Giannakakou et al., 2000). Na kraju, mitotički zastoje je povezan sa inhibicijom transkripcije koja pak sa svoje strane dovodi do stabilizacije p53. Ova tri mehanizma ne moraju biti uzajamno isključiva.

Indukovanjem p53, niske koncentracije paclitaksela mogu zaustaviti A549 ćelije u G1 i/ili G2 fazi ćelijskog ciklusa (Giannakakou et al., 2001). Paclitaksel indukuje G1 blok u fibroblastima, ali ne i u T antigen-transformisanim ćelijama sa inaktivnim p53, gde selektivno izaziva smrt transformisanih ćelija (Trielli et al., 1996).

1.4. Mutirani p53 kao terapijski cilj u ćelijama tumora

1.4.1. Genska terapija sa p53

Genska terapija u kojoj se normalni p53 gen (wt p53) uvodi u tumorske ćelije korišćenjem bilo fizičkih bilo viralnih vektora, intenzivno se izučava u prekliničkim i kliničkim modelima. Većina radova koristila je adenoviruse sa poremećajem replikacije, koji humane p53 cDNK sekvence povezuju sa jakim viralnim promotorima (Merrit et al., 2001). Iako je efikasnost bez nespecifične toksičnosti detektovana i u ćelijskim kulturama i u životinjskim model sistemima, odgovori na ovu vrstu terapije još nisu mnogo obećavajući. U svakom slučaju, u prekliničkim studijama izučavaju se različiti modeli. Ovo podrazumeva korišćenje poboljšanih vektora koji mogu da menjaju tropizam tkiva, kao i alternativne varijante p53 sekvence. Mutacije u p53 za koje je pokazano da sprečavaju njegovu oligomerizaciju sa endogenim dominantno negativnim mutantnim p53 proteinima, povećavaju njegov otpornost degradaciji, poboljšavaju termodinamičku stabilnost molekula, pospešuju njegovo uvijanje, i menjaju njegovu DNK-vezujuću aktivnost tako da interaguje mnogo snažnije sa promotorskim sekvencama proapoptotskih gena. Opisana je fuzija p53 sa VP22 proteinom herpesvirusa, što rezultira

aktivnim p53 fuzionim proteinom koji može da se širi na neinficirane okolne ćelije (Phellan et al., 1998). Kombinacija ovakvih varijanti p53 može proizvoditi molekul koji je terapijski aktivniji a ipak zadržava neophodnu specifičnost.

1.4.2. Korišćenje malih molekula inhibitora p53 odgovora

Gudkov i saradnici (Komarov et al., 1999), pokazali su da su konvencionalna hemioterapija ili zračenje tumora sa mutiranim p53 limitirane p53-zavisnom toksičnošću, indukovanoj u normalnom tkivu. Iz tih razloga traženi su inhibitori p53-indukovane transkripcije korišćenjem p53-reporter ćelijskih linija u kojima se stabilno integrisani reporter gen aktivira tretmanom doksorubicinom. Biblioteka sa više od 16000 malih molekula detaljno je skenirana u cilju nalaženja molekula koji omogućavaju normalni ćelijski rast ali se blokiraju indukcijom reporter gena hemioterapeutskim agensima. Na ovaj način identifikovano je jedinjenje pifithrin- α koje iskazuje gore navedene karakteristike. Ovo jedinjenje je aktivno *in vivo* i može zaštititi miševе od letalnog efekta jonizujućeg zračenja. Takođe sprečava gubitak dlaka kod miševa izloženih zračenju. Ovaj pristup je veoma atraktivan jer ovakva vrsta molekula može ublažiti sporedne efekte hemioterapije: gubitak kose, mijelosupresiju ili oštećenje intestinalnog trakta. Poteškoća u ovom pristupu je što ovi molekuli mogu imati promutagena svojstva. Po predloženom modelu, ćelije su bile izložene visokim dozama hemioterapeutskih agenasa, i mada su preživele, imale su veću incidencu mutacija. Jasno je da treba pronaći ravnotežu između ova dva fenomena. U svakom slučaju kod starijih pacijenata, ova ravnoteža će favorizovati korišćenje ovakvog tipa p53 regulatora (Lane et al., 2002).

1.4.3. Imitiranje funkcije nishodnog gena

Jedna od najatraktivnijih i najviše proučavanih oblasti razvoja novih terapijskih sredstava je nalaženje molekula koji imitiraju funkciju produkata gena čija je sinteza indukovana p53. Dva određena gena zaokupila su posebnu pažnju. Prvi je gen koji kodira p21 (Waf1/Sd1/Cip1). Ovaj mali protein interaguje sa ciklinima i ciklin-zavisnim kinazama kao i sa ostalim članovima CDK familije. Sintetisan je mali molekul koji imitira funkciju p21 bilo vezivanjem u ATP-vezujući džep CDK enzimske subjedinice, bilo vezivanjem za površinu ciklinskog substrata. Nekoliko ovih molekula već je ušlo u kliničke trajale (Lane et al., 2002). Druga aktivna oblast istraživanja uključuje nastojanja da se imitira aktivnost pro-apoptotskog gena koji kodira Bax. Bax deluje, makar delom kao inhibitor anti-apoptotskih proteina bcl-2 familije. Mali peptidi izvedeni iz Bax-a pokazali su aktivnost u velikom broju *in vitro* eseja, a nedavno su karakterisani mali molekuli nalik lekovima koji imitiraju interakciju Bax sa Bcl-2. Jedan od njih, antimicin A jasno pokazuje selektivnu i specifičnu toksičnost prema ćelijama koje imaju povećanu ekspresiju bcl-2 (Tzung et al., 2001).

1.4.4. Reaktivirajući p53 mutanti

Mnoge mutacije p53 gena proteina dovode do promene samo jedne amino kiseline. Ove mutacije su često senzitivne na temperaturu (ts) i imaju samo male efekte na stabilnost središnjeg, DNK-vezujućeg domena proteina. Mutirani proteini se akumuliraju u visokom

nivoima u mnogim tumorima. Već je dugo atraktivna misao o pronalaženju molekula koji mogu da se vezuju za p53 i omogućavaju njegovo uvijanje u pravilnu konformaciju. Neki raniji radovi identifikovali su peptide sa C-terminusa p53 kao i anti-p53 antitela koja u *in vitro* uslovima mogu obnoviti specifičnost vezivanja za DNK mutiranih p53 proteina.

Osetljivim fizičkim analizama DNK-vezujućeg domena proteina, identifikovani su i karakterisani peptidi izvedeni iz poznatog p53-vezujućeg proteina koji mogu stabilizovati jezgro uvijanjem mutiranih p53 proteina (Friedler et al., 2002). Saznanja o načinima uvijanja proteina omogućila su novi pristup dizajnu koji će uticati na uvijanje u toku sinteze p53. U poslednje vreme otkriveno je i drugo mesto reverzije p53 ts mutanta središnjeg domena (Liu et al., 2001). Delecija amino kiselina 15-18 p53 dovešće do toga da valin 135 ts mutant bude potpuno aktivan na temperaturi od 39°C, koja nije optimalna za uvijanje. Mutacije N-terminusa utiču na uvijanje središnjeg DNK-vezujućeg domena proteina, ukazujući na to da postoje interakcije između različitih domena p53 proteina koje još nisu potpuno objašnjene.

1.4.5. Tretman tumora sa wt p53

U slučajevima kada p53 gen nije mutiran, terapijske strategije su usmerene na aktiviranju funkcije endogenog p53 gena u tumorima. Pretpostavlja se da je p53 signalni put narušen drugim alteracijama u tumoru. Ova pretpostavka je potvrđena u više različitih slučajeva. Prvo, kod humanih papilomavirusom (HPV)-indukovanih kancera, gde ekspresija viralno kodiranog HPV E6 proteina dovodi do vezivanja E6AP E ligaze u E6-p53 kompleks (Thomas et al., 1999). Stvaranje ovog kompleksa rezultira ubikvitinacijom i degradacijom p53. Drugi slučaj je definisan otkrićem povećane ekspresije ćelijskog Mdm2 proteina u humanim sarkomima (Freedman et al., 1999). Mdm2 protein se vezuje za N-terminalni deo p53 i inaktivira njegovu funkciju kako blokiranjem funkcije transkripcionog aktivnog domena proteina tako i preuzimanjem funkcije E3 ubikvitin ligaze koja obeležava p53 za proteozomsku degradaciju. Pokazano je da mutacije u signalnim kinazama u okviru p53-signalnog puta mogu da onemoguće p53 odgovor (Caspari et al., 2000). Najjača podrška ovom zapažanju potiče od studija ATM gena (ataxia-telangiectasia). Inaktivacija ATM gena redukuje intenzitet aktivacije p53 jonizujućim zračenjem, dok još uvek omogućavaju indukovanje p53 odgovora UV-zračenjem.

Još jedan signalni put povezan sa p53 koji je često narušen u humanim tumorima je ekspresija p14^{ARF} proteina (p19^{ARF} kod miševa) (Sherr et al., 2001). Sinteza ovog malog, visoko naelektrisanog proteina indukovana je mnoštvom onkogeno koji ubrzavaju rast i proto-onkogeno, uključujući c-myc, ras i adenovirus E1A. p14^{ARF} protein aktivira p53 odgovor inhibiranjem funkcije Mdm2. Delecija gena koji kodira p19^{ARF} kod miševa dovodi do veće verovatnoće za pojavu tumora, a takodje su moguće i druge delecije ovog lokusa. Ove delecije najčešće pogađaju lokus koji kodira p16 Ink4a protein.

Razumevanje puteva regulacije nivoa i aktivnosti p53 sugerise brojne farmaceutske mete za intervenciju. Mdm2 protein je u fokusu nekoliko predloženih pristupa jer predstavlja glavni negativni regulator p53 signalnog puta, a i prirodni aktivatori odgovora funkcionišu blokiranjem degradacije p53 kroz Mdm2. ATM i CHK2 kinaze blokiraju degradaciju p53 fosforilacijom i p53 i Mdm2, dok se p14^{ARF} protein vezuje za Mdm2 i inhibira njegovu sposobnost da degraduje p53.

1.4.6. Inhibicija ekspresije Mdm2

Inhibicija ekspresije Mdm2 može dovesti do aktivacije p53 odgovora. Pokazano je da inhibicija ekspresije Mdm2 indukuje p53-zavisnu apoptozu i može imati *in vivo* antitumorsku aktivnost (Wang et al., 2001). Interesantno je da su razni generalni inhibitori transkripcije, kao i CDK inhibitor roskovitin snažni aktivatori p53-zavisne transkripcije jer u umerenim dozama smanjuju ekspresiju Mdm2 (Lu et al., 2001). p53-odgovor u ovim slučajevima može biti praćen senzitivnošću Mdm2 transkripcije na ovakve inhibitore, kao i kratkim poluživotom Mdm2 proteina i mRNK.

1.5. Apoptoza: veza između genetike kancera i odgovora na hemioterapiju

Hemioterapija kao način lečenja kancera uvedena je u kliničku praksu pre više od pedeset godina. Iako je ovaj vid terapije bio uspešan za tretman nekih tumora kao što su kancer testisa i neke vrste leukemija, njena efikasnost za lečenje epitelnih tumora dojke kolona i pluća bila je manje obećavajuća. U idealnom slučaju hemioterapijska sredstva treba samo da deluju na neoplastične ćelije smanjujući širenje tumora indukovanjem citotoksičnih i/ili citostatičkih efekata sa minimalnom "kolateralnom štetom" u odnosu na normalne ćelije. U realnim uslovima efektivnost hemioterapije smanjena je uticajem čitavog spektra faktora uključujući: sistemsku toksičnost usled nedostatka specifičnosti, suviše brz metabolizam leka, kao i postojeću i stečenu rezistentnost na lekove. Problem rezistentnosti na više lekova (multidrug resistance-MDA), je do sada najmanje razjašnjen i predstavlja najnepredvidljiviji faktor koji utiče na efikasnost hemioterapije. Imajući u vidu adaptibilnost tumorskih ćelija, verovatno je da će rezistentnost na lekove i dalje predstavljati važan klinički problem, čak i u vreme savremenih ciljanih terapeutika i individualnih terapijskih tretmana.

Da li su tumori u startu rezistentni na hemioterapijska sredstva, ili to postaju posle prvog ciklusa tretmana? Današnje razumevanje rezistentnosti na lekove potiče od boljeg razumevanja načina na koji konvencionalni lekovi zapravo ubijaju tumorske ćelije. U početku, razvoj hemioterapijskih agenasa bio je baziran na zapažanju da ćelije tumora proliferišu brže od normalnih ćelija. Na osnovu toga izabrani su lekovi koji interferiraju sa replikacijom DNK ili ćelijskim metabolizmom. Očekivano, ovi agensi su ubrzavali i deobu normalnih ćelija kostiju i želuca, smanjujući na taj način terapeutski opseg u okviru kog ovi lekovi mogu biti korišćeni. U to vreme mislilo se da rezistentnost na lekove potiče od molekularnih promena koje inhibiraju interakciju lek-meta. Otkriće da su pumpe za lekove kao na primer P-glikoprotein i intraćelijski detoksifikatori kao što su antioksidansi (glutation) pojačano eksprimirani u rezistentnim tumorskim ćelijama potvrdilo je ovu pretpostavku. (Johnstone et al., 2000).

Iako proteini koji interferiraju bilo sa akumulacijom lekova ili njihovom stabilnošću mogu doprineti kliničkoj rezistentnosti na lekove, drugi faktori koji deluju posle inicijalnog lekom-indukovanog «napada» takođe imaju važnu ulogu. Hemioterapijski agensi mogu indukovati seriju ćelijskih odgovora koji imaju uticaja na proliferaciju tumorskih ćelija i preživljavanje (Lowe et al., 2000). Verovatno najbolje proučen od ovih ćelijskih odgovora je apoptoza, fiziološki program ćelijske smrti kojim se kontroliše normalni broj ćelija u toku razvika i

bolesti. Sada su poznati mnogi molekularni događaji neophodni za aktivaciju, amplifikaciju i izvršenje apoptotskih procesa, i evidentno je da različiti lekovi mogu ubijati tumorske ćelije aktiviranjem zajedničkih apoptotskih puteva. Zaključak je da pojedinačne mutacije koje onemogućavaju apoptozu mogu dovesti do MDR.

Realizacija kojom apoptoza doprinosi antitumorskoj aktivnosti mnogih hemoterapijskih agenasa može pomoći u razumevanju nastanka rezistentnosti na lekove. Da bi tumorska ćelija ušla u progresiju, ona mora preživeti drastične strukturne i/ili metaboličke alteracije, kao i izrazito stresno mikrookruženje (hipoksija i nedostatak nutrienata. Takodje mora se izbeći antitumorski imuni odgovor domaćina. Izmenjena ekspresija ili mutacije u genima koji kodiraju ključne apoptotske proteine omogućuju ćelijama tumora povećanu mogućnost preživljavanja i urodjenu rezistentnost na hemoterapijske agense. Ova dvostruka prednost rezultira rastom i ekspanzijom neoplastičnih ćelija i može ugroziti efekat naknadne terapije.

Ukupan doprinos apoptotskih defekata kliničkoj MDR je još uvek pod znakom pitanja. U svakom slučaju prihvaćena je hipoteza da postoji uzročno-posledična veza između apoptoze i lekovima-indukovane citotoksičnosti i da ta povezanost može imati različite implikacije. Prvo, sličnost između fiziološke i lekovima-indukovane apoptoze uspostavlja jasnu vezu između razvića tumora i unutrašnje rezistentnosti na antikancerski tretman, na taj način omogućavajući biološku osnovu za objašnjenje kako genotip tumora može odrediti ishod terapije. Drugo, činjenica da poremećaji u procesu apoptoze mogu ubrzati stvaranje rezistentnosti na lekove posle interakcije lek-meta, otvara mogućnost da genotoksički agensi mogu indukovati nove genske mutacije zbog tzv. "oštećenja bez smrti" (Johnstone et al, 2002). Treće, efikasnost kojom apoptoza može eliminisati tumorske ćelije u slučaju njene indukcije konvencionalnim agensima obezbeđuje jaku racionalu za terapijske strategije koje deluju direktnije na sam proces apoptoze. Na kraju, senzitivnost normalnih ćelija na lekovima-indukovanu apoptozu može objasniti toksične efekte konvencionalne hemioterapije i ukazati na načine kako ih svesti na najmanju meru. Samo potpuno razumevanje načina na koji antikancerski agensi indukuju ćelijsku smrt, i načina na koji greške u ovim putevima ubrzavaju pojavu rezistentnosti, moći će da unapredi upotrebu hemoterapijskih agenasa do racionalnije strategije koja bi bila usmerena na svakog pacijenta individualno.

Imajući u vidu da su mnogi antikancerski lekovi identifikovani korišćenjem empirijskih modela, molekularni događaji odgovorni za njihovo dejstvo su nedovoljno poznati. Poslednjih deset godina naše razumevanje ćelijskih mehanizama koji dovode do fiziološke ćelijske smrti se u mnogome poboljšalo. Lekovi različitih struktura i specifičnosti indukuju karakteristične morfološke promene povezane sa apoptozom, i danas se zna da apoptotski putevi doprinose citotoksičnom delovanju mnogih hemioterapeutika (Lowe and Lin, 2000). Dosadašnja zapažanja ukazuju da ćelije interpretiraju lekovima indukovani napad na isti način kao i fiziološki stres, uzrokovan hipoksijom ili odsustvom faktora rasta. Pošto efikasnost apoptoze zavisi od integriteta pomenute molekularne mreže, ubijanje tumorskih ćelija antikancerskim lekovima može biti u velikoj meri indirektno.

Mutacije u p53 genu ili u okviru p53 signalnog puta produkuju MDR *in vivo* i *in vitro*, a ponovno uvođenje wt p53 u tumorske ćelije deficijentne za p53 može ponovo uspostaviti hemosenzitivnost (Wallace-Brodeur et al., 1999). U svakom slučaju p53 status nije univerzalni prediktor odgovora na terapijski tretman, delom i zbog toga mnogi lekovi ne zahtevaju intaktan p53 za svoju apoptotsku funkciju, a u nekim slučajevima gubitak p53 može čak i ubrzati lekovima indukovanu ćelijsku smrt (Herr et al., 2001).

Genske alteracije koje indukuju tumorogenezu takodje posreduju u stvaranju unutrašnje rezistentnosti na fiziološke ili nefiziološke stimuluse (lekovi) koji dovode do ćelijske smrti. Kao rezultat toga, tumori koji nikad nisu bili izloženi dejstvu lekova mogu biti nasledno rezistentni na konvencionalna hemioterapijska sredstva. Jedostavan zaključak bi bio da je tumorski genotip najvažniji parametar od koga zavisi uspešnost hemioterapije. Ovakav koncept ima značajne posledice za budućnost uspostavljanja dijagnoze i tretmana kancera, što podrazumeva racionalniji pristup hemioterapiji što zahteva kako poznavanje genskih lezija koje učestvuju u razviću tumora, tako i potpuno razumevanje molekularne osnove delovanja leka. Kakve bi bile implikacije svih ovih saznanja u smislu budućeg tretmana kancera citotoksičnim lekovima? Ako je inhibicija apoptoze neophodan događaj u tumorogenezi a poznato je da većina hemioterapijskih sredstava koristi intaktne apoptotske puteve u indukciji ćelijske smrti, iznenadjujuće je da je rezistentnost na lekove predstavlja tako veliki klinički problem. Zbog toga nova znanja o molekularnim vezama između tumorogeneze i apoptoze otvaraju nove mogućnosti za bolje definisan pristup hemioterapiji.

Mnogi konvencionalni antikancerski agensi proizvode neke oblike ćelijskih oštećenja i na taj način direktno ili indirektno oštećuju DNK. Studije koje su istraživale povezanost između povećanja frekvence mutacija p53 gena i oštećenja DNK su pokazale mogućnost da rezistentnost na apoptozu može proizvoditi genetski izmenjene ćelije. Jedno istraživanje je pokazalo da gubitak funkcije p53 povećava frekvencu genskih mutacija kod pacijenata tretiranih UV zračenjem (Corbet et al., 1999), dok druge grupe nisu pokazale takvu značajnost (Griffiths et al., 1999). Oba istraživanja su ipak pokazala da gubitak p53 povećava preživljavanje ćelija posle oštećenja DNK a takve ćelije nose dodatne mutacije. U svakom slučaju, bilo da p53 utiče ili ne utiče direktno na učestalost mutacija, on jasno eliminiše potencijalno mutirane ćelije.

Bolje razumevanje molekularnih veza između tumorogeneze, apoptoze i rezistencije na lekove obezbeđuje osnovu za novu generaciju ciljane terapije kancera. Na primer, informacije koje se tiču ključnih apoptotskih proteina, njihove regulacije, i načina na koji su izmenjeni u tumorskim ćelijama mogu biti korišćene u selekciji dizajna novih antikancerskih lekova. Potpuno poznavanje proteina i signalnih puteva neophodnih za citostatsko delovanje datog leka, kao i razumevanje molekularne osnove rezistencije na lekove, može obezbediti neophodnu informaciju za definisanje terapija usmerenih ka individualnim tumorima. Iako su neophodni još mnogi podaci, obe strategije obećavaju rezultate.

Jedna od varijacija na temu racionalnog dizajna je ideja o individualnoj terapiji gde lek zavisi od uzroka. Teoretski, ciljaniji pristup hemioterapiji uključivaće genotipizaciju individualnih tumora i određivanje profila njihove rezistentnosti na lekove nakon čega je moguć odabir agenasa koji će efektivno delovati uprkos identifikovanih antiapoptotskih lezija. Potencijal ovakvog pristupa ilustrovan je studijom koja je pokazala da su tumorske ćelije sa povišenim nivoima c-myc i wt p53 selektivno senzitivne na 5-FU (Arango et al., 2001). 5-FU ne indukuje apoptozu u ćelijama karcinoma kolona koje nemaju p53 gen (Bunz et al., 1999), a tumori koji ekspimiraju niske nivoe c-myc ili imaju mutirani p53 su relativno rezistentni na tretman sa 5-FU (Arango et al., 2001). U skladu sa rezultatima ovih studija su i rezultati faze III kliničkih trajala koji su pokazali da samo oni pacijenti sa karcinomom kolona koji sadrže povišene nivoe c-myc i wt p53 značajno odgovaraju na 5-FU tretman.

Iako je rutinska genotipizacija tumora godinama daleko od upotrebe u kliničkoj praksi, korišćenje markera rezistentnosti na lekove u smislu boljeg usmeravanja terapije kancera, već

je u manjoj ili većoj meri primenjeno. Korišćenje markera za usmeravanje terapije ili za predviđanje odgovora na tretman je zasnovano na kompatibilnosti gena, a uspešnost ovakvog pristupa povećaće se sa dobijanjem informacija o svakom tumoru pojedinačno. Vremenski okvir za aplikaciju ovakve racionalne terapije zavisice u najvećoj meri od postojeće klasifikacije molekularnih mehanizama delovanja lekova kao i od sposobnosti da se brzo definiše genski profil svakog tumora ponaosob. Noviji eksperimenti koji su koristili mikroareje da bi klasifikovali tumore na osnovu puteva genske ekspresije na pravi način su demonstrirali prednosti nove tehnologije koja će omogućiti brzo i precizno profilisanje tumora (Sorlie et al., 2001).

2. CILJ

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Da se utvrdi učestalost p53 mutacija u našoj populaciji bolesnica obolelih od karcinoma dojke, kao i njihova raspodela u okviru ispitivanih eksona.
2. Da se utvrdi povezanost p53 mutacija sa parametrima prognoze - patobiološkim osobinama tumora: limfonodalnim statusom, veličinom tumora, histološkim gradusom, histološkim tipom tumora, i statusom receptora za steroidne hormone.
3. Da se sagleda klinička upotrebljivost p53 mutacija i to u odnosu na njihov mogući prognostički i prediktivni značaj. Prognostički značaj je procenjivan kroz odnos sa parametrima prognoze i kroz povezanost p53 mutacija sa dužinom ukupnog preživljavanja (OS). Prediktivni značaj je procenjivan u odnosu na odgovor na adjuvantnu hemioterapiju, odnosno povezanošću p53 mutacija sa dužinom perioda bez ponovnog javljanja bolesti (DFI).

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Bolesnice sa primarnim operabilnim karcinomom dojke

U radu je analizirano 100 bolesnica sa primarnim operabilnim karcinomom dojke. Sve bolesnice su prošle hirurgiju kao primarni antitumorski vid lečenja. Kod svih bolesnica je prisustvo maligniteta potvrđeno histološki. U ispitivanu grupu je bilo uključeno 30 bolesnica bez prisutnih metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N_0) i 70 bolesnica koje su imale metastaze u regionalnim limfnim čvorovima u istostranoj pazušnoj jami (N_+).

Karakteristike bolesnica u odnosu na parametre domaćina tumora bile su sledeće: starost se kretala u rasponu od 31 do 51 godine, medijana 45 godina i sa ukupno 7 bolesnica mlađe životne dobi do 35 godina. U odnosu na menopauzni status 95 bolesnica je u momentu postavljanja dijagnoze bilo u premenopauzi, dok je 5 bolesnica bilo u perimenopauzi.

Karakteristike bolesnica u odnosu na parametre tumora prikazane su u Tabeli 1. Za svrstavanje bolesnica u određene grupe korišćena je TNM klasifikacija UICC-a (veličina tumora, limfonodalni status, odsustvo udaljenih metastaza) i klasifikacija po Ričardson i Blumu (histološki gradus) (Bloom and Richardson, 1975). U TN klasifikaciju uvršćeni su podaci dobijeni histološkim nalazom. Odsustvo udaljenih metastaza je kod svih bolesnica utvrđeno klinički i pregledima koji se zahtevaju *Protokolom za dojku* (radiografija kostiju i pluća, ultrazvuk jetre itd).

Praćenje bolesnica: bolesnice su praćene u vremenskom intervalu od 6 do 127 meseci, sa medijanom od 48 meseci.

Adjuvantna terapija: 69/70 bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima bilo je podvrgnuto adjuvantnoj hemioterapiji, dok je jedna bolesnica sa prisutnim jednim metastatskim limfnim čvorom (N_+) bila ostavljena bez dodatne sistemske terapije. Medjutim, jedna od bolesnica bez prisutnih metastaza u limfnim čvorovima (N_0) bila je uključena na adjuvantnu hemioterapiju, s obzirom da se radilo o bolesnici sa veličinom tumora T_3 , tako da je grupu bolesnica koja je primala adjuvantnu hemioterapiju činilo ukupno 70 bolesnica. 65/70 bolesnica je primilo CMF intravenski modifikovani tretman (ciklofosfamid 600 mg/m^2 , metotreksat 40 mg/m^2 i 5-fluorouracil 600 mg/m^2) u 6 ciklusa, dok je 5 bolesnica bilo podvrgnuto FAC adjuvantnoj hemioterapiji (5-fluorouracil 500 mg/m^2 , adriablastin 50 mg/m^2 i ciklofosfamid 500 mg/m^2 u takodje 6 ciklusa. Lečenje je obavljeno po režimu predviđenom *Protokolom za lečenje karcinoma dojke* (IORS).

FAC hemioterapiji su bile podvrgnute one bolesnice koje su prema klasičnim parametrima prognoze imale agresivniju formu bolesti (više od 4 regionalna metastatska limfna čvora) i bile su u mlađem životnom dobu u momentu uspostavljanja dijagnoze karcinoma dojke.

Tabela 1. Karakteristike bolesnica u odnosu na parametre tumora

	Broj (n)
<u>Veličina tumora</u>	
T ₁	52
T ₂	45
Ostalo	3
<u>Limfonodalni status (N)</u>	
N ₀	30
N ₊	70
<u>Histološki tip</u>	
Invazivni duktalni tip	61
Invazivni lobularni tip	26
Ostalo	13
<u>Histološki gradus</u>	
I	11
II	79
III	10
<u>Status steroidnih receptora</u>	
ER+PR+	34
ER-PR+	11
ER+PR-	17
ER-PR-	38
<u>Prisustvo udaljenih metastaza</u>	
M ₀	100
M ₊	0

3.1.1. Grupa bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N₀)

U ovu grupu je bilo uključeno ukupno 30 bolesnica. Starost bolesnica se kretala u intervalu od 31 do 51 godine, mediana 45 godine. Svih 30 bolesnica je bilo premenopauzno u momentu uspostavljanja dijagnoze karcinoma dojke. Bolesnice su bile praćene u intervalu od 10 do 120 meseci sa medijanom 49 meseci.

Karakteristike bolesnica u odnosu na parametre tumora prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Karakteristike N₀ bolesnica u odnosu na parametre tumora

	Broj (n)
<u>Veličina tumora</u>	
T ₁	19
T ₂	11
Ostalo	0
<u>Histološki tip</u>	
Invazivni duktalni tip	17
Invazivni lobularni tip	8
Ostalo	5
<u>Histološki gradus</u>	
I	6
II	22
III	1
Ostalo	1
<u>Status steroidnih receptora</u>	
ER+PR+	9
ER-PR+	5
ER+PR-	4
ER-PR-	12
<u>Prisustvo udaljenih metastaza</u>	
M ₀	30
M ₊	0

3.1.2. Grupa bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (N₊)

U ovoj grupi smo analizirali 70 bolesnica. Parametri domaćina tumora uključivali su godine starosti (opseg između 31 i 59 godina, medijana 44 godine) i menopauzni status (65 premenopauznih i 5 perimenopauznih bolesnica). Bolesnice su bile praćene u intervalu od 6 do 127 meseci, medijana 47 meseci.

Parametri tumora u ispitivanoj grupi prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike N+ bolesnica u odnosu na parametre tumora

	Broj (n)
<u>Veličina tumora</u>	
T ₁	33
T ₂	34
Ostalo	3
<u>Histološki tip</u>	
Invazivni duktalni tip	44
Invazivni lobularni tip	18
Ostalo	8
<u>Histološki gradus</u>	
I	5
II	56
III	9
<u>Status steroidnih receptora</u>	
ER+PR+	25
ER-PR+	6
ER+PR-	13
ER-PR-	26
<u>Prisustvo udaljenih metastaza</u>	
M ₀	70
M ₊	0

3.2. Određivanje koncentracije receptora za estrogen i progesteron

Koncentracija receptora za estrogen i progesteron karcinoma dojke određivana je biohemijskom metodom na osnovu stavova i preporuka EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer - Evropska organizacija za istraživanje i lečenje raka) (EORTC, 1980). Metoda se bazira na vezivanju radioaktivno obeleženog steroidnog hormona za receptore prisutne u citosolu malignih ćelija dojke. Ovo vezivanje karakteriše se konstantom asocijacije/disocijacije koja izražava specifičnost reakcije i predstavlja meru afiniteta vezivanja hormona za receptor. Ovom metodom mogu se detektovati samo slobodni receptori tj. oni receptori za koje nisu vezani odgovarajući endogeni steroidni hormoni.

Intra-laboratorijska standardizacija metode radjena je periodično pod rutinskim laboratorijskim uslovima sa uzorcima tkiva uterusa krave (Nikolić-Vukosavljević et al, 1998). Tkivo je prethodno pretvoreno u prah i tako je čuvano na -196°C.

Biohemijska metoda za određivanje steroidnih hormona obuhvata sledeće postupke :

- uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke
- homogenizaciju tkiva i izdvajanje frakcije citosola malignih ćelija
- reakciju vezivanja hormona za receptore prisutne u citosolu malignih ćelija
- odvajanje viška nevezanog (slobodnog) hormona
- određivanje radioaktiviteta u β - scintilacionom brojaču
- analizu rezultata uz upotrebu Scatchard-ovog modela za izračunavanje koncentracije steroidnih hormona
- Određivanje koncentracije proteina u uzorku

3.2.1. Uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke

Neposredno po hirurškom odstranjenju iz dojke, pregledom materijala patolog izdvaja reprezentativni uzorak malignog tkiva mase od 200 mg do 1 g za analizu sadržaja steroidnih receptora. U tom vremenskom intervalu koji ne traje duže od 15 min tkivo karcinoma se nalazi na ledenoj ploči zbog termolabilnosti receptora. Do momenta određivanja sadržaja receptora, uzorci tumora se čuvaju u tečnom azotu.

3.2.2. Homogenizacija tkiva i izdvajanje citosolne frakcije karcinoma dojke

Zbog termolabilnosti receptora za estrogen pulverizacija tkiva zaledjenog u azotu pokazala se kao metod izbora (Hahnel, 1986).

Homogenizacija je postupak razaranja integriteta tumorskog tkiva. Prethodno se na temperaturi tečnog azota uzorak mehaničkim putem pretvori u prah a zatim se homogenizuje u fosfatnom puferu pH 7,4 - 7,7 (5×10^{-3} M fosfatni pufer , 20% glicerol , 1 mM monotioglicerol i 1,5 mM EDTA) na temperaturi od 0 do 4°C u mikrodismembratoru. Dobijena suspenzija uzorka tumora prebacuje se u fosfatni pufer istog sastava na temperaturi ledenog kupatila a potom centrifugira na 800 - 1000 g na +4°C u toku od 30 min. Supernatant dobijen ovim centrifugiranjem sadrži neprečišćenu frakciju citosola dok se na dnu nalazi grubi jedarni talog. Nakon ultracentrifugiranja na 100 000 g/ 60 min/ +4°C (ultracentrifuga BECKMAN , L-5-50) dobijaju se membranska frakcija u talogu (jedarni talog koji je dalje korišćen za izolaciju DNK), i citosolna frakcija u supernatantu. Sadržaj receptora za steroidne hormone određuje se u citosolnoj frakciji karcinoma.

3.2.3. Reakcija vezivanja hormona za receptore prisutne u citosolu malignih ćelija

Određivanje receptora za steroidne hormone biohemijskom metodom omogućila je komercijalna upotreba radioaktivno obeleženih hormona visoke specifične aktivnosti.

Za određivanje koncentracije receptora za estrogen korišćen je tricijumom obeleženi 17 β -estradiol (AMERSHAM, England) specifične aktivnosti oko 100 Ci/mmol u rastućim koncentracijama od 2 do 32 x 10⁻¹⁰ M. Kao kompetitivni hormon korišćen je sintetski estrogen dietilstilbestrol (DSB) u 100 puta većim koncentracijama (od 2 do 32 x 10⁻⁸ M).

Receptor za progesteron određivan je u prisustvu tricijumom obeleženog sintetskog progesterona ORG 2058 (AMERSHAM, England) specifične aktivnosti oko 50 Ci/mmol. U eseju su upotrebljavane rastuće koncentracije ³H - ORG 2058 od 4 do 64 x 10⁻¹⁰ M. Neobeleženi ORG 2058 u 200 puta većim koncentracijama korišćen je kao kompetitivni hormon (od 2 do 32 x 10⁻⁸ M).

Citosol tumorskih ćelija tumora sadrži proteine sa visokim afinitetom ($K_d < 1\text{nM}$) i proteine sa niskim afinitetom ($K_d > 30\text{ nM}$) vezivanja za steroidne hormone. Ukupno vezivanje hormona je vezivanje za proteine kako sa visokim tako i sa niskim afinitetom vezivanja. Nespecifično vezivanje hormona je vezivanje za proteine sa niskim afinitetom. Razlika između ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona je specifično vezivanje hormona za receptore, odnosno proteine koje karakteriše visoka konstanta afiniteta vezivanja hormona. Određivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji, odnosno međusobno isključivom vezivanju obeleženog sa neobeleženim hormonom za molekule receptora.

Ukupno vezivanje hormona određivano je u 0,200 ml citosola poznate koncentracije proteina (0,3 - 2 mg/ml) u prisustvu 0,025 ml pet različitih rastućih koncentracija visokospecifično obeleženog hormona i 0,025 ml fosfatnog pufera. Nespecifično vezivanje hormona određivano je u identičnim uslovima u pogledu obeleženog hormona, ali umesto 0,025ml fosfatnog pufera u sistem se dodaje po 0,025 ml pet rastućih koncentracija neobeleženog hormona. Ova reakcija mešanja receptora iz citosola i hormona odvija se na temperaturi hladnog vodenog kupatila (0 do 4°C). Potom sledi inkubacija u trajanju od 18 h na +4°C, a to je vreme neophodno za odigravanje reakcije vezivanja hormon-receptor, jer je pokazano da je reakcija između estradiola i njegovog receptora zavisna od temperature i vremena (Hahnel, 1986).

3.2.4. Odvajanje viška nevezanog (slobodnog) hormona

Za razdvajanje vezanog i nevezanog hormona koristi se aktivni uglj (norit A, SIGMA, Germany) koji je obložen dekstranom T-70 (PHARMACIA, Swede). Oblaganje uglja dekstranom se vrši da bi se sprečio pristup velikih molekula površini aktivnog uglja i da bi se dozvolilo samo malim molekulima da budu adsorbovani. Postupak oblaganja uglja sa dekstranom se izvodi na temperaturi od 4°C oko 12 h uz mešanje na magnetnoj mešalici. Dodavanjem 0,500 ml reagensa (0,25 % norit A, 0,025 % dekstran u 0,01 M Tris puferu pH = 8,00) u 0,250 ml ispitivanog uzorka u okviru analize ukupnog, tako i analize nespecifičnog vezivanja, izvodi se adsorpcija slobodnog hormona. Reakcija razdvajanja izvodi se na temperaturi vodenog kupatila (0 - 4°C) u trajanju od 30 min uz povremeno mešanje, i zasniva se na adsorpciji slobodnog hormona na čvrstu fazu Norit-A obloženog dekstranom T-70. Dužina inkubacije koja omogućava razdvajanje kritičan korak u ovoj analizi. Ekvilibrijum se postiže posle 20 min.

Taloženje aktivnog uglja koji je adsorbovao nevezani hormon postiže se centrifugiranjem na 2000 - 3000 g/30 min/+4°C. Alikvoti supernatanta (0,200 ml) koji sadrže kompleks hormon-receptor odvajaju se za scintilaciono merenje radioaktiviteta.

3.2.5. Odredjivanje radioaktiviteta u β scintilacionom brojaču

U daljem postupku odredjuje se radioaktivitet, odnosno broj dezintegracija u minuti obeleženog hormona. Scintilaciono merenje radioaktivnosti podrazumevalo je merenje alikvota supernatanta u scintilacionoj tečnosti (0,4 % PPO i 0,005 % POPOP u toluolu). Po 0,200 ml supernatanta stavlja se u 6 ml ove tečnosti. Merenje je vršeno u β scintilacionom brojaču BECKMAN LS 7000. Merenje je i ukupni radioaktivitet dodatog obeleženog hormona u svih pet koncentracija koje su "ponudjene" svakom eksperimentalnom uzorku. Za merenje ovih "totala" T u scintilacionu tečnost je dodavano po 0,025 ml rastućih koncentracija obeleženih hormona.

3.2.6. Analiza rezultata - izračunavanje koncentracije receptora za stroidne hormone

Sadržaj receptora za estrogen i progesteron odredjen je po Scatchard-ovom modelu za izračunavanje koncentracije receptora za steroidne hormone (Scatchard, 1949). Koncentracija receptora izražena je kao broj molova receptora po mg proteina citosola ćelija malignog tumora dojke.

3.2.7. Odredjivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je odredjena u citosolu po metodi Lowry-a (Lowry et al., 1951). Ova mikrometoda se bazira na dve hemijske reakcije : biuretskoj reakciji proteina sa bakarnim jonom u baznoj sredini i redukciji fosfo-molibdenskog-fosfo-volframovog reagensa (Folin-Ciocalteu-jev fenolni reagens) tirozinom i triptofanom prisutnih u proteinu. Apsorbanca se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 660 nm. Dobijene vrednosti se preračunavaju pomoću standardne krive. Za dobijanje standardne krive koriste se standardi - vodeni rastvor kristalnog bovin serum albumina (BSA) u koncentracijama 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 i 250 μ g/ml. Eksperimentalne vrednosti očitane sa standardne krive podešavaju se za korišćena razblaženja i izražavaju se u mg/ml.

3.3. Izolacija DNK iz uzoraka karcinoma dojke

DNK je izolovana fenol-hloroformskom metodom iz jedarnog taloga uzoraka karcinoma dojke (Maniatis and Sambrook, 1989). Postupak homogenizacije tumora i dobijanja jedarne frakcije prethodno je opisan u poglavlju o određivanju koncentracije steroidnih receptora. Sam postupak izolacije DNK sastoji se iz nekoliko koraka:

3.3.1. Digestija jedarnog taloga sa proteinazom K

Skalpelom se odseče deo zaledjenog jedarnog taloga i prebaci u eppendorf epruvetu zapremine 1,5ml. Zatim se u eppendorficu redom dodaje:

- 400 μ l digestionog pufera (100mM NaCl, 10mM Tris, 25mM EDTA, pH=8), koji lizira ćelijske membrane
- proteinaza K do finalne koncentracije 0,1 μ g/ μ l; dodato je 40 μ l proteinaze K koncentracije 10mg/ml
- SDS do finalne koncentracije 0,5%; 20 μ l 10% rastvora SDS-a. SDS kao svaki deterdžent denaturiše proteine i olakšava izolaciju DNK.

Epruvete se zatvore i ostave da se inkubiraju preko noći u vodenom kupatilu na 37°C. Sutradan se uzorcima doda ista količina proteinaze K i SDS, ostave se u vodenom kupatilu 1h na 56°C, potom se opet prebace na 37°C i digestija nastavi još jedan dan.

3.3.2. Izolacija DNK fenol-hloroformskom metodom

Za sam proces izolacije DNK iz tumorskog tkiva, korišćen je komercijalni fenol saturisan Tris-om, pH=8 (Sigma). Smeša za izolaciju sadrži fenol: hloroform: izoamilalkohol u odnosu 2,5:2,4:0,1. Postupak je podeljen u nekoliko faza:

- u uzorak u kome je izvršena digestija dodaje se 400 μ l (zapreminski odnos 1:1) gore pomenute fenolske smeše. Epruvete se zatvore, promešaju na vorteksu a potom se centrifugiraju 7min na 8000 rpm na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja u eppendorfici se jasno izdvajaju dve faze odvojene belim prstenom u kome se precipitirani proteini. Pipetom se pažljivo pokupi gornja faza (supernatant) neposredno iznad belog prstena i prebaci u čistu epruvetu. U supernatantu se nalazi izolovana DNK.
- u ovako izdvojeni supernatant dodaje se ista količina fenolske smeše i prethodno opisani postupak ponovi. Ovaj korak se ponavlja sve dok se ne izgubi beli proteinski presten u medjufazi.
- Sledeći korak je oslobadjanje od fenola. U supernatant se dodaje smeša hloroform: izoamilalkohol u zapreminskom odnosu 2,4:0,1 i centrifugira pod istim uslovima. Pipetom se odvoji supernatant.
- Supernatant se prebaci u čistu epruvetu i u nju se doda 7,5M amonijuma acetat u deset puta manjoj količini u odnosu na zapreminu supernatanta (40 μ l) kao i 2,5 puta veća zapremina

hladnog apsolutnog etanola. Epruvete se ostave preko noći na -20°C da bi se izvršilo taloženje DNK.

- Uzorci se direktno iz friza prebacuju u minifugu i centrifugiraju 10 min pri brzini 12000 rpm na 4°C. Supernatant se pažljivo dekantuje a u pelet se doda 100 µl hladnog apsolutnog etanola i centrifugira 3 min pod istim uslovima. Supernatant se dekantuje a epruvete se ostave otvorene u suvom termostatu na 37°C kako bi se pelet osušio.
- Izolovanoj DNK koja se nalazi u talogu, dodaje se 100 µl sterilne destilovane vode, i epruvete ostave preko noći u vodenom kupatilu na 37°C, što omogućava potpuno rastvaranje DNK.

3.3.3. Odredjivanje koncentracije izolovane DNK

Koncentracija izolovane DNK se odredjuje spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 230, 260, 280 i 320 nm. DNK ima maksimum apsorpcije na 260 nm, proteini na 280nm, tako da odnos apsorbanci A_{260nm}/A_{280nm} predstavlja meru kavaliteta i čistoće izolovane DNK. Poželjno je da odnos apsorbanci bude veći od 1,8. Vrednosti apsorbance na 230 i 320 nm trebalo bi da budu što manje jer na ovim talasnim dužinama apsorbuju soli i druge neželjene nečistoće. Koncentracija izolovane DNK se izračunava po formuli:

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260nm} \times R \times 50 \times OP}{1000}$$

R - korišćeno razblaženje

OP- optički put = 1

50- konstanta pri izračunavanju koncentracije genomske DNK

3.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze, PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) je pionirska metoda za *in vitro* amplifikaciju nukleinskih kiselina (Saiki et al, 1985) i kao takva predstavlja najpopularniju i najčešće korišćenu tehniku, kako u cilju napretka fundamentalnih istraživanja tako i u komercijalne svrhe (Romac et al., 1999).

U toku PCR reakcije ciljna sekvenca DNK amplifikuje se 10^6 puta u toku reakcije koja se sastoji iz repetitivnih ciklusa, a traje otprilike dva sata. Dva oligodeoksinukleotidna prajmera (prisutni u velikom višku u odnosu na ciljnu DNK) lepe se za suprotne lance DNK. Prajmerima se ograničava deo DNK koji se kopira, tako da imamo tačno dirigovanu sintezu striktno određenog, željenog dela DNK. Za replikaciju DNK je dakle potrebna DNK matrica (jednolančana denaturisana DNK) koju želimo da kopiramo, prajmeri, gradivni elementi-nukleotidi, i enzim koji katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa ciljnom DNK. Ovaj enzim je termostabilna Taq polimeraza. Jedan ciklus PCR-a čine sledeće reakcije:

- denaturacija DNK matrice
- hibridizacija prajmera sa matricom
- elongacija prajmera (katalizovana Taq polimerazom)

Denaturacija matrice se obavlja inkubacijom DNK na 95°C. Hibridizacija prajmera sa komplementarnom sekvencom odvija se na temperaturi od 42-65°C u zavisnosti od dužine i nukleotidne sekvence prajmera. Elongacija prajmera, tj. ugradnja nukleotida na 3' krajeve prajmera se odvija na 72°C u prisustvu Taq polimeraze.

Uspešnost PCR reakcije podrazumeva pažljivo planiranje mnogih detalja, što najviše zavisi od specifične sekvence koja se amplifikuje. Pre uvođenja ove metode u laboratoriju neophodno je optimizovati PCR sistem.

3.4.1. Optimizacija PCR sistema

- Odabir prajmera i ciljnih sekvenci DNK

Prajmeri su obično nukleotidi dužine 15-30 nukleotida i sadrže 45-55% G-C. Dužina prajmera i G-C sastav delimično određuju temperaturu hibridizacije prajmera sa matricom. Dužina prajmera veća od 15 nukleotida osigurava da ne dodje do nespecifične hibridizacije sa ne-ciljnom DNK.

- Odabir temperaturnog profila

Temperatura denaturacije mora da bude dovoljno visoka da u potpunosti denaturiše ciljnu sekvencu. Ta temperatura zavisi od G-C sastava i dužine ciljne sekvence. Iako su za denaturaciju dovoljne sekunde, u toku PCR-a uzorci se obično drže 1 min na ~ 95°. Duža inkubacija na višim temperaturama nepotrebno smanjuje stabilnost Taq polimeraze.

Temperatura hibridizacije treba da bude maksimalna temperatura na kojoj je ova hibridizacija moguća. Ona zavisi od dužine i koncentracije prajmera, G-C sastava, koncentracije soli (KCl i MgCl₂), i koncentracije Taq polimeraze. Visoka temperatura hibridizacije minimalizuje nespecifičnu amplifikaciju. Obično je temperatura hibridizacije od 50-70°C. Poslednja reakcija u PCR amplifikaciji je elongacija prajmera i ona se obično izvodi na 72°C, što je i optimalna temperatura za završnu reakciju Taq polimeraze. Imajući u vidu da većina polimeraza za minut produžava ekstenziju za oko 400 nukleotida, elongacija u trajanju 1-2 minuta je dovoljna za veći deo ciljnih sekvenci ispitivane DNK.

Pošto Taq polimeraza ispoljava najveću aktivnost u temperaturnom intervalu 50-70°C, u velikom broju slučajeva hibridizacija prajmera i elongacija mogu biti kompletirane u toku zajedničkog koraka hibridizacije (annealing). Jednostavni dvostepeni PCR ciklus (denaturacija i annealing/elongacija) značajno skraćuje vreme reakcije. Ukupan broj ciklusa limitiran je minimalnim brojem istih, neophodnih za detekciju niže koncentracije ciljne DNK. U svakom slučaju veći broj ciklusa nepotrebno povećava nespecifičnu amplifikaciju, što otežava detekciju specifičnog produkta.

- Reagensi i njihove optimalne koncentracije

PCR je složeni kompleks reakcija i kao takav uslovljen je međusobnim interakcijama mnogih reagenasa u specifičnim koncentracijama. Koncentracije soli (KCL i MgCl₂) delimično određuju temperaturu annealing-a. U svakom slučaju koncentracije soli utiču na aktivnosti Taq polimeraze: njeno vezivanje za DNK, stepen elongacije i procesivnosti, što se predstavlja brojem nukleotida sintetisanih DNK polimerazom pre nego što se ona odvoji od elongacionog kompleksa.

Optimalna koncentracija MgCl₂ zavisi od ciljne sekvence i ona se mora odrediti empirijski, tj. eksperimentalno postepeno povećavajući koncentraciju MgCl₂ za 0,1μM. Deoksinukleozid trifosfati NTP_s vezuju MgCl₂ i samim tim menjaju njegovu koncentraciju. Ukupna dNTP koncentracija je obično 0,8μM.

Koncentracija termostabilne DNK polimeraze (u većini slučajeva 0,5-5 jedinica po uzorku), mora biti dovoljno visoka da uspešno okonča elongaciju prajmera. Iako Taq polimeraza u većoj koncentraciji poboljšava ekstenziju prajmera, takodje povećava i nespecifičnu elongaciju samog produkta, rezultirajući background amplifikacijom. Prema tome količina DNK polimeraze treba da bude na neophodnom minimumu za izvršenje reakcije. Koncentracija prajmera od 0,1μM je dovoljna za većinu sistema, mada je dozvoljen rang od 0,05 do 1μM a što treba ispitati u svakom pojedinačnom eksperimentalnom sistemu.

Na tržištu je dostupno više vrsta komercijalnih Taq polimeraza, mada treba voditi računa da se kupuju proizvodi od firme koje poseduju licencu za proizvodnju i distribuciju ovih hemikalija. U ovom trenutku najrenomiraniji proizvođač reagenasa za molekularnu biologiju je Applied Biosystem, koji stalno poboljšava performance termostabilne DNK polimeraze. Trenutno najprodavanija Taq polimeraza je Hot Start polimeraza upravo ove firme koja nespecifičnu amplifikaciju svodi na najmanju moguću meru.

- Redukovanje nespecifične amplifikacije

Sekvence prajmera su izabrane tako da nespecifičnu amplifikaciju, potekli od nespecifične hibridizacije za ne-ciljne sekvence ograničene homologije, svode na minimum. Nespecifična amplifikacija se češće javlja u uzorcima koji sadrže visoke koncentracije DNK (>1μM). U svakom slučaju nespecifična amplifikacija može smanjiti ciljno-specifičnu amplifikaciju, kompeticijom za DNK polimerazu. Visoka temperatura hibridizacije (annealing-a) redukuje ovaj problem.

- Dekontaminacija amplifikata

Visoko optimizovan PCR sistem može detektovati 1-10 molekula ciljne DNK. Ovako ekstremna osetljivost znači da se mora strogo paziti da ne dodje do kontaminacije uzorka, koja je moguća čak i zaostalim amplifikatima koji su se zadržali u laboratorijskoj sredini. Amplifikati predstavljaju glavni izvor kontaminacije jer se nalaze u mnogo većoj koncentraciji od ciljne DNK. Laboratorije rešavaju ovaj problem tako što fizički odvajaju prostoriju za

izvodjenje PCR reakcije od prostorije za detekciju amplifikata. Ako do kontaminacije ipak dodje, razvijene su specijalne metode dekontaminacije.

3.4.2. PCR procedura – umnožavanje 5,6,7, i 8 eksona p53 gena

Za PCR amplifikaciju 5-8 eksona, p53 gena više od polovine uzoraka korišćen je AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, AP). PCR Master Mix sadrži sve hemijske reagensne neophodne za reakciju amplifikacije, osim prajmera i templata (ciljne DNK). Upotreba ovog Master Mix-a zasniva se na Hot Start tehnici, korišćenjem Hot Start AmpliTaq Gold DNA polimeraze. Već duže razvijana od strane AP, Hot Start hemijska tehnika povećava senzitivnost, specifičnost i prinos PCR produkata. Zahvaljujući činjenici da je većina hemikalija već izmešana u svojim optimalnim koncentracijama u Master Mix-u, kontaminacija u toku PCR procesa je svedena na najmanju moguću meru, što značajno olakšava i kontrolu kvaliteta. Korišćenjem Master Mix-a takodje se smanjuje vreme izvodjenja eksperimenta i potrošnja laboratorijske plastike.

AmpliTaQ Gold je hemijski modifikovana standardna Ampli Taq polimeraza. Nova, poboljšana polimeraza je neaktivna u dodiru sa hemijskim reagensima, učesnicima PCR amplifikacije. Ova neaktivnost omogućava veću fleksibilnost u postavljanju eksperimenta kao i mešanje PCR reagenasa na sobnoj temperaturi. Zbog inaktivnosti enzima u toku postavljanja reakcije i prvog kruga PCR-a, neće doći do nespecifične amplifikacije prajmera na temperaturama annealing-a koje su ispod optimalnih. AmpliTaq Gold DNA polimeraza se aktivira visokom temperaturom, većom od temperature annealing-a, što se automatski postiže tzv. «Hot» startom. Gold DNA polimeraza može biti parcijalno ili potpuno aktivirana u toku posebnog pre-PCR koraka zagrevanja (Hot Start), ili se postepeno aktivira u toku termalnog ciklusa (tzv. «Time Release» tehnika). Obe tehnike i Hot Start i «Time Release» poboljšavaju amplifikaciju većine DNK templata, kako smanjivanjem nespecifične amplifikacije tako i povećanjem specifične amplifikacije ciljnih sekvenci.

Visoka nespecifična amplifikacija i niska specifičnost produkta mogu da se dese u PCR sistemima, kada se reakcione komponente mešaju na niskim ili permisivnim temperaturama (4-25°C), (Chou et al. 1992). Ovo se takodje dešava i u toku prvog kruga ciklusa kada se reakcija odigrava na suboptimalnim annealing temperaturama. Na ovim temperaturama, standardni enzim je aktivan i moguća je nespecifična amplifikacija prajmera. Ovakvi nespecifični konstrukti se u toku sledećih ciklusa i dalje amplifikuju, što na kraju rezultira oligomerima prajmera. Ovakvi produkti otežavaju detekciju specifičnih ciljnih traka pri analizi gela i smanjuju preciznost kvantitativne analize PCR produkata i njihovog daljeg sekvenciranja.

AmpliTaQ Gold Master Mix se distribuira u uobičajenoj 2x koncentraciji kako bi se omogućilo lakše razblaživanje pri dodavanju templata i prajmera. Sadrži sledeće komponente:

- AmpliTaq Gold DNA polimerazu, 250 U (0,05 U/ μ l)
- GeneAmp PCR Gold pufer; 30mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH 8,05
- dNTP, svaki u koncentraciji 400 μ M

- MgCl₂, 5mM
- Stabilizatore.

Svaku amplifikaciju treba početi sa dovoljnim brojem kopija templata, kako bi se dobio jasni signal posle 30 ciklusa. U svakom slučaju količina DNK treba da bude manja od 1 µg u 50µl reakcione smeše. U svim našim eksperimentima, početna količina DNK templata bila je 0,6 µg/50 µl . U ovom radu, za amplifikaciju eksona 5-8 p53 gena korišćeni su prajmeri firme Applied Biosystems. Njihova sekvenca, dužina dobijenog amplifikata kao i uslovi pod kojim je izvršena PCR reakcija dati su Tabeli 4.

Tabela 4. Nukleotidne sekvence prajmera, dužine amplifikovanih fragmenata i uslovi PCR reakcije korišćeni za umnožavanje eksona 5-8 p53 gena.

Ekson	Sekvenca prajmera	Dužina amplifikata	Uslovi PCR-reakcije
5 _s	5'TGTTCACTTGTGCCCTGACT3'	268bp	95°C 5 min
5 _{as}	5'CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG3'		
6 _s	5'TGGTTGCCCAAGGGTCCCCAG3'	223 bp	35 ciklusa:
6 _{as}	5'GGAGGGCCACTGACAACCA3'		
7 _s	5'ACTGGCCTCATCTTGGGGCT3'	171 bp	95°C 1 min
7 _{as}	5'TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC3'		
8 _s	5'TAAATGGGACAGGTAGGACC3'	230 bp	60°C 1 min
8 _{as}	5'TCCACCGCTTCTTGTCCTGC3'		

3.4.3. Diferencijalni PCR-amplifikacija c-myc gena

Amplifikacija c-myc gena i kontrolnog D2R (dopamin D2 receptor) gena izvedena je korišćenjem diferencijalnog PCR-a (Abou-Ellela et al., 1996). Diferencijalni PCR se zasniva na simultanoj amplifikaciji dve ciljne sekvence u istoj reakcionoj smeši, pri čemu relativna količina PCR produkata ukazuje na relativni broj gena. Sekvence prajmera za c-myc i D2R, dužine amplifikata i uslovi PCR-a dati su u Tabeli 5.

Tabela 5. Nukleotidne sekvence prajmera, dužine amplifikovanih fragmenata i uslovi PCR reakcije korišćeni za analizu amplifikacije c-myc.

Gen	Sekvenca prajmera	Dužina amplifikata	Uslovi PCR-reakcije
c-myc	5'GCTCCAAGACGTTGTGTGTTTCG3'	150 bp	95°C 2 min
	5'GGAAGGACTATCCTGCTGCCAA3'		35 ciklusa:
D2R	5'CCACTGAATCTGTCCTGGTATG3'	110 bp	95°C 1 min
	5'GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG3'		50°C 1 min
			72°C 1 min

3.5 Detekcija PCR produkata agaroznom gel elektroforezom

Agarozna gel elektroforeza je jednostavna i visoko efikasna metoda za razdvajanje, identifikaciju i prečišćavanje DNK fragmenata veličine 0,5-25 kb. Molekuli DNK pod uticajem električnog polja putuju kroz agarozni gel. Za molekul DNK, agarozni gel predstavlja set pora različitih veličina. Mali molekuli prolaze lako kroz većinu pora i kreću se brže kroz gel. Veći molekuli imaju tendenciju da se sažimaju ili menjaju konformaciju pri prolasku kroz manje pore, što rezultira njihovim sprijim kretanjem od manjih molekula. Pokretljivost molekula je uslovljena frakcijom pora kroz koje se lako prolazi, proces poznat kao «prosejavanje». Molekuli DNK veći od određene kritične mase moraju se sažimati i pri prolasku kroz velike pore i na taj način ostaju «zaglavljani» u gelu. DNK molekuli u ovom opsegu veličina, svi migriraju istom brzinom što se označava kao «limitirana pokretljivost». Kod uobičajene gel elektroforeze limitirana pokretljivost se dešava kod veličine fragmenata 20-40 kb, što opet naravno zavisi od tačnih uslova gel elektroforeze (Schwartz and Cantor, 1984).

Proces agarozne gel elektroforeze se obično deli u tri faze: (1) gel se priprema sa onom koncentracijom agaroze koja je optimalna za veličinu DNK fragmenata koje razdvajamo; (2) uzorci DNK se nanose u bunariće gela a uslovi elektroforeze se optimizuju kako bi omogućili najbolje razdvajanje; i (3) zahvaljujući etidijum-bromidu inkorporiranom u gel, gel se direktno vizuelizuje pod UV svetlom.

3.5.1 Agarozna gel elektroforeza-procedura

Za proveru uspešnosti PCR amplifikacije upotrebljena je 2% agarozna koja omogućava razdvajanje DNK fragmenata veličine 0,1-3 kb.. Puffer u kome se izvodila elektroforeza je 0,5XTBE (Tris-boratni puffer), koji se pravi svež od postojećeg štoka 10XTBE pufera (89mM Tris, 89mM borna kiselina, 2mM EDTA).

Za izvođenje gel elektroforeze korišćen je aparat firme Pharmacia Biotech (model GNA-100). Debljina gela 0,4 cm je optimalna za većinu analitičkih razdvajanja, a s obzirom na veličinu nosača gela bilo je dovoljno razliti 30 ml agaroze. Sam postupak agarozne gel elektroforeze sastoji se iz nekoliko koraka:

3.5.2. Razlivanje gela na nosač gela

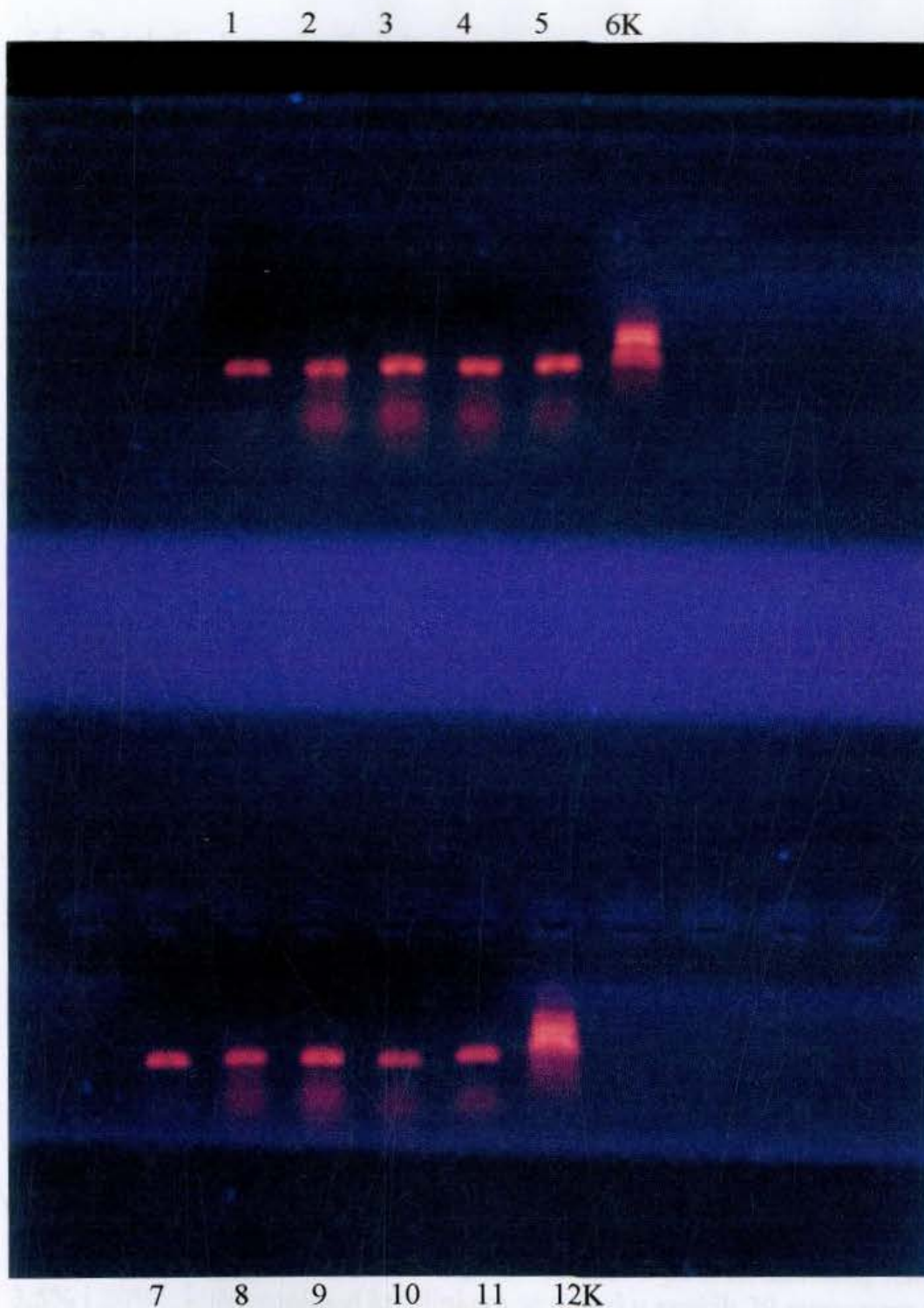
Pre korišćenje nosač gela mora biti apsolutno čist. Slobodni krajevi nosača se zatvore čvrsto lepljivom trakom, da bi se sprečilo razlivanje gela. Postave se češljevi u odgovarajuća ležišta na nosaču i nosač se položi na, po mogućstvu idealnu horizontalnu površinu. Agaroz se rastvori u puferu za elektroforezu (0,5XTBE pufer) u malom erlenmajeru sa širokim grlom i na magnetnoj mešalici zagreje do ključanja. Zatim se rastvor agaroze ohladi između 50-60°C i doda etidijum-bromid u finalnoj koncentraciji 0,5µg/ml. Rastvor agaroze se razlije na nosač gela i sačeka 30 min da potpuno očvrstne. Češljevi se izvlače pod pravim uglom da se ne bi oštetili bunari. Nosač gela zajedno sa gelom se stavlja u kadicu za elektroforezu. Za elektroforezu tzv. «submarine» tipa koja se i najčešće koristi, u kadicu se sipa pufer tako da bar 1mm pokriva površinu gela.

3.5.3. Priprema i nanošenje uzoraka

Maksimalna zapremina uzorka koja se može uneti u bunar prvenstveno zavisi od debljine gela, Za gel debljine 4mm sa bunarićima dubokim 3mm i širokim 3mm, ukupna količina uzorka koji se nanosi je 8-9µl. S obzirom da se zapremina boje treba da predstavlja petinu zapremine uzorka, nanošeno je 7µl amplifikata i 1,5µl boje («loading buffer-a»). Maksimalna koncentracija DNK koja se nanosi u bunariće zavisi od veličine i broja fragmenata u amplifikatu. Za debljinu gela od 4mm, maksimalna količina DNK koja se može izdvojiti kao jedna jasno ograničena traka je oko 50ng. Minimalna količina DNK koja se može detektovati kao jedna traka je 2ng, u bunariću širokom 3mm. Elektroforeza je vodjena pod sledećim uslovima: 30 min, pod naponom od 80V i jačinom struje od 25mA.

3.5.4. Detekcija produkata UV-zracima

Posle završetka elektroforeze, gel se skida sa nosača i prebacuje u transluminator gde se zahvaljujući etidijum-bromidu inkorporiranom u gel, dobijeni produkti direktno vizuelizuju pod UV svetlom. Za svaku analizu neophodno je osim uzoraka imati pozitivnu i negativnu kontrolu. Pozitivna kontrola je komercijalni težinski marker (Sigma) koji se pod istim uslovima elektroforeze razdvaja na trake, od kojih svaka odgovara produktu tačno određenog broja baznih parova (bp). Jednostavnim poredjenjem pozicije našeg PCR-produkta sa odgovarajućom trakom težinskog markera, saznajemo da li smo dobili amplifikat određene dužine. Negativna kontrola je uzorak koji ne sadrži DNK, pri čemu proveravamo da nije došlo do kontaminacije prajmera ili Master mix-a. Na Slici 5. predstavljena je detekcija PCR produkata gel-elektroforezom.



Slika 5. Detekcija PCR-produkata (5 i 6 eksona p53) agaroznom gel-elektroforezom

Kolone 1-5 predstavljaju umnoženi 5 ekson p53 gena za pet bolesnica. Kolona obeležena sa 6K predstavlja komercijalni težinski marker umnožen pod istim uslovima. Kolone 7-11 predstavljaju umnoženi 6 ekson p53 gena za pet bolesnica. Kolona 12K predstavlja težinski marker.

3.6. Detekcija izmenjenih sekvenci analizom konformacionog polimorfizma jednolančane DNK (SSCP - Single-Strand Conformation Polymorphism)

Većina promena na nivou DNK kod kancera, kao što su amplifikacije, genski rearanžmani, velike delecije mogu biti uspešno detektovane Southern blot hibridizacijom. Međutim, detekcija finih DNK promena, kao što su supstitucija samo jedne baze (tzv. tačkaste mutacije), ili delecija i insercija jednog ili više nukleotida, zahtevaju osetljivije metode detekcije. Ove promene su jako značajne kod naslednih bolesti, kao i kod svih vrsta kancera. Određivanje nukleotidne sekvence genomske DNK direktnim sekvenciranjem PCR produkata je najpouzdaniji metod za detekciju izmena pojedinačnih baza (Gyllensten and Erlich, 1988; Murray, 1989). Ali sekvenciranje celog gena je jako skup i dugotrajan proces, pa se naročito za one gene koji poseduju tzv. «vruća mesta» gde se mutacije najviše javljaju, preporučuju druge metode detekcije.

Poznata je činjenica da se jednolančani fragment DNK može potpuno razdvojiti elektroforezom na nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Ovo razdvajanje je moguće zahvaljujući jedinstvenoj terciarnoj strukturi, koja je određena primarnom strukturom (sekvencom) nukleotida. Jednolančani fragment DNK, čija se nukleotidna sekvenca razlikuje samo po izmeni jedne baze, putuju drugačije kroz nedenaturišući poliakrilamidni gel od wt fragmenata. Imajući u vidu da je ova promena pokretljivosti posledica izmenjene konformacije jednolančane DNK usled supstitucije samo jedne baze, metoda je dobila ime konformacioni polimorfizam jednolančane DNK – SSCP (Orita et al. 1989; Welsh et al., 1997; Pooart et al., 1999). Zahvaljujući mogućnosti visoke rezolucije, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (PAGE) je jedna od najosetljivijih metoda za razdvajanje i vizuelizaciju proteina i nukleinskih kiselina. U cilju dobijanja željene specifičnosti razdvajanja, poroznost gela se može varirati u širokom opsegu. Fragmenti DNK razdvajaju se na osnovu naelektrisanja, veličine ili kombinacije ove dve osobine. Proces polimerizacije takodje ima uticaja na kvalitet razdvajanja. Poliakrilamidni gel baziran je na ko-polimerizaciji akrilamida i bis-akrilamida (N-N'-metilen-bis-akrilamid). Polimerizacija se aktivira dodavanjem TEMED (tetrametiletildiamin) i APS (amonijumpersulfat), od kojih poslednji sadrži persulfatne slobodne radikale koji aktiviraju TEMED. Oako aktivirani TEMED koji sadrži nespareni elektron, služi kao inicijator polimerizacije tako što aktivira akrilamidni monomer transferom nesparenog elektrona. Reakcije aktiviranog monomera sa neaktiviranim monomerima iniciraju polimerizacioni proces. Dugački polimerni lanci se zatim neselektivno kroslinkuju sa bis-akrilamidom. Dužina lanaca i stepen njihovog kroslinkovanja određuju poroznost gela. Dužina lanaca zavisi od koncentracije akrilamida u polimerizacionoj reakciji (obično između 3,5% i 20%); jedan molekul kroslinkera se nalazi u svakih 29 monomera akrilamida. Efektivni opseg razdvajanja fragmenata DNK u nedenaturišućim gelovima različite koncentracije se kreće od 6 pa do 2000 baznih parova. Pored fizičko-hemijskih osobina polimerizacionog procesa, čistoća supstanci takodje utiče na kvalitet gela. Velike količine APS i TEMED izazivaju promene pH vrednosti. Manja količina ovih inicijatora dovodi do produkcije dužih polimernih lanaca, što smanjuje gustinu i povećava elastičnost gela. Međutim usporavanje polimerizacione reakcije dovodi do povećane rastvorljivosti kiseonika u smeši, što rezultira mehanički slabim gelom. Preporučuje se korišćenje ekvimolarne količine APS i TEMED u koncentracijama 1-10mM. Da bi se gel potpuno polimerizovao potrebno je oko 60 min, a sam proces polimerizacije postaje vidljiv posle 15 min. Polimerizacija je egzotermna reakcija, inicijalno oslobodjena temperatura ubrzava reakciju. Polimerizacija na sobnoj temperaturi daje transparentne, manje porozne i više elastične gelove. Zato sve supstance treba ostaviti neko

vreme na sobnoj temperaturi pre pravljenja gela. Kiseonik iz vazduha rastvara se u gelu i inhibira proces polimerizacije. Zato je poželjno degasirati rastvor akrilamida i bisakrilamida da bi se dobili bolji rezultati.

Poliakrilamidni gelovi se prave izmedju dve staklene ploče odvojene spejserima, kako bi poliakrilamidni gel bio što manje izložen vazduhu. U odnosu na agarozni gel, poliakrilamidni gelovi ima ju više prednosti:

- mogućnost rezolucije je mnogo veća, tako da je moguće razdvojiti molekule DNK čija je razlika u dužini 0,2% (1 bp u 500 bp).
- izolovanje fragmenata DNK sa poliakrilamidnih gelova je jednostavno i pri tome se postiže visoka čistoća uzorka.

3.6.1. SSCP- eksperimentalna procedura

U našem eksperimentalnom radu korišćen je sistem za vertikalnu elektroforezu firme BIO RAD, USA (model, PROTEAN^R II xi Cell), konstruisan za veličinu ploča od 20x20cm (unutrašnja ploča) i 20x22,5cm (spoljašnja ploča). Radjeno je sa gelovima debljine 1mm i 0,75mm. Pokazalo se da su tanji gelovi pogodniji za rad jer daju oštrije i ravnije trake DNK. Sam postupak izvođenja SSCP metode sastoji se iz nekoliko koraka:

3.6.2. Priprema poliakrilamidnog gela

Zbog bolje postojanosti pravi se 30% štok rastvor akrilamid/bisakrilamid (29g akrilamida i 1g N,N-metilenbisakrilamid/100ml H₂O). Za pripremu 50ml 8% poliakrilamidnog gela potrebno je:

30% štok rastvor akrilamid/bisakrilamid	13,3ml
destilovana H ₂ O	29.0ml
10XTBE pufer	2,50ml
10% amonijum persulfat	0,35ml
TEMED	0,20ml

Rastvor se pravi neposredno pre nalivanja gela, a inicijatori polimerizacije se dodaju na kraju. Svaki duži kontakt sa kiseonikom iz vazduha može usporiti proces polimerizacije.

3.6.3. Mešanje uzoraka DNK sa bojom i njihova denaturacija

Kao "gel loading" rastvor korišćena je smeša dve boje: 0,25% ksilen cijanol i 0,25% brom fenol plavo u 20% Ficoll-u 400. Ksilen cijanol komigrira sa fragmentima DNK dužine 160 baznih parova, a brom fenol plavo sa fragmentima dužine 45bp. Količina uzorka zavisi od debljine gela i broja i zapremine bunarića upotrebljenog češlja. Za debljinu gela 0,75mm koristili smo češalj iste debljine sa 25 bunarića svaki zapremine 60µl. Ukupna količina uzorka nanošenog na gel bila je 15µl:

2,60 μ l boje ("gel loading" solution)
4,60 μ l DNK uzorka (PCR produkt)
7,80 μ l sterilne H₂O

Uzorci se denaturišu 5min na 95°C. Posle toga se odmah stavljaju na led da bi se sprečila renaturacija, i nanose u bunariće gela.

3.6.4. Optimizacija uslova za SSCP elektroforezu

U bunariće gela uzorci se nanose specijalno dizajniranim mikronastavcima, koji ne oštećuju zidove bunarića a istovremeno omogućavaju pravilno istiskivanje uzorka. Pre nanošenja uzoraka delimično se montira sistem za vertikalnu elektroforezu: nosač gela se postavi u komoru u koju je sipan ohladjeni 0,5XTBE pufer («running buffer»), i pusti se voda da cirkuliše kroz komoru kako ne bi došlo do renaturacije DNK uzoraka. Posle nanošenja uzoraka, zatvori se sistem i startuje elektroforeza. U našem eksperimentalnom radu, uslovi SSCP elektroforeze bili su sledeći: 165 min pri naponu od 200V i jačini struje 15-20mA.

3.6.5. Bojenje gela srebrom

Jedna od najčešće korišćenih metoda za vizuelizaciju gelova je njihovo bojenje srebrom (Bassam et al., 1991). Sam postupak bojenja sastoji se iz nekoliko koraka. Posle završetka elektroforeze, gel se pažljivo skida sa ploča i odmah stavlja u 10% etanol u trajanju od 10 minuta, pri čemu se razdvojene trake fiksiraju. Gel se potom prebacuje u 1% HNO₃. Posle dva minuta gel se ispere vodom i prebacuje u 0,2% AgNO₃. Sam proces bojenja srebrom traje pola sata i odvija se u mraku. Posle toga gel se dobro ispere vodom i stavlja u rastvor Na₂CO₃ sa dodatkom formaldehida. Nakon 15-20 minuta počinju da se uočavaju trake. Bojenje se prekida 10% glacijalnom CH₃COOH. Na kraju se gel ispere vodom i pripremi za skeniranje i analizu dobijenog rasporeda traka.

3.6.6. Detekcija izmenjenih sekvenci

Neophodno je napomenuti da za svaki uzorak DNK, za svaki ekson ponaosob postoji kontrola koja predstavlja DNK zdrave osobe. Ova DNK je umnožena i analizirana pod potpuno istim uslovima kao i ispitivani uzorci tumorske DNK. Detekcija izmenjenih sekvenci vršena je upoređivanjem rasporeda traka između kontrole i ispitivanih uzoraka.

Svaka promena nukleotidne sekvence, makar po jednoj bazi izmeniće kretanje jednolančane DNK kroz gel, tako da se svaka genska alteracija lako uočava.

Na slici 6. prikazana je analiza 5,6,7, i 8 eksona p53 gena za pet različitih uzoraka DNK SSCP metodom.

4. REZULTATI

Prikaz razdvajanja 5,6,7, i 8 eksona p53 gena SSCP metodom

4.1. Prikaz razdvajanja p53 mutacija u mišićnom tkivu ispitivanih bolesnika sa karcinomom dojke



Slika 6. Prikaz razdvajanja 5, 6, 7, i 8 eksona p53 gena SSCP metodom

- Kolone 1-6: razdvajanje 5 eksona za pet različitih uzoraka tumora, 6 – kontrolna DNK
- Kolone 7-12: razdvajanje 6 eksona. U koloni 10 strelicom je označena mutacija, odnosno traka koja ne postoji u kontroli (kolona 12)
- Kolone 13-18: razdvajanje 7 eksona, 18 – kontrolna DNK
- Kolone 19-24: razdvajanje 8 eksona, 24 – kontrolna DNK

Figura 1. Razdvajanje mutacija u eksonima 5-8 p53 gena

U okviru ispitivanja mišićnog tkiva mutacija u p53 genu od pilyocistara tumora, u skladu sa prethodnim podacima, je bilo najviše detektiranih mutacija u simetriji velikih tumora, sem na regionalnim područjima tumora, kao što je to slučaj u slučaju tumora i tumora steroidnih hormona. Sadržajka mutacija u eksonima 5-8 p53 gena je 2. stupnja (Felt II, 1983).

4. REZULTATI

4.1. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu ispitivanih bolesnica sa karcinomom dojke

U uzorcima malignog tkiva karcinoma dojke (n=100) određivano je prisustvo mutacija u regionu od 5 do 8 eksona p53 gena. Ovaj deo p53 gena kodira DNK vezujući domen p53 proteina i bez njegove intaktnosti nema funkcionalnosti p53 proteina. Prema podacima iz literature, više od 80% svih mutacija u p53 genu locirano je u ovom regionu.

U grupi ispitivanih bolesnica detektovano je ukupno 25 mutacija p53 gena. Gledano po ispitivanim eksonima, distribucija mutacija izgleda na sledeći način: 10 mutacija je detektovano u eksonu 5, 6 u eksonu 6, 8 u eksonu 7 i svega 1 mutacija u eksonu 8. Distribucija mutacija prikazana je na Figuri 1.

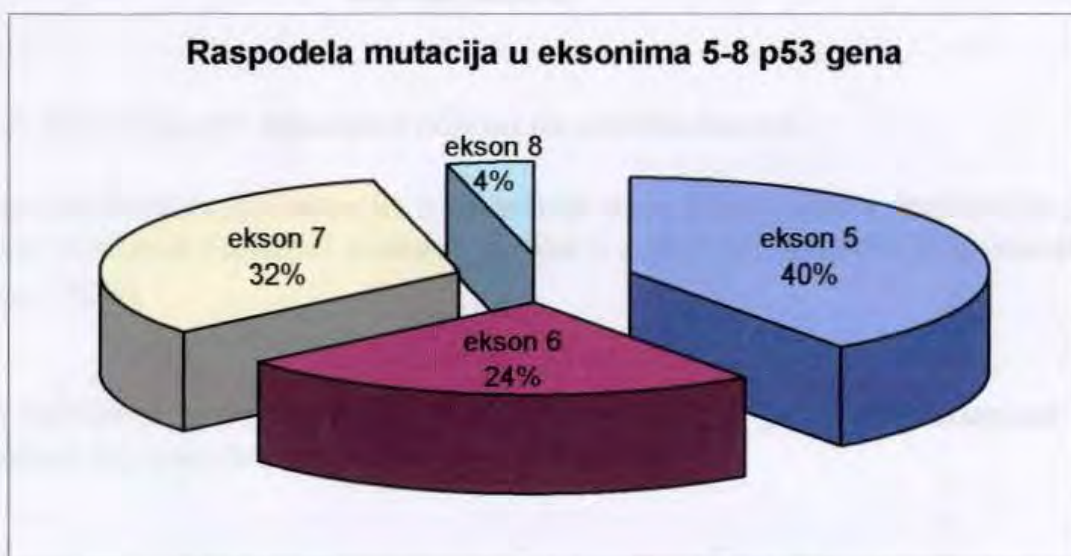


Figura 1. Raspodela mutacija u eksonima 5-8 p53 gena

U cilju ispitivanja zavisnosti pojave mutacija u p53 genu od parametara tumora, u sledećim poglavljima data je distribucija detektovanih mutacija u funkciji: veličine tumora, statusa regionalnih limfnih čvorova, histološkog tipa i gradusa tumora i statusa steroidnih receptora. Statistička značajnost ovih distribucija testirana je χ^2 testom (Petz B, 1985)

4.1 a) Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od veličine tumora

Od 100 ispitivanih uzoraka karcinoma, 52 je bilo veličine T₁, 45 veličine T₂ i 3 veličine T₃. Od 25 detektovanih mutacija, 10 je locirano u okviru tumora veličine T₁, 14 u okviru veličine T₂ i jedna mutacija je bila locirana u okviru veličine tumora T₃ (Figura 2.).

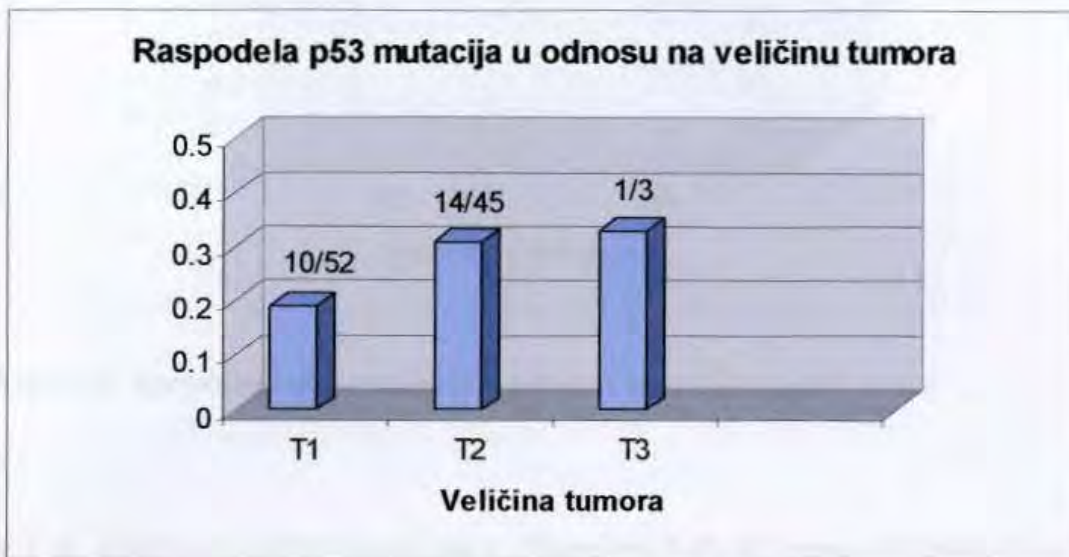


Figura 2. Raspodela p53 mutacija u odnosu na veličinu tumora

Dobijena distribucija p53 mutacija u zavisnosti od veličine tumora testirana je χ^2 testom, pri čemu nije pokazana statistički značajna razlika u pojavi p53 mutacija u zavisnosti od veličine tumora ($p > 0.05$).

4.1 b). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od prisutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

Figura 2. prikazuje razliku u distribuciji mutacija u okviru p53 gena između bolesnika sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (N₊) u odnosu na grupu bolesnika bez prisutnih regionalnih metastaza (N₀). Razmatrano je 70 N₊ u odnosu na 30 N₀ bolesnika. Svega jedna mutacija u p53 genu detektovana je u N₀ grupi, dok je 24 mutacija detektovano u N₊ grupi.

Prikazana distribucija mutacija u eksonim 5-8 p53 gena u zavisnosti od prisutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima testirana je χ^2 testom, pri čemu je dobijena statistički značajna razlika u distribuciji mutacija između dve pomenute grupe ($p < 0.025$).

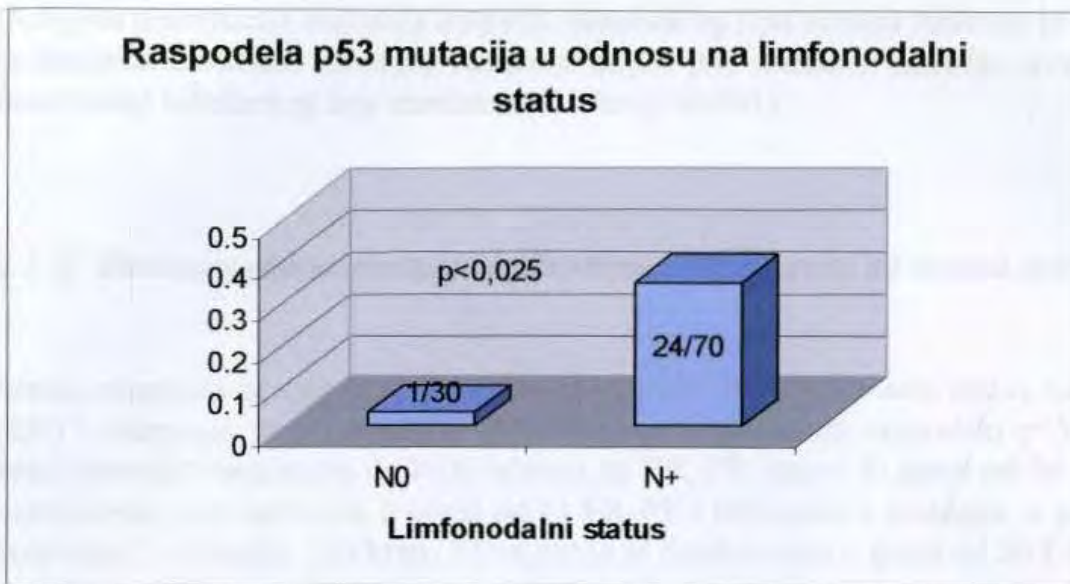


Figura 3. Raspodela p53 mutacija u odnosu na limfonodalni status

4.1 c). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog tipa tumora

Figura 4. prikazuje učestalost p53 mutacija u dva osnovna histološka tipa invazivnog karcinoma dojke. Pojava p53 mutacija vezana je prevashodno za invazivni duktalni tip karcinoma dojke – 22/61 mutacija detektovano je u ovom histološkom tipu, dok su svega dve mutacije locirane u invazivnom lobularnom histološkom tipu tumora ($p < 0.001$).

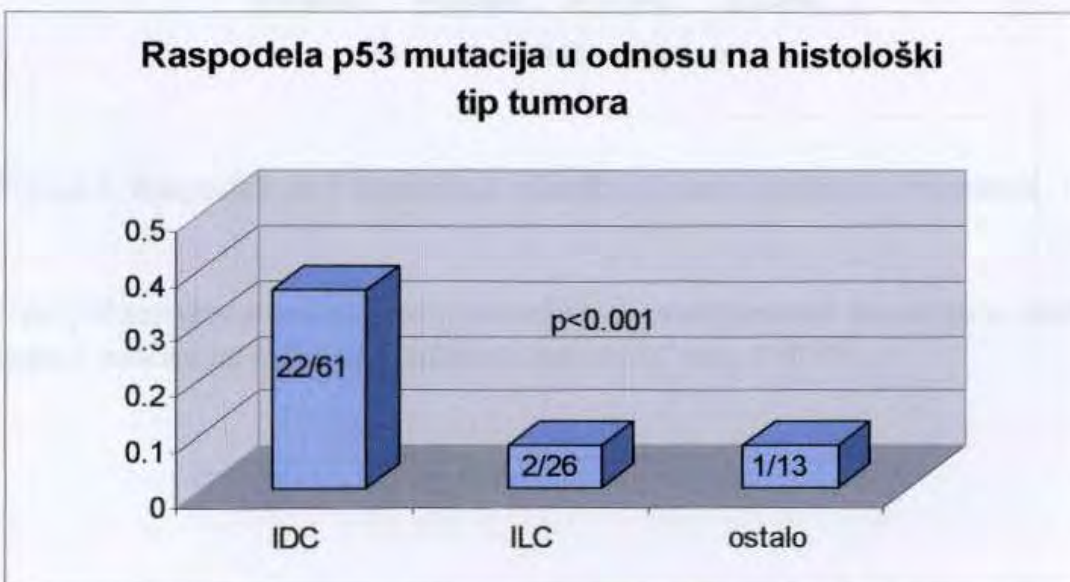


Figura 4. Raspodela p53 mutacija u odnosu na histološki tip tumora

Dobijena distribucija mutacija u okviru histološkog tipa tumora testirana je χ^2 testom, pri čemu je dobijena statistički značajna razlika u pojavi p53 mutacija između invazivnog duktalnog i invazivnog lobularnog tipa karcinoma dojke ($p < 0.001$).

4.1 d). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od statusa steroidnih receptora

Status receptora za steroidne hormone razmatran je kao združeni status receptora za estrogen (ER) i receptora za progesteron (PR). Figura 5. prikazuje raspodelu p53 mutacija u okviru četiri fenotipa karcinoma dojke u odnosu na ER, PR status. U grupi od 34 ER+PR+ bolesnica detektovano je 8 mutacija, u grupi od 11 ER-PR+ bolesnica 4 mutacije, u grupi od 17 ER+PR- bolesnica 2 mutacije, i na kraju 11 mutacija je detektovano u grupi od 38 ER-PR- bolesnica.



Figura 5. Raspodela p53 mutacija u odnosu na status steroidnih receptora

Nije pokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti mutacija u okviru eksona 5-8 p53 gena u odnosu na status steroidnih receptora (χ^2 test, $p > 0.05$).

4.1 e). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog gradusa tumora

Razmatrana je zastupljenost p53 mutacija u okviru histoloških gradusa tumora I II i III. U okviru gradusa I (11 bolesnica), detektovana je jedna mutacija, u okviru gradusa II (79

slučajeva), detektovane su 22 mutacije i u okviru gradusa III (10 bolesnica), detektovane su dve mutacije

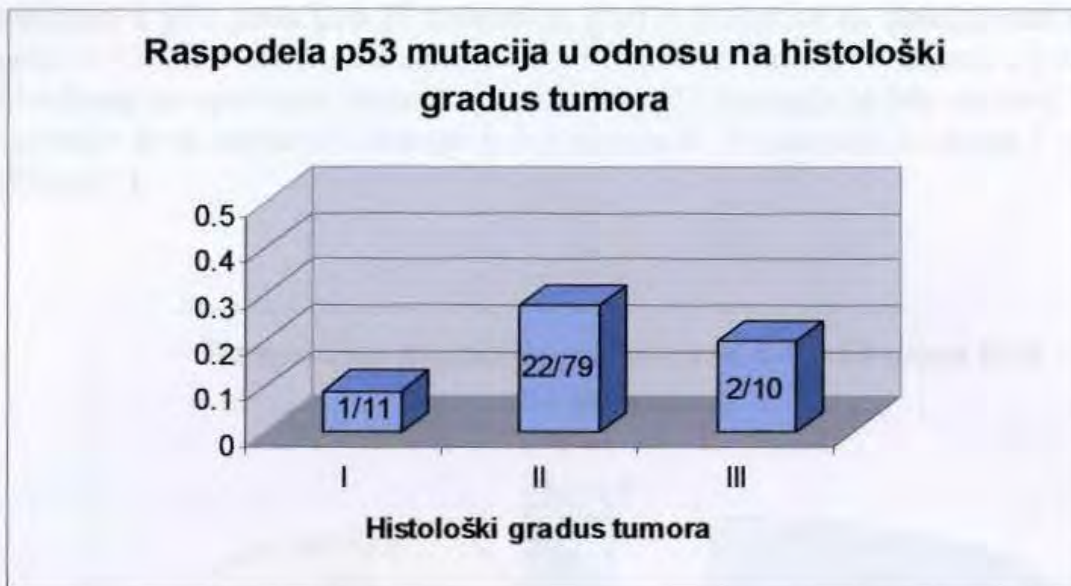


Figura 6. Raspodela p53 mutacija u odnosu na histološki gradus tumora

Dobijena distribucija mutacija p53 gena u odnosu na histološki gradus tumora testirana je χ^2 testom, pri čemu nije pokazana statistički značajna razlika u raspodeli mutacija u okviru različitih gradusa (χ^2 test, $p > 0.05$). Napominjemo da zastupljenost p53 mutacija u različitim histološkim gradusima nije bilo moguće adekvatno analizirati obzirom da su u istraživanje bile uključene većinom bolesnice histološkog gradusa II (79/100).

4.1.1. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N_0)

U grupi bolesnica bez regionalnih metastaza u limfnim čvorovima ($n=30$) detektovana je samo jedna mutacija u eksonu 6 p53 gena, kod bolesnice sa karcinomom invazivnog duktalnog tipa (IDC) gradusa II, veličine T_2 i sa negativnim receptorima za estrogen i progesteron (ER-PR-).

4.1.2. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (N₊)

U grupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima nadjene su 24 mutacije u p53 genu kod 20 bolesnica. Kod 4 bolesnice su detektovane duple mutacije p53 gena i to: u 5 i 6 eksonu u 2 slučaja i u 5 i 7 eksonu, kao i 6 i 7 eksonu u po 1 slučaju.

U odnosu na ispitivane eksone, zastupljenost p53 mutacija je bila sledeća: od 24 detektovanih mutacija 10 je nadjeno u eksonu 5, 5 u eksonu 6, 8 u eksonu 7 i svega 1 mutacija u eksonu 8 (Figura 7).

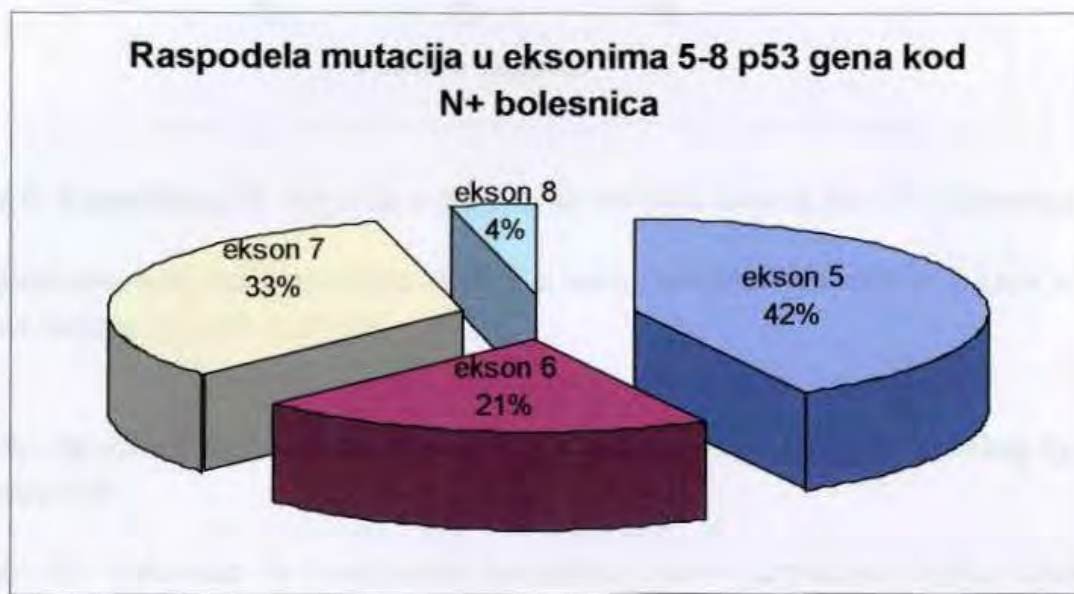


Figura 7. Raspodela mutacija u eksonima 5-8 p53 gena kod N+ bolesnica

Kao u prethodnim poglavljima i u okviru grupe N+ bolesnica, ispitivana je zavisnost pojave mutacija u p53 genu od: veličine tumora, histološkog tipa tumora, statusa steroidnih receptora i od histološkog gradusa tumora.

4.1.2 a). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od veličine tumora kod N+ bolesnica

Raspodela p53 mutacija kod N₊ bolesnica u zavisnosti od veličine tumora, prikazana je na Figuri 8. Kod 33 uzoraka tumora veličine T₁, detektovano je 10 mutacija, u grupi od 34 uzoraka veličine T₂, nadjeno je 13 mutacija i kod tri karcinoma veličine T₃ detektovana je jedna mutacija.

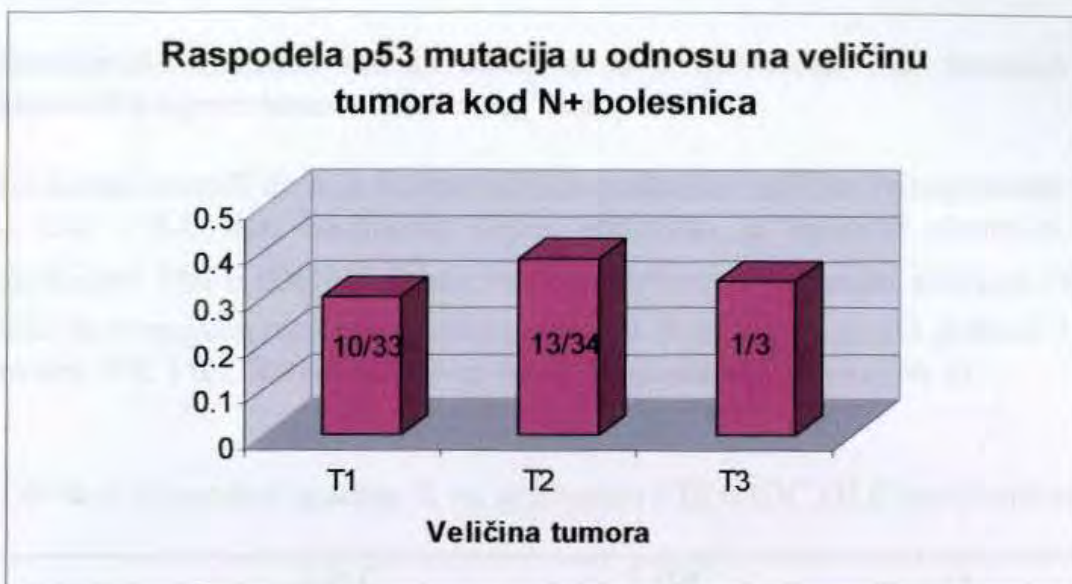


Figura 8. Raspodela p53 mutacija u odnosu na veličinu tumora kod N+ bolesnica

Nije pokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti mutacija p53 gena u zavisnosti od veličine tumora (χ^2 test, $p > 0.05$).

4.1.2 b). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog tipa tumora kod N+ bolesnica

Kod 44 N+ bolesnice sa invazivnim duktalnim tipom karcinoma dojke, detektovana je 21 mutacija, dok su u grupi 18 N+ bolesnica sa invazivnim lobularnim tipom karcinoma dojke detektovane svega dve mutacije (Figura 9).

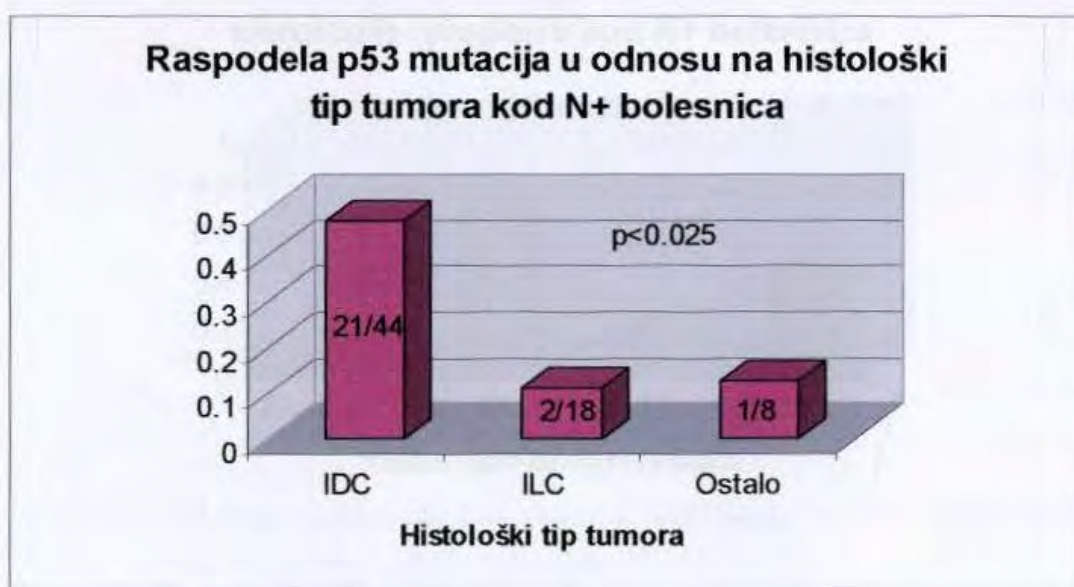


Figura 9. Raspodela p53 mutacija u odnosu na histološki tip tumora kod N+ bolesnica

Statistički značajna razlika dobijena je u učestalosti p53 mutacija između različitih histoloških tipova tumora (Figura 9, χ^2 test, $p < 0.025$).

Da bismo utvrdili da li je uočena razlika posledica različite zastupljenosti histoloških gradusa u IDC i ILC tipu karcinoma dojke, statistički je testirana učestalost gradusa II prema gradusima I/III u IDC i ILC karcinomima (χ^2 test). Statistički značajna razlika nije dobijena. Bilo je nemoguće testirati učestalost gradusa II odvojeno prema gradusu I kao i gradusu III u okviru IDC i ILC karcinoma zbog malog broja slučajeva (ukupno 3).

Tabela 6. Učestalost gradusa II vs. gradusima I/III u IDC i ILC karcinomima

	ILC	IDC	
Gradus II	15	36	51
Gradus I/III	3	8	11
	18	44	62

4.1.2 c). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od statusa steroidnih receptora kod N+ bolesnica

Raspodelu p53 mutacija u odnosu na status steroidnih receptora u grupi N+ bolesnica prikazuje figura 10. Kod 25 ER+PR+ bolesnica detektovano je 8 mutacija, u grupi 6 ER-PR+ uzoraka nadjene su 4 mutacije, kod 13 ER+PR- bolesnica 2 mutacije i u grupi od 26 ER-PR- bolesnica detektovano je 10 mutacija.

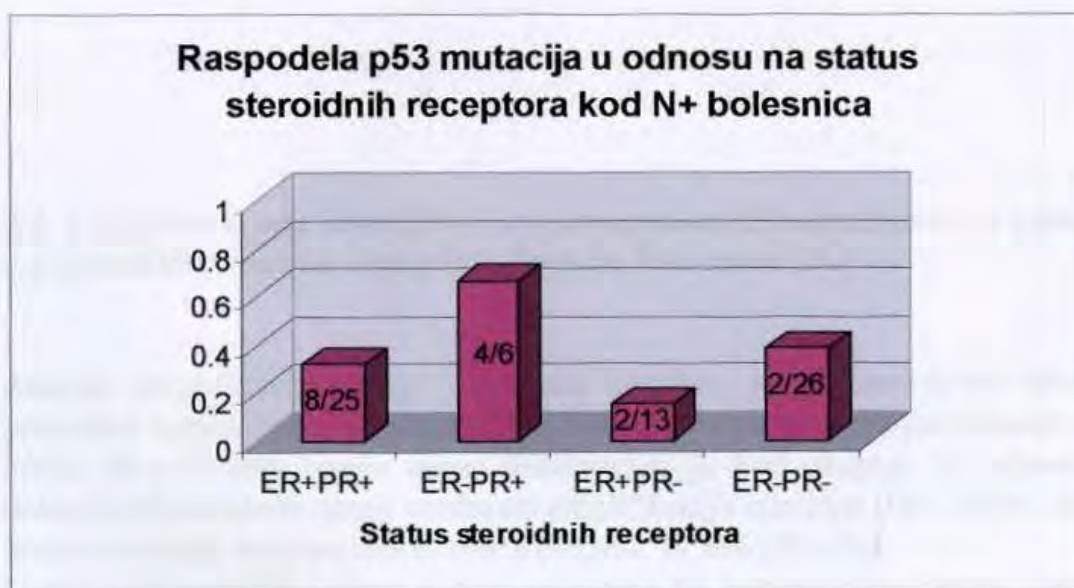


Figura 10. Raspodela p53 mutacija u odnosu na status steroidnih receptora kod N+ bolesnica. Nije dobijena statistički značajna razlika u broju mutacija u p53 genu između različitih fenotipa karcinoma dojke u odnosu na status steroidnih receptora (χ^2 test, $p > 0.05$).

4.1.2 d). Zavisnost pojave mutacija u eksonima 5-8 p53 gena od histološkog gradusa tumora kod N+ bolesnica

Zastupljenost p53 mutacija u okviru histološkog gradusa, prikazuje figura 11. Kod 56 bolesnica gradusa II detektovana je 21 mutacija, kod 5 bolesnica sa tumorima gradusa I, nadjena je jedna mutacija, i kod devet bolesnica sa tumorima gradusa III, detektovane su 2 mutacije. Kao što je već pomenuto, s obzirom da je većina ispitivanih karcinoma bila gradusa II, data analiza nije u potpunosti relevantna.

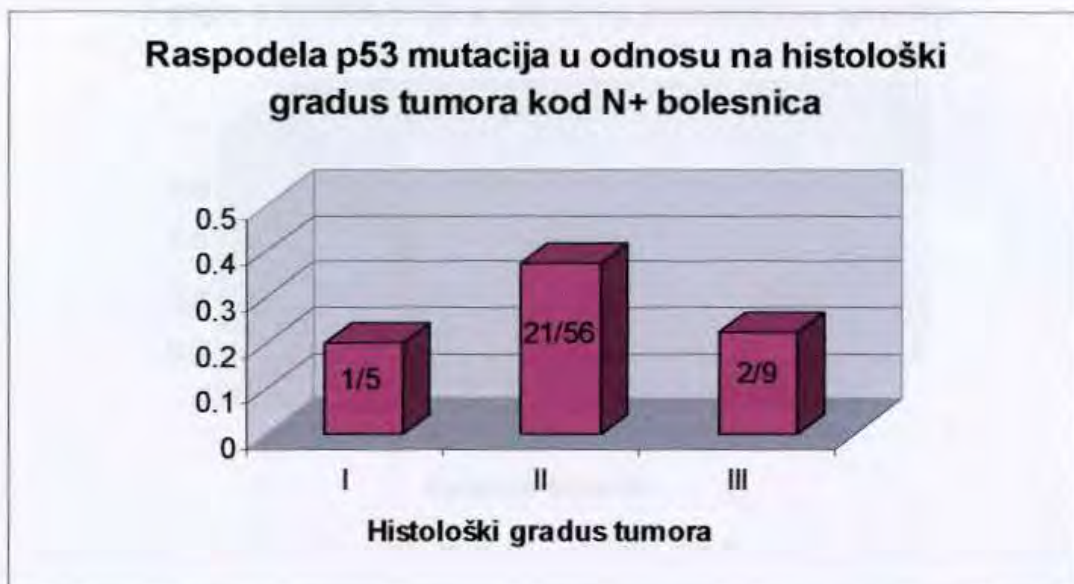


Figura 11. Raspodela p53 mutacija u odnosu na histološki gradus tumora kod N+ bolesnica

4.2. Učestalost c-myc amplifikacije u tumorskom tkivu bolesnica sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima limfnim čvorovima (N₊)

Analiza amplifikacije c-myc onkogeno izvršena je u tumorskom tkivu 40 bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima. Amplifikacija jednaka ili veća od 200% (dve ili više kopija gena) detektovana je kod ukupno 20 bolesnica, dok je kod 17 bolesnica detektovan opseg vrednosti amplifikacije između 100 i 200%. Svega 3 bolesnice su imale vrednosti c-myc-a ispod 100% (90.9%, 77.6% i 92.6%).

Distribucija amplifikovanog c-myc onkogeno po parametrima tumora koji uključuju veličinu tumora, histološki tip i gradus tumora, kao i estrogenu zavisnost tumora prikazana je u sledećim poglavljima.

4.2 a). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od veličine tumora

Distribuciju amplifikovanog c-myc gena u odnosu na veličinu tumora prikazuje Figura 12. Kod 19 tumora veličine T₁, amplifikacija c-myc gena detektovana je u 11 slučajeva, kod 19 tumora veličine T₂ u dva slučaja, i na kraju nije zabeležena pojava amplifikovanog c-myc gena u svega dva tumora veličine T₃.

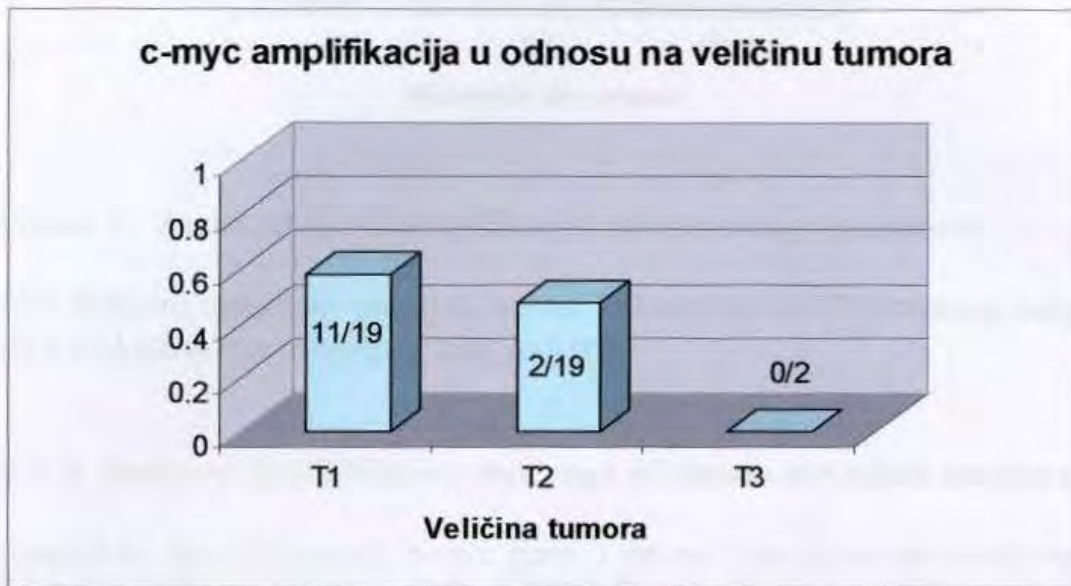


Figura 12. Zavisnost c-myc amplifikacije od veličine tumora

Nije pokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti amplifikovanog c-myc gena u zavisnosti od veličine tumora (χ^2 test, $p > 0.05$).

4.2 b). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od histološkog tipa tumora

Učestalost pojave amplifikovanog c-myc gena u odnosu na histološki tip tumora kod N₊ bolesnica, prikazuje Figura 13. Kod 24 bolesnice sa invazivnim duktalnim tipom karcinoma dojke, pojava amplifikovanog c-myc gena zabeležena je u 12 slučajeva, kod 11 bolesnica sa invazivnim lobularnim tipom karcinoma dojke u 5 slučajeva, i kod pet bolesnica sa ostalim histološkim tipovima, amplifikovan c-myc gen detektovan je tri puta.

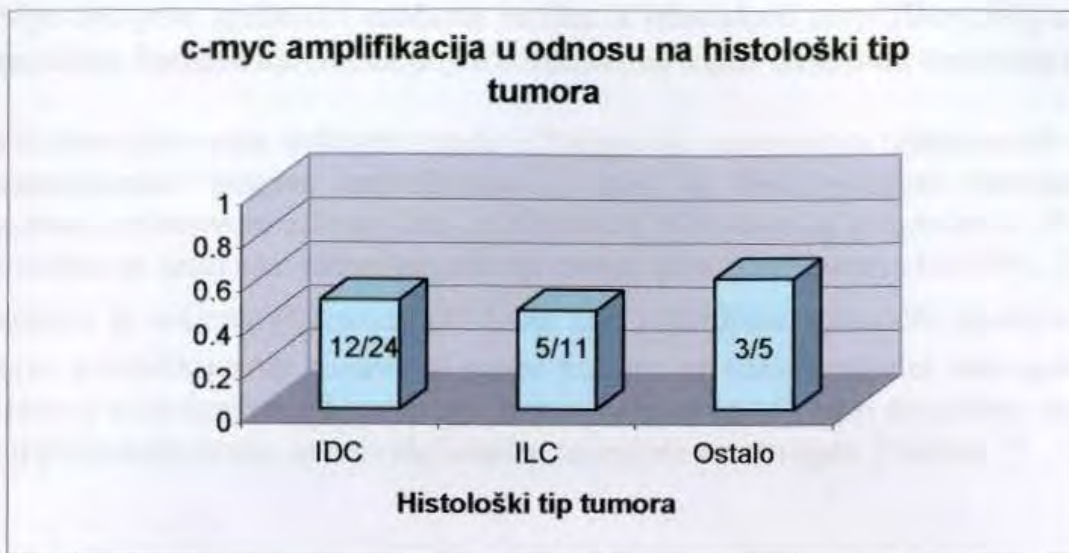


Figura 13. Zavisnost c-myc amplifikacije od histološkog tipa tumora

Nije dobijena statistički značajna razlika u učestalosti amplifikovanog c-myc gena u zavisnosti od histološkog tipa tumora (χ^2 test, $p > 0.05$).

4.2 c). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od statusa steroidnih receptora

Raspodelu amplifikovanog c-myc gena u odnosu na status steroidnih receptora u grupi N₊ bolesnica prikazuje Figura 14. Kod 9 ER+PR+ bolesnica amplifikovan c-myc gen detektovan je u 5 slučajeva, grupi 2 ER-PR+ uzoraka jedan je imao amplifikovan c-myc, kod 12 ER+PR+ bolesnica 7, su imale amplifikovan c-myc i kod 17 ER-PR- bolesnica, amplifikovani c-myc detektovan je šest puta.

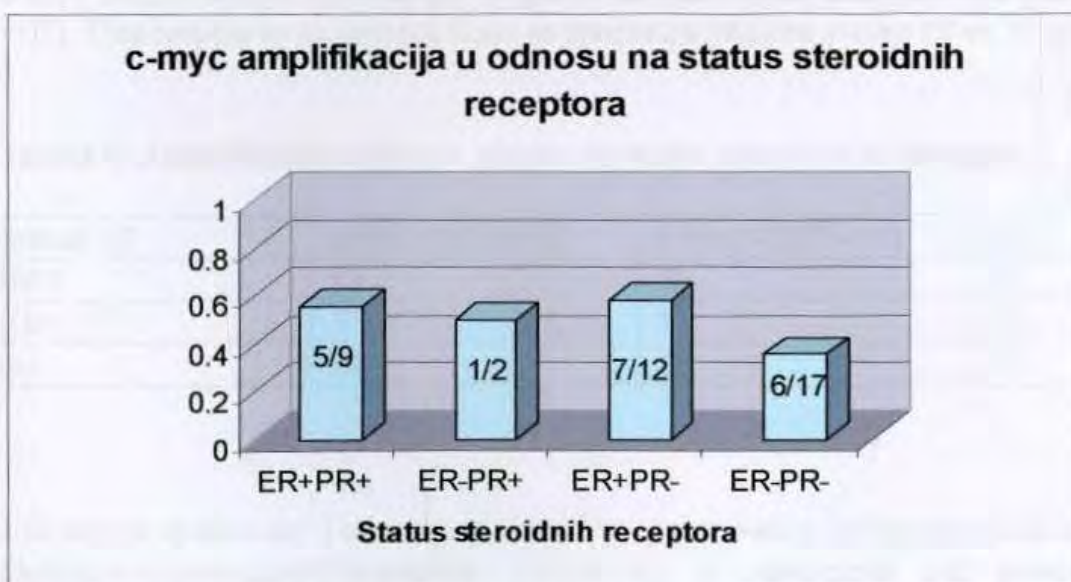


Figura 14. Zavisnost c-myc amplifikacije od statusa steroidnih receptora

Nije dobijena statistički značajna razlika u učestalosti amplifikovanog c-myc gena između različitih fenotipa karcinoma dojke u odnosu na status steroidnih receptora (χ^2 test, $p > 0.05$).

Obzirom da c-myc onkogen spada u kategoriju estrogenom indukovanih gena, poredjena je zastupljenost njegove amplifikacije u grupi sa funkcionalnim estrogenim receptorom, a mereno prisustvom estrogenom indukovanim receptorom za progesteron (ER+PR+, ER-PR+) u odnosu na grupu sa nefunkcionalnim estrogenim receptorom (ER+PR-, ER-PR-). Statistička analiza je radjena χ^2 testom, pri čemu nije potvrđena statistički značajno veća učestalost c-myc amplifikovanih tumora u grupi tumora sa funkcionalnim estrogenim receptorima u odnosu na nefunkcionalne estrogene receptore (6 vs. 14), iako se uočava da je veći broj c-myc amplifikacija vezan za nefunkcionalne receptore za estrogen. (Tabela 7).

Tabela 7. Amplifikacija c-myc u odnosu na funkcionalnost steroidnih receptora (ER,PR)

Funkcionalni ER	c-myc \geq 200% (n)	c-myc<200% (n)	(n)
ER+PR+ ER-PR+	6	5	11
ER+PR- ER-PR-	14	15	29
(n)	20	20	40

Ukoliko se posmatra učestalost c-myc amplifikacija samo u odnosu na prisustvo estrogenog receptora, evidentna je veća zastupljenost c-myc amplifikacija u grupi ER+ karcinoma dojke. Međutim, dobijena zastupljenost c-myc amplifikacija se statistički značajno ne razlikuje u okviru ER+ i ER- tumora (χ^2 test), mada se uočava da je, za razliku od učestalosti c-myc amplifikovanih tumora među tumorima sa nefunkcionalnim receptorima za estrogen, veći broj c-myc amplifikacija detektovan u grupi sa pozitivnim statusom receptora za estrogen (13 vs. 7). Ova razlika se ne uočava kada se posmatra intaktni c-myc (9 vs. 11 slučajeva), Tabela 8.

Tabela 8. Amplifikacija c-myc u odnosu na status receptora za estrogen

Status ER	c-myc \geq 200% (n)	c-myc<200% (n)	(n)
ER+	13	9	22
ER-	7	11	18
(n)	20	20	40

Takodje je analizirana i učestalost bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u grupi uzoraka sa amplifikovanim/neamplifikovanim c-myc-om, u zavisnosti od prisustva funkcionalnih estrogenih receptora (ER+PR+, ER-PR+) (tabela 9), kao i u zavisnosti od prisustva samog estrogenog receptora (ER+, ER-) (tabela 10). Ako se posmatraju uzorci sa amplifikovanim c-

myc onkogenom bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti (n=10), nije dobijena statistički značajna razlika u broju bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti između grupa sa funkcionalnim estrogenim receptorima (n=2) i nefunkcionalnim estrogenim receptorima (n=8), iako se uočava veća učestalost ponovnog javljanja bolesti kod bolesnica sa nefunkcionalnim estrogenim receptorima (Fišerov egzaktni test, $p > 0.05$). Takođe se ne uočava statistički značajna razlika u raspodeli bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u okviru uzoraka sa amplifikovanim i neamplifikovanim c-myc onkogenom u tumorima sa (2 versus 2 slučaja) ili bez (8 versus 9 slučajeva) funkcionalnih estrogenih receptora (Tabela 10).

Tabela 9. Učestalost bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u grupi sa amplifikovanim/neamplifikovanim c-myc u odnosu na funkcionalnost steroidnih receptora

Funkcionalni ER	R+ (c-myc \geq 200%)	R- (c-myc<200%)	(n)
ER+PR+	2	2	4
ER-PR+			
ER+PR-	8	9	17
ER-PR-			
(n)	10	11	21

*R+ broj bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti

R- broj bolesnica bez ponovnog javljanja bolesti

Ista analiza zastupljenosti bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u okviru uzoraka sa amplifikovanim ili intaktnim c-myc onkogenom, a u zavisnosti od statusa estrogenog receptora prikazana je u Tabeli 10. Iako nije dobijena statistički značajna razlika u zastupljenosti bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti, vezano za uzorke sa amplifikovanim c-myc onkogenom u odnosu na ER+/ER- tumore, uočava se veći broj ponovnih javljanja bolesti kod bolesnica sa tumorskom amplifikacijom c-myc-a u ER+ tumorima (7 vs. 3 slučaja). Iako se radi o grupama sa malim brojem slučajeva, ipak se uočava da ova razlika vezana za status estrogenog receptora ne postoji kod bolesnica bez tumorske amplifikacije c-myc onkogeno (5 vs. 6 slučajeva) (Tabela 10).

Tabela 10. Učestalost bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u grupi sa amplifikovanim/neamplifikovanim c-myc u odnosu na status receptora za estrogen

Status ER	R+ (c-myc \geq 200%)	R- (c-myc<200%)	(n)
ER+	7	5	12
ER-	3	6	9
(n)	10	11	21

*R+ broj bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti

R- broj bolesnica bez ponovnog javljanja bolesti

4.2 d). Zavisnost amplifikacije c-myc gena od histološkog gradusa tumora

Od ukupno 40 testiranih N+ bolesnica, tri je bilo sa gradusom I, 31 gradusa II i šest gradusa III. Amplifikacija c-myc gena detektovana u 17 slučajeva u okviru gradusa II, u 6 slučajeva u okviru gradusa III, i nijednom u gradusu I (Figura 15).

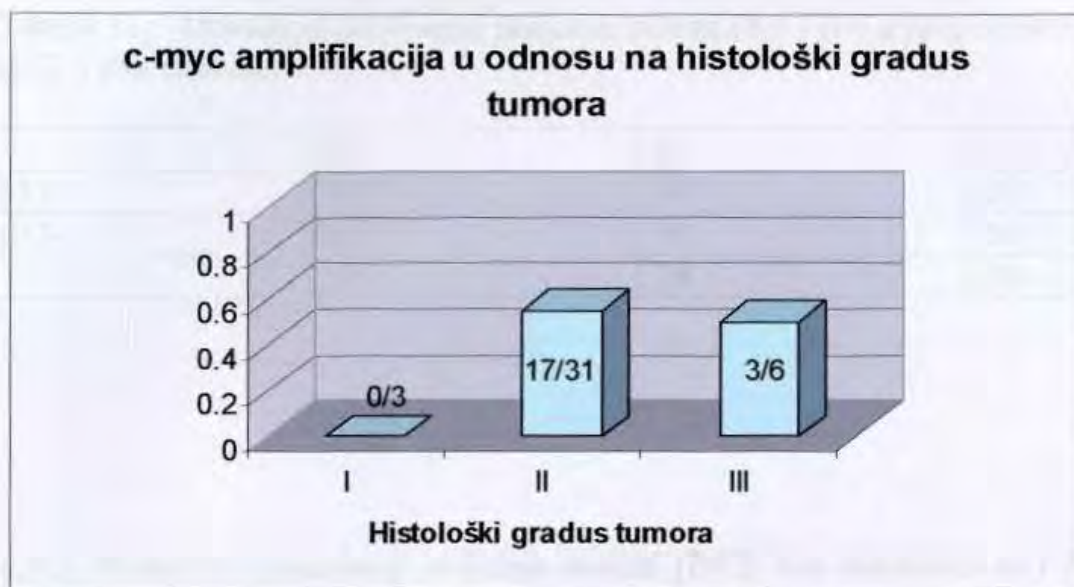


Figura 15. Zavisnost c-myc amplifikacije od histološkog gradusa tumora

Nije pokazana statistički značajna razlika u učestalosti amplifikovanog c-myc gena od histološkog gradusa tumora (χ^2 test, $p > 0.05$), mada kao što smo već spomenuli, s obzirom da je većina karcinoma bila gradusa II (31/40), data analiza nije u potpunosti relevantna.

4.3. Korelacija ispitivanih alteracija gena (p53, c-myc) sa tokom maligne bolesti u N₊ grupi bolesnica

Korelacija između ispitivanih genskih alteracija i toka maligne bolesti analizirana je samo u grupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima (N₊), s obzirom da je u grupi bolesnica bez prisutnih regionalnih metastaza detektovana samo jedna mutacija. U ispitivanoj grupi N₊ bolesnica, kod 20 bolesnica su detektovane mutacije u p53 genu (20/70), dok je kod takodje 20 bolesnica detektovana amplifikacija c-myc onkogeno (20/40). U posmatranom vremenskom intervalu (opseg 6-127 meseci, medijana 47 meseci), 32/70

(46%) bolesnica su imale ponovno javljanje bolesti. Da bismo utvrdili da li ponovno javljanje bolesti koreliše sa prisustvom mutacija u p53 genu, upoređivana je učestalost ponovnog javljanja bolesti kod bolesnica sa prisutnim mutacijama (n= 20) sa učestalošću ponovnog javljanja bolesti kod bolesnica bez mutacija u p53 genu (n=50). Ponovno javljanje bolesti detektovano je kod 10/20 (50%) bolesnica sa p53 mutacijama i kod 22/50 (44%) bolesnica bez prisutnih p53 mutacija. χ^2 testom je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti između bolesnica sa prisutnim i odsutnim p53 mutacijama (Tabela 11).

Tabela 11. Učestalost ponovnog javljanja bolesti (R+ i R-) u grupi bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) p53 mutacija

	R+	R-	
p53+	10	10	20
p53-	22	28	50
	32	38	70

4.3.1. Period bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) kod bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu

Sve bolesnice sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima bile su podvrgnute adjuvantnoj (dodatnoj) hemioterapiji posle hirurške intervencije. Pošto je osnovni zadatak adjuvantne hemioterapije odlaganje ponovnog javljanja bolesti, uspešnost ove vrste terapije se meri procenom dužine slobodnog vremenskog intervala kod obolelih. Sa druge strane, uloga faktora predviđanja terapijskog odgovora (prediktivnog faktora) jeste sledeća: na osnovu njegovog statusa bilo bi moguće proceniti ishod terapijskog odgovora.

Kod bolesnica sa prisutnim/odsutnim mutacijama u p53 genu, prvo su Kaplan Meier-ovom metodom (Kaplan and Meier, 1958) izračunavane funkcije preživljavanja bez ponovnog javljanja bolesti. S obzirom na hipotezu da bi p53 zbog svoje uloge u regulaciji apoptoze, mogao biti faktor predviđanja terapijskog odgovora, upoređivan je vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti (DFI – disease free interval) kod bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu. Nije dobijena statistički značajna razlika (Log Rank test, $p > 0.05$, Figura 16).

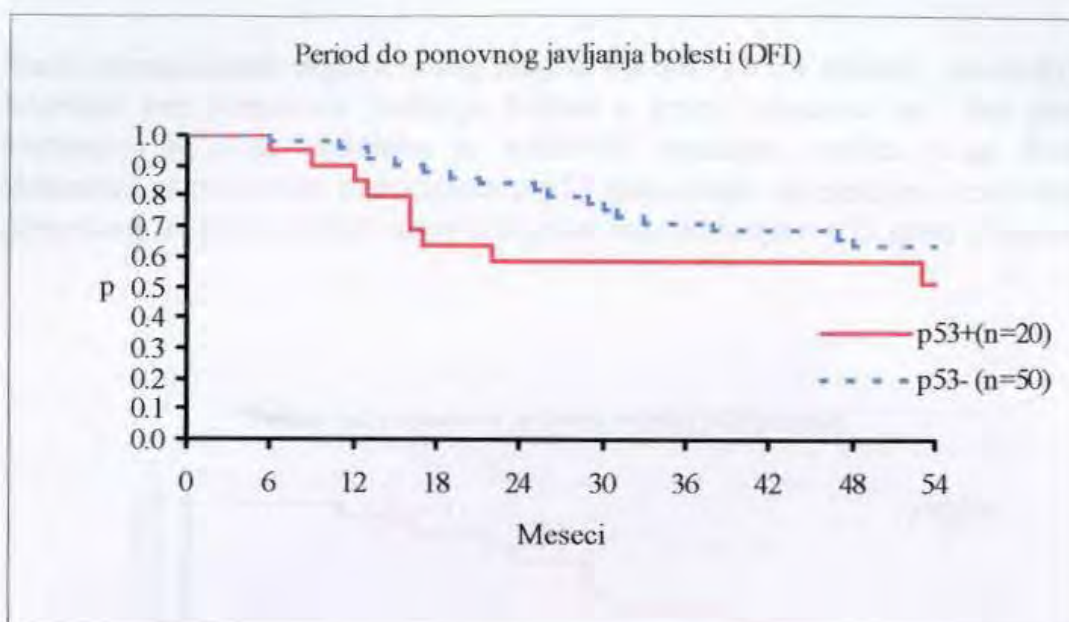


Figura 16. Period bez ponovnog javljanja bolesti kod bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) p53 mutacija

4.3.2. Period bez ponovnog javljanja bolesti u prvih 24 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu

Pošto su date bolesnice praćene u dužem vremenskom intervalu, analiziran je status p53 gena kao potencijalnog prediktora terapijskog odgovora, u odnosu na pojavu ranog relapsa (ponovnog javljanja bolesti) do 24 meseca, u odnosu na pojavu relapsa bolesti do 36 meseca i u odnosu na pojavu ponovnog javljanja bolesti posle 36 meseca praćenja.

Kada se razmatra ponovno javljanje bolesti u okviru praćenja od 24 meseca, uočava se da se, u grupi bolesnica sa p53 mutacijama (n=20), 8 od ukupno 10 relapsa bolesti, dešava baš u okviru prvih 24 meseci. Medjutim, u grupi bolesnica bez p53 mutacija, svega 8/22 ponovna javljanja bolesti dešavaju se tokom prva 24 meseca. Uočava se statistički značajno veća zastupljenost ponovnog javljanja bolesti u okviru prvih 24 meseca praćenja u grupi bolesnica sa prisutnim p53 mutacijama (χ^2 test, $p < 0.05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Učestalost ponovnog javljanja bolesti (R+ i R-) u okviru 24 meseca praćenja u grupi bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) p53 mutacija

	R+	R-	
p53+	8	12	20
p53-	8	42	50
	16	54	70

Kada je analizirana pojava ranog relapsa bolesti (do 24 meseci), upoređivanjem vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti u grupi bolesnica sa i bez mutacija u p53 tumor supresornom genu, dobijena je statistički značajna razlika (Log Rank test, $p=0.0214$). Bolesnice sa prisutnim mutacijama u p53 genu imale su značajno kraći vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti nego bolesnice bez mutacija u p53 genu (Figura 17).

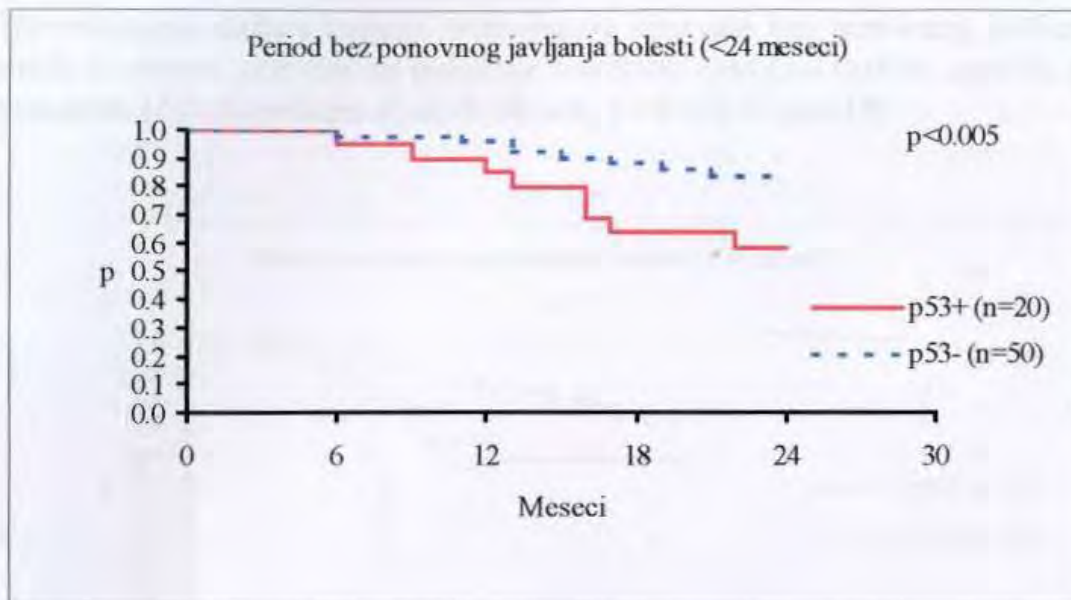


Figura 17. Vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti u prvih 24 meseci praćenja bolesnica bez (p53-) i sa (p53+) p53 mutacijama ($p<0.05$)

4.3.3. Period bez ponovnog javljanja bolesti u prvih 36 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu

U odnosu na pojavu ponovnog javljanja bolesti u vremenskom intervalu do 36 meseci, i dalje postoji 8 slučajeva ponovnog javljanja bolesti u grupi bolesnica sa prisutnim mutacijama u p53 genu ($n=20$). U grupi bolesnica bez prisutnih p53 mutacija uočava se 14/50 slučajeva ponovnog javljanja bolesti. Ne uočava se statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti između ispitivanih grupa bolesnica (χ^2 test, $p>0.05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Učestalost ponovnog javljanja bolesti (R+ i R-) u okviru 36 meseci praćenja u grupi bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) p53 mutacija

	R+	R-	
p53+	8	12	20
p53-	14	36	50
	22	48	70

Upoređivanje dužine trajanja vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti u okviru prvih 36 meseci praćenja ne pokazuje statistički značajnu razliku između grupa sa prisutnim i odsutnim p53 mutacijama (Log Rank test, $p > 0.05$) (Figura 18).

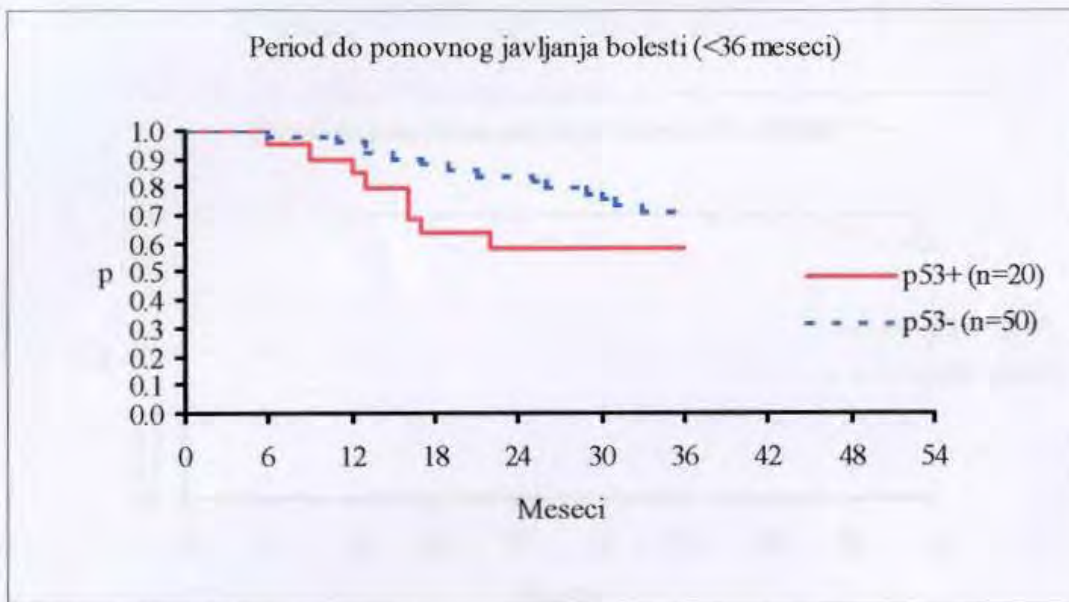


Figura 18. Vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti u 36 meseci praćenja bolesnica bez (p53-) i sa (p53+) p53 mutacijama

4.3.4. Period bez ponovnog javljanja bolesti nakon 36 meseci praćenja bolesnica sa i bez mutacija u p53 genu

Procena pojave ponovnog javljanja bolesti u vremenskom intervalu posle 36 meseci praćenja (kasni relaps), pokazuje da se u grupi bolesnica sa p53 mutacijama kasni relaps bolesti javlja u 2 od 9 slučajeva, dok se u grupi bolesnica bez p53 mutacija javlja u 9/31 slučaja. Ne uočava se statistički značajna razlika u učestalosti ponovnog javljanja bolesti nakon 36 meseci praćenja između ispitivanih grupa bolesnica (χ^2 test, $p > 0.05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Učestalost ponovnog javljanja bolesti (R+ i R-) nakon 36 meseci praćenja u grupi bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) p53 mutacija

	R+	R-	
p53+	2	7	9
p53-	9	22	31
	11	29	40

Upoređivanje dužine trajanja vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti nakon 36 meseci praćenja ne pokazuje statistički značajnu razliku između grupa bolesnica sa prisutnim i odsutnim p53 mutacijama (Log Rank test, $p > 0.05$) (Figura 19).

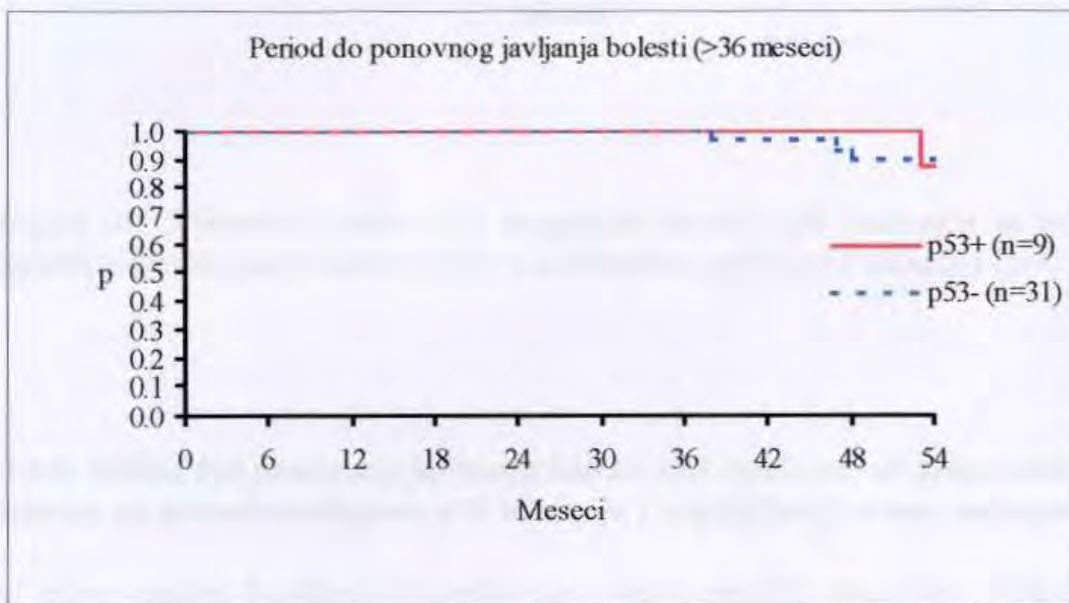


Figura 19. Vremenski interval bez ponovnog javljanja bolesti nakon 36 meseci praćenja bolesnica bez (p53-) i sa (p53+) p53 mutacijama

4.3.5. Period do progresije bolesti kod bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u odnosu na prisustvo/odsustvo p53 mutacija

U grupi bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama koje su kao adjuvantni tretman primale hemioterapiju, izdvojena je grupa bolesnica kod koje je tokom vremenskog intervala praćenja došlo do ponovnog javljanja bolesti ($n=32$). Ova grupa bolesnica je podeljena u odnosu na prisustvo p53 mutacija na bolesnice sa ($n=10$) i bez ($n=22$) p53 mutacija. Zatim je upoređivan vremenski interval do progresije bolesti (Progression Free Interval – PFI) između

datih grupa bolesnica. Pokazan je statistički značajno kraći vremenski interval do progresije bolesti kod bolesnica sa p53 mutacijama u odnosu na bolesnice bez p53 mutacija (Log Rank test, $p=0.0442$) (Figura 20).

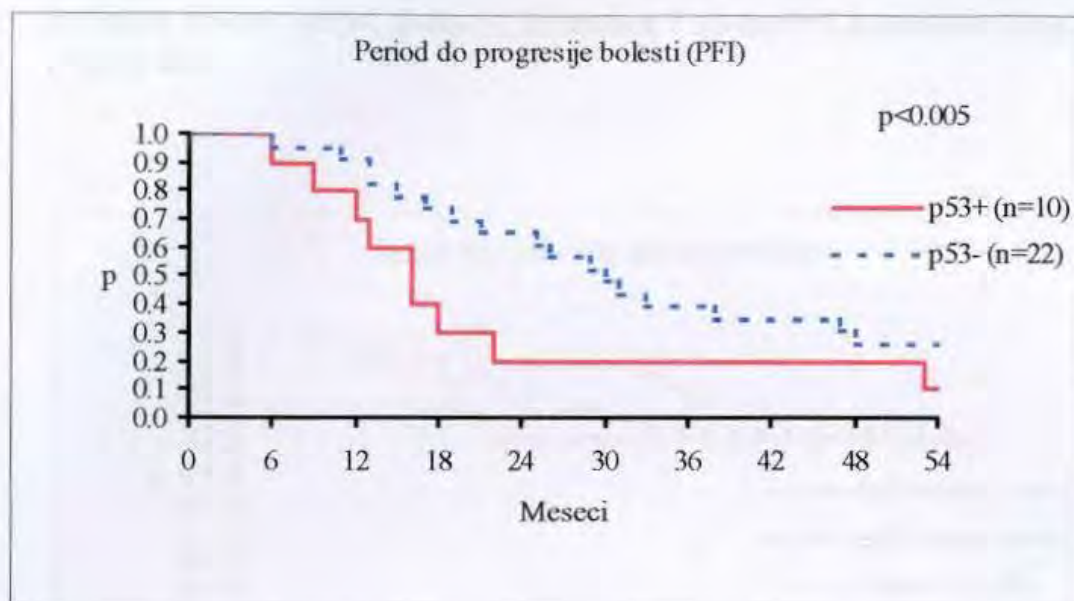


Figura 20. Vremenski period do progresije bolesti kod bolesnica sa ponovnim javljanjem bolesti u odnosu na prisustvo (p53+) ili odsustvo (p53-) p53 mutacija ($p<0.05$)

4.3.6. Period bez ponovnog javljanja bolesti kod ispitivane tri grupe bolesnica oformljene u odnosu na prisustvo/odsustvo p53 mutacija i amplifikacije c-myc onkogena

U daljoj analizi korelacije izmedju ispitivanih genskih alteracija i kliničkog toka bolesti u ispitivanoj grupi bolesnica, statusu p53 gena pridodat je i status c-myc gena. S obzirom da je praćena amplifikacija c-myc onkogena, pod *c-myc+* tumorima smatrali smo one uzorke kod kojih je registrovano povećanje bilo jednako ili više od 200% u odnosu na kontrolnu vrednost. Upoređivana je dužina vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti izmedju sledećih grupa bolesnica:

- Bolesnica sa prisutnim p53 mutacijama i amplifikovanim c-myc (p53+, c-myc+) (n=7);
- Bolesnica bez p53 mutacija i bez c-myc amplifikacije (p53-, c-myc-) (n=14);
- Bolesnica sa c-myc amplifikacijom (c-myc+) (n=20);

Poredjenje dužine vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti izmedju p53+, c-myc+ grupe bolesnica i p53-, c-myc- grupe bolesnica nije pokazalo statistički značajnu

razliku (Log Rank test, $p > 0.05$) (Figura 21). Takodje nije nadjena statistički značajna razlika ni pri poredjenju vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti izmedju $p53+c-myc+$ bolesnica i $c-myc+$ bolesnica (Log Rank test, $p > 0.05$) (Figura 21) Statistički značajna razlika nije nadjena ni pri poredjenju dužine vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti ($p53-$, $c-myc-$) bolesnica i ($c-myc+$) bolesnica (Log Rank test, $p > 0.05$) (Figura 21).

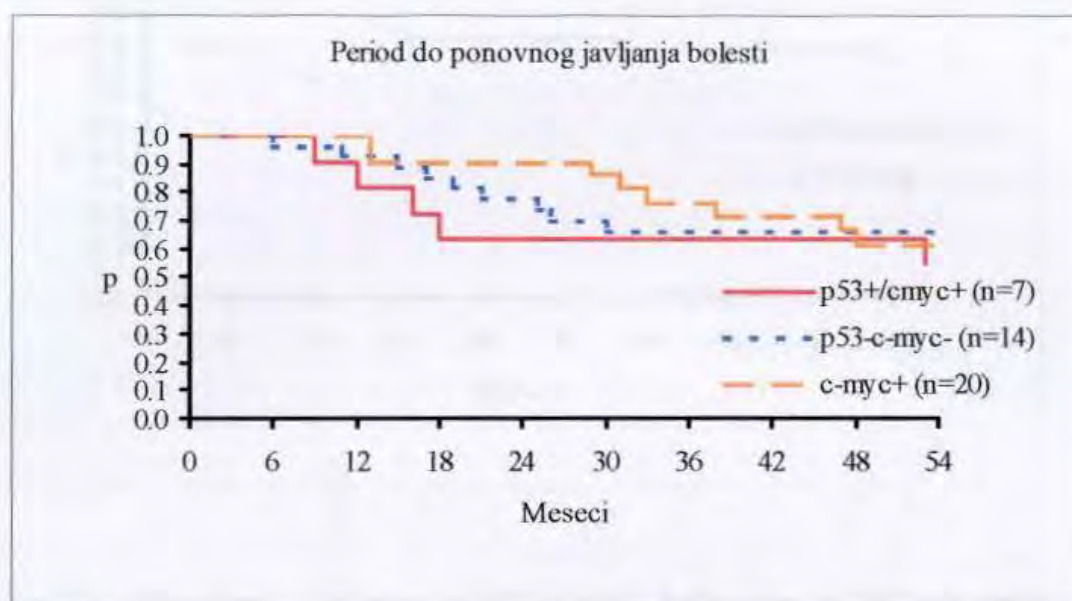


Figura 21. Vremenski period bez ponovnog javljanja bolesti kod ispitivane tri grupe bolesnica oformljene u odnosu na prisustvo/odsustvo $p53$ mutacija i amplifikacije $c-myc$ onkogeno

4.3.7. Poredjenje ukupnog preživljavanja bolesnica sa ($p53+/c-myc+$) ili bez ($p53-/c-myc-$) detektovanih genskih alteracija

Analizirano je i ukupno preživljavanje (OS) bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima. Bolesnice su podeljene u dve grupe u zavisnosti od prisustva/odsustva $p53$ mutacija i/ili $c-myc$ amplifikacije. Prvu grupu su činile $p53+/c-myc+$ bolesnice ($n=25$), a drugu grupu su činile $p53-/c-myc-$ bolesnice ($n=15$). U prvoj grupi $p53+/c-myc+$ bolesnica desilo se svih 6 smrtnih ishoda registrovanih u intervalu praćenja, dok u drugoj grupi $p53-/c-myc-$ bolesnica nije registrovan niti jedan smrtni ishod.

Poredjenje dužine ukupnog preživljavanja izmedju ove dve grupe bolesnica pokazalo je da je grupa bolesnica u kojoj su registrovane opisane genske alteracije imala značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na grupu bolesnica bez genskih alteracija (Log Rank test, $p=0.0286$) (Figura 22).

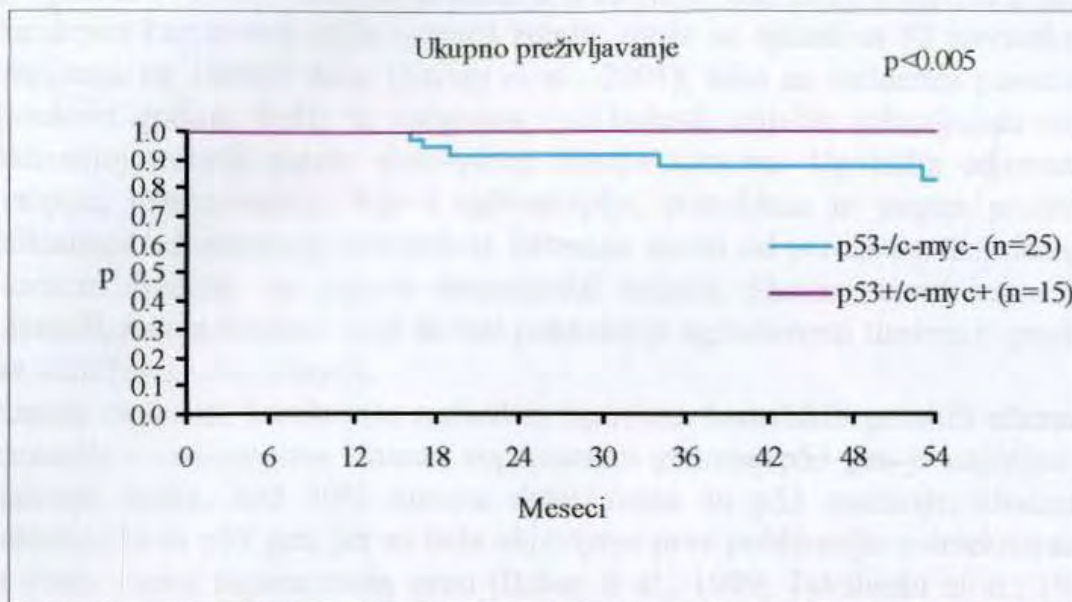


Figura 22. Poredjenje ukupnog preživljavanja bolesnica sa (p53+/c-myc+) ili bez (p53-/c-myc-) detektovanih genskih alteracija ($p < 0.05$)

5. DISKUSIJA

Kancer dojke je najčešće oboljenje kod žena širom sveta sa više od milion novih slučajeva godišnje (Ferlay et al., 2001). Incidenca i mortalitet su različiti kod populacija koje su geografski i etnički udaljene, najniža je u azijskim zemljama a najviša u Severnoj Americi. Incidenca karcinoma dojke u našoj zemlji, može se opisati sa 52 novootkrivena slučajeva oboljenja na 100000 žena (Ferlay et al., 2001), Iako se incidenca povećala u poslednjih dvadeset godina, bolja je prognoza ove bolesti, najviše zahvaljujući ranoj dijagnozi i aktivnijoj terapiji protiv sistemskog širenja kancera. Upotreba adjuvantne hormonske terapije, hemioterapije, kao i radioterapije, poboljšala je stepen preživljavanja, mada efikasnost adjuvantnog sistemskog tretmana zavisi od preciznog definisanja pacijenata sa visokim rizikom za pojavu metastatske bolesti. Shodno tome jasna je neophodnost identifikovanja markera koji će biti pokazatelji agresivnosti tumora i prediktori odgovora na određenu vrstu terapije.

Kancer dojke se karakteriše različitim tipovima somatskih genskih alteracija, kao što su mutacije u onkogenima i tumor supresornim genima. p53 gen je najčešće mutirani gen u kanceru dojke, kod 30% tumora detektovane su p53 mutacije. Godina 1989 bila je odlučujuća za p53 gen, jer su tada objavljene prve publikacije o detektovanim mutacijama u ovom tumor supresornom genu (Baker et al., 1989; Takahashi et al., 1989). Od tada je objavljeno više od 6000 publikacija koje su se bavile p53 alteracijama u humanim tumorima. Ovo obilje literature očekivano sadrži i mnoge konfliktne rezultate, što u velikoj meri otežava dobijanje jasne slike o mogućoj ulozi p53 gena kao prognostičkog ili prediktivnog markera. Pitanje koje se neminovno nameće je da li je moguće stečena znanja o p53 proteinu iskoristiti na najbolji mogući način, tj. upotrebiti ove informacije u kliničkoj praksi radi optimalnog zbrinjavanja svakog pacijenta ponaosob?

Jedan od razloga velikog broja kontradiktornih rezultata je korišćenje različitih metodologija za analizu p53. Za određivanje p53 alteracija najčešće su korišćene dve metode: DNK sekvenciranje i imunohistohemija (IHC- immunohistochemistry). IHC metoda ima mnoge prednosti za izvodjenje u kliničkim laboratorijama: ne zahteva visoko sofisticiranu i skupu opremu, ni specijalno obučen kadar i može se izvoditi praktično u svakoj laboratoriji. S obzirom da je IHC metoda znatno jeftinija od DNK sekvenciranja, postoji intencija da se sve što je metodološki moguće određuje sa IHC. Međutim relevantnost rezultata dobijenih IHC metodom nije zadovoljavajuća za anлізу nekih markera, kao što je na primer p53.

Najveći broj p53 genskih alteracija detektovanih u karcinomima dojke su tačkaste mutacije koje dovode do sinteze stabilnog, nefunkcionalnog i nedegradibilnog proteina koji se akumulira u tumorskim ćelijama, i u takvoj količini može biti detektovan IHC metodom. Korelacija između akumulacije p53 proteina, merene IHC metodom i p53 mutacija detektovanih SSCP elektroforezom ili sekvenciranjem je kod karcinomu dojke manja od 75% (Norberg et al., 1998; Geisler et al., 2001). Razlog ovom značajnom neslaganju je taj što sve mutacije ne vode sintezi stabilnog proteina; neke mutacije rezultiraju stvaranjem nepotpunog proteina koji ne može biti detektovan IHC metodom. p53 protein može da se akumulira u ćelijama i kad njegova sinteza nije posledica mutacija u p53 genu, već je odgovor na oštećenje DNK ili je posledica vezivanja drugih ćelijskih proteina za p53 protein, što na kraju dovodi do lažno pozitivnog IHC rezultata. Takođe, u bazi podataka o p53 mutacijama zabeleženo je 11,3% frameshift i 7,5% nonsense mutacija (Olivier et al., 2002), koje je nemoguće identifikovati IHC metodom. Većina studija koje su mutacije u p53 genu detektovale sekvenciranjem pokazala je jaku povezanost sa preživljavanjem, dok

studije koje su koristile IHC metodologiju nisu uspele u tome (Soussi and Beroud, 2001). Iz tih razloga, preporuka je da se analiza p53 vrši na nivou gena.

Neophodno je na početku diskusije razjasniti često mešanje pojmova prognostički i prediktivni. Prognostički faktor se može definisati kao marker koji u momentu dijagnoze može dati informacije o kliničkom toku i ishodu bolesti tj. o ukupnom preživljavanju (OS) i periodu bez ponovnog javljanja bolesti (DFI). Najjači prognostički faktor u karcinomu dojke je limfonodalni status, a pored njega i veličina tumora i histološki gradus tumora. Od molekularnih markera koji su ispitivani u protekloj deceniji, N-myc kod neuroblastoma ostaje najbolji prognostički marker. Prediktivni faktor se definiše kao marker koji može dati informaciju o odgovoru na specifičnu terapiju. Primer je status receptora za estrogen i progesteron koji kod bolesnica sa karcinomom dojke predviđa odgovor na hormonske terapije.

Osim nekoliko izuzetaka, nijedan od potencijalnih prognostičkih ili prediktivnih markera nije još dao konzistentne rezultate u nezavisnim kliničkim studijama. Razlozi mogu biti razni: od neodgovarajućeg odabira grupe pacijenata do metodoloških problema što je već spomenuto. Uvodjenje novog potencijalnog markera u kliničku praksu je komplikovan proces i obuhvata više faza. Studije Faze I su istraživačke studije koje imaju za cilj da ispituju povezanost između prognostičkog faktora i parametara bolesti kao i da standardizuju metodologiju. Studije Faze II treba da definišu kliničku upotrebljivost potencijalnog markera definisanjem optimalne granične (cutt-off) vrednosti. Studije Faze I i Faze II su retrospektivne studije i treba da budu izvodjene u strogo definisanim grupama pacijenata. Studije Faze III su velike, prospektivne studije koje već potvrđeni novi marker korelišu sa drugim definisanim faktorima. Može se smatrati da je ispitivanje p53 statusa u humanim kancerima na kraju Faze I. Nekoliko meta-analiza je pokazalo da uprkos neslaganjima u literaturi p53 status može imati prognostički značaj kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, ne-Hoćkinovih limfoma i kod kancera dojke. Studije Faze II treba da otkriju pravi potencijal korišćenja p53 statusa u kliničkoj praksi.

5.1. Učestalost p53 mutacija u tumorskom tkivu bolesnica sa karcinomom dojke

Studije koje su se bavile ispitivanjem učestalosti mutacija u p53 genu pokazale su širok opseg vrednosti, od 15 do 71% (Andersen and Borresen, 1995; Pharaoh et al., 1999; Hill and Sommer, 2002; Borresen-Dale 2003). Razlog ovako različitim vrednostima za učestalost p53 mutacija može biti u veličini fragmenta p53 gena koji je analiziran. Naime, mada je većina radova analizirala 5, 6, 7, i 8 ekson, određeni broj studija je detektovao mutacije u celom kodirajućem regionu p53 gena (eksoni 2-11). Frekvencija mutacija kod N_0 bolesnica je generalno niža (15-18%), nego u N_+ grupama, a takodje metastatski kancer ima veći procenat p53 mutacija (Tabela 15.). Zabeleženo je i povećanje učestalosti p53 mutacija tokom progresije bolesti. U studiji Norberg-a et al. (2001) na grupi bolesnica sa karcinomom dojke koje su sve imale ponovno javljanje bolesti (relaps), primećeno je da je veća učestalost mutacija u metastatskim deponitima nego u primarnim tumorima.

U našem radu detektovali smo 25 p53 mutacija u grupi od 100 bolesnica (25%), što je u saglasnosti sa podacima iz literature, naročito sa rezultatima studije Conway-a et al. (2002), koji su u neselektovanoj grupi bolesnica sa karcinomom dojke dobili učestalost p53 mutacija od 24%. Ako našu celu grupu podelimo na N_+ i N_0 bolesnice situacija je sledeća: 24 mutacije su detektovane u grupi od 70 N_+ bolesnica (34%) i samo jedna mutacija u grupi 30 N_0 bolesnica (3%). Logično je očekivati veću zastupljenost mutacija u N_+ grupi što smo i dobili a i zabeleženo je u literaturi (Geisler et al., 2001). Imajući u vidu da smo u

N₀ grupi bolesnica detektovali samo jednu mutaciju, dobijeni podatak nije relevantan za dalju diskusiju. Neophodno je u daljem istraživanju povećati broj ispitivanih N₀ bolesnica kako bismo mogli adekvatno uporediti razliku u učestalosti mutacija između N₊ i N₀ grupa.

Distribucija detektovanih p53 mutacija po eksonima bila je sledeća: 40% mutacija je locirano u eksonu 5, 24% u eksonu 6, 32% u eksonu 7 i svega 4% u eksonu 8. U skladu sa radovima ostalih autora i mi smo većinu mutacija detektovali u eksonima 5-7 (Borresen et al., 1995; Tsuda et al., 1998; Kucera et al., 1999).

Tabela 15. Učestalost p53 mutacija kod bolesnica sa karcinomom dojke - pregled literature

Studija	Grupa bolesnica	Broj bolesnica	P53 mutacije (%)
Andersen et al., 1993.	neselektovana	163	22
Elledge et al., 1993.	N ₀	200	14
Thorlacius al., 1993.	neselektovana	106	19
Calefi et al., 1994.	neselektovana	192	22
Saitoh et al., 1994.	neselektovana	52	39
Bergh et al., 1995.	neselektovana	312	22
	N ₊	97	30
	N ₀	201	18
Borresen et al., 1995.	neselektovana	600	20
Shiao et al., 1995.	neselektovana	92	20
	bela populacija	47	19
	crna populacija	45	20
de Witte 1996.	neselektovana	142	34
Gretarsdottir 1996.	neselektovana	186	16
Kovach et al., 1996.	neselektovana	44	30
Seshadri et al., 1996.	neselektovana	727	8
Soong et al., 1997.	neselektovana	375	19
Valgardsdottir 1997.	neselektovana	87	17
Berns et al., 1998.	metastatski	222	35
Falette et al., 1998.	N ₀	113	16
Iacopetta et al., 1998.	N ₀	422	18
Tsuda 1998.	N ₊	150	25
Alsner et al., 2000.	neselektovana	315	23
Blaszyk et al., 2000.	neselektovana	90	36
Berns et al., 2000.	metastatski	243	37
Kandioler-Ecker. 2000.	lokalno odmakli	67	19
Geisler et al., 2001.	lokalno odmakli	91	29
Powell et al. 2001.	neselektovana	908	19
Simao et al., 2002.	neselektovana	120	20
Conway et al., 2002.	neselektovana	456	24
Bonnefoi et al., 2002.	neselektovana	30	27
Marchetti et al., 2003.	N ₊	13	23
Geisler et al., 2003.	lokalno odmakli	35	51

Većina studija koja je analizirala ceo kodirajući region p53 gena (eksoni 2-11), pronašla je da procenat detektovanih mutacija van eksona 5-8 ne prelazi 10%. Nekoliko grupa autora je pokazalo da mlađe pacijentkinje sa karcinomom dojke imaju veću učestalost p53 mutacija (Berns et al., 2000), što je verovatno posledica veće verovatnoće nosilaca alterisanih BRCA1/2 gena u mlađoj populaciji. Novija istraživanja koja su ispitivala učestalost p53 mutacija kod nosioca naslednih BRCA1/2 mutacija, pokazala su da je frekvencija p53 mutacija veća nego kod sporadičnih tumora (Greenblatt et al., 2001). Ovi rezultati ukazuju da funkcija BRCA1/2 tumor supresornih proteina utiče na tip p53 mutacija i njihovu distribuciju kod kancera dojke (Gasco et al., 2003), što otvara vrata istraživanjima oba gena u istim grupama bolesnica.

5.2. Zavisnost učestalosti mutacija u p53 genu od parametara tumora

Ispitivana je učestalost mutacija u eksonima 5-8 p53 gena u zavisnosti od limfonodalnog statusa, veličine tumora, histološkog gradusa, histološkog tipa tumora i od združenog statusa steroidnih receptora.

Limfonodalni status je najstariji i najjači prognostički faktor u karcinomu dojke. Bolesnice sa karcinomom dojke koje u momentu dijagnoze nisu imale regionalne limfne čvorove zahvaćene metastazama (N_0), imaju verovatnoću preživljavanja od 70-80% bez razvijanja metastaza. Za bolesnice koje su u momentu dijagnoze karcinoma dojke imale regionalne limfne čvorove zahvaćene metastazama (N_+), verovatnoća je 80% da će u nekom vremenu razviti udaljene metastaze (Mori et al., 2002). S obzirom da alterisani p53 protein ne može da funkcioniše kao tumorski supresor, logično je očekivati da N_+ bolesnice imaju veću učestalost p53 mutacija. Medjutim, pregledom literature primetili smo da ne postoji usaglašenost dobijenih rezultata, štaviše veći broj studija nije pokazao povezanost između p53 mutacija i limfonodalnog statusa (Tabela 16). U našem radu pokazana je statistički značajna razlika u učestalosti p53 mutacija u zavisnosti od limfonodalnog statusa: od 25 detektovanih mutacija samo jedna je locirana u N_0 grupi bolesnica što je u skladu sa rezultatima nekoliko grupa autora (Silvestrini et al., 1996; Sjogren et al., 1996; Elledge et al., 1998; Overgaard et al., 2000; Alsner et al., 2000). Adekvatno objašnjenje za ovako različite rezultate ne postoji, i odgovor treba tražiti u potpunom rasvetljavanju puteva kancerogeneze i progresije tumora. Osim toga, da bi se pravilno ispitala korelacija p53 statusa i limfonodalnog statusa, treba precizno definisati grupe pacijentkinja homogene u odnosu na ostale parametre tumora.

Veličina tumora utiče na prirodni tok bolesti i zajedno sa limfonodalnim statusom predstavlja značajan prognostički faktor u odnosu na ukupno preživljavanje (Balsley et al., 1994). Pregledom literature uvideli da takodje ne postoje usaglašeni rezultati koji se odnose na povezanost p53 mutacija i veličine tumora (Tabela 16). Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku između učestalosti mutacija u p53 genu i veličine tumora kako u celoj grupi, tako i kod N_+ bolesnica, što je u saglasnosti sa rezultatima više studija (Kucera et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Rahko et al., 2003). Medjutim postoje podaci u literaturi koji ukazuju na veću učestalost p53 mutacija kod bolesnica sa većim tumorima (Alsner et al., 2000; Overgaard et al., 2000; Powell et al., 2000), što je lako objasniti imajući u vidu da što je veći tumor, ima više ćelija sa mogućnošću metastaziranja. Veličina tumora može biti indirektni pokazatelj brzine rasta, a brzina rasta odražava agresivnost tumora.

Histološki gradus tumora je značajno povezan sa dužinom perioda bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) i dužinom ukupnog preživljavanja (OS), (Elston et al., 1991). Bolesnice sa tumorima višeg gradusa (GIII) koji su slabo diferentovani i visoko proliferativni, imaju lošiju prognozu u odnosu na bolesnice sa tumorima gradusa I. Veliki broj studija koji je analizirao povezanost između p53 alteracija i histološkog gradusa tumora, zabeležio je veću učestalost p53 mutacija u tumorima višeg histološkog gradusa (Fresno et al., 1997; Falette et al., 1998; Van Slooten et al., 1999; Overgaard et al., 2000; Alsner et al., 2000; Powell et al., 2000).

U našoj ispitivanoj grupi bolesnica, kako u celoj grupi tako i kod N₊ bolesnica nije pronađena statistički značajna povezanost između frekvencije p53 mutacija i histološkog gradusa tumora, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima nekih autora (Kucera et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Rahko et al., 2000). Međutim kao što je već spomenuto u rezultatima, s obzirom da je najveći broj ispitivanih tumora bio gradusa II (79/100), nismo bili u mogućnosti da izvršimo relevantnu analizu. Neophodno je uključivanje većeg broja bolesnica različitog histološkog gradusa u studiju kako bi se omogućila adekvatna analiza zastupljenosti mutacija u p53 genu u zavisnosti od histološkog gradusa tumora.

Tabela 16. Zavisnost p53 alteracija od parametara tumora – pregled literaure

Studija	n	Limfonodalni status	Veličina tumora	Histološki gradus	Histološki tip	ER,PR status
Fresno et al., 1997.	174	–	NS	SS	–	SS
	N ₀					
Falette et al., 1998.	113	–	NS	SS	–	SS
	N ₀					
Van Slooten et al., 1999.	188	NS	NS	SS	–	–
Kucera et al., 1999.	205	NS	NS	NS	NS	NS
Alsner et al., 2000.	315	SS	SS	SS	SS	SS
Takahashi et al., 2000.	76	NS	NS	NS	–	NS
Overgaard et al., 2000.	294	SS	SS	SS	SS	SS
Powell et al., 2000.	178	NS	SS	SS	–	SS
Pezeski et al., 2001.	51	NS	NS	NS	–	NS
Tessitore et al., 2002.	13	NS	–	NS	–	–
Rahko et al., 2003.	254	NS	NS	NS	SS	SS

- SS - statistički značajna povezanost (p<0.05);
- NS – povezanost nije statistički značajna

Histološki tip tumora se najčešće razmatra kroz dva najzastupljenija tipa invazivnog karcinoma dojke, invazivni duktalni karcinom (IDC) i invazivni lobularni karcinom dojke (ILC). U celoj ispitivanoj grupi bolesnica (n=100), od 25 detektovanih mutacija čak 22 su bile locirane u IDC uzorcima. Razlika u zastupljenosti mutacija između IDC i ILC potvrđena je i statističkom obradom podataka ($p < 0.01$). Ista situacija se ponovila i u N_+ grupi bolesnica, od ukupno 24 detektovane mutacije, 21 je bila locirana u IDC uzorcima ($p < 0.025$). Pregledom literature, utvrdili smo da je nekoliko studija dobilo iste rezultate, tj. značajno veću zastupljenost p53 mutacija u invazivnom duktalnom tipu karcinoma dojke (Marchetti et al., 1993; Alsner et al. 2000; Overgaard et al., 2000; Rahko et al., 2003). Nijedna grupa autora koja je dobila ovakve rezultate nije ponudila adekvatno objašnjenje. Da bismo utvrdili da li je pomenuta razlika posledica različite zastupljenosti histoloških gradusa u IDC i ILC tipu, testirali smo učestalost gradusa II prema gradusima I/III u IDC i ILC (Rezultati, Tabela 6.). Nije dobijena statistička značajnost, najverovatnije zbog male zastupljenosti gradusa I i III.

Uprkos jedinstvenom poreklu, od terminalne duktalno lobularne jedinice dojke (Lakhani et al., 1999), invazivni duktalni i invazivni lobularni karcinom dojke se razlikuju po svojoj histološkoj strukturi i prirodnom toku bolesti (Harris et al., 1992). Iako IDC i ILC imaju sličnu prognozu (Peiro et al., 2000), različito metastaziraju, npr. metastaze u kostima su češće kod pacijenata sa ILC (Borst and Ingold, 1993; Jain et al., 1993). Invazivni duktalni i invazivni lobularni karcinom razlikuju se i po svojim biološkim karakteristikama. Na primer, razlikuju se po statusu receptora za steroidne hormone i brzini proliferacije – ILC su češće ER+ i PR+ i sporije proliferišu od IDC (Kruger et al., 1999). Takođe, pokazana je niža ekspresija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), do sada najpotentnijeg faktora angiogeneze (Ferrara, 1999), u invazivnom lobularnom u odnosu na invazivni duktalni tip karcinoma dojke (Lee et al., 1998).

Da bi se dobila jasna slika razlika između IDC i ILC neophodno je dizajnirati studije koje bi omogućile analizu bio-molekularnih profila ova dva histološka tipa. Treba odabrati biomarkere od kojih je svaki klinički relevantan, a koji u zajedničkoj analizi mogu obezbediti informaciju o različitoj biologiji IDC i ILC. U svojoj interesantnoj studiji grupa italijanskih autora (Coradini et al., 2002), je ispitala relacije između različitih bioloških parametara povezanih sa hormonskom zavisnošću (ER, PR status), apoptozom (p53, bcl-2), i angiogenezom (VEGF) u invazivnom duktalnom i invazivnom lobularnom karcinomu dojke. Njihovi rezultati su potvrdili hipotezu da su IDC i ILC dva odvojena, fenotipski nepovezana entiteta, pri čemu su dobili da se ILC u odnosu na IDC karakteriše većom ER pozitivnošću, nižom proliferacijom, nižim VEGF, odnosno da je IDC agresivniji histološki tip.

S obzirom da je većina radova dobila veću zastupljenost p53 mutacija u IDC, to se može objasniti različitim biološkim osobinama IDC u odnosu na ILC. Verovatno je da veća učestalost p53 mutacija u IDC kontribuirala biološki agresivnijem fenotipu IDC tumora.

Status steroidnih receptora. Merenje koncentracije ER i PR u tumorskom tkivu određuje hormonsku zavisnost/nezavisnost tumora što je neophodna informacija za uključivanje endokrine terapije (tamoksifen) u lečenje pacijenta (Mori et al., 2002). Takođe prihvaćeno je da prisustvo ER predviđa manji rizik od ponovnog javljanja bolesti i dobro ukupno preživljavanje (Clark and McGuire, 1988).

Najveći broj studija koji je analizirao pojavu mutacija u p53 genu, pratio je i njihovu zavisnost od statusa receptora za steroidne hormone. Rezultati su različiti; određeni broj

radova utvrdio je veću učestalost p53 mutacija u ER-PR- tumorima (Falette et al., 1998; Powell et al., 2000; Alsner et al., 2000; Rahko et al., 2003), dok jedan broj studija nije pokazao takvu zavisnost (Kucera et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Pezehski et al., 2001). Studija japanske grupe autora (Takahashi et al. 2000), pokazala je da mutacije u p53 genu i gubitak ekspresije receptora za estrogen imaju odvojene prognostičke uloge u karcinomu dojke. Iako precizni mehanizmi odgovorni za razliku između ova dva prognostička faktora za sada ostaju nepoznati postoje različite pretpostavke. Moguće je da mutacije p53 gena ubrzavaju biološki malignitet i/ili dovode do rezistentnosti na hemio- i radioterapiju ćelija tumora (O'Connor et al., 1997), što dovodi do povećane smrtnosti pacijenta, dok gubitak ekspresije ER određuje lokalnu agresivnost i metastatski potencijal tumorskih ćelija (Platet et al., 1998), što rezultira ranim relapsom.

Takahashi i saradnici (Takahashi et al., 2000) su pokazali još i da p53 mutacije i gubitak ekspresije ER deluju kooperativno kao snažan faktor rizika koji utiče kako na ukupno preživljavanje tako i na dužinu perioda bez ponovnog javljanja bolesti. Ovakav aditivni efekat dva faktora nije samo dokaz njihove odvojene uloge u prognozi, već je jako značajan sa kliničke tačke gledišta.

Analiza p53 statusa u našoj grupi bolesnica (kako u celoj grupi, tako i u N₊ grupi), u zavisnosti od združenog statusa receptora za steroidne hormone (ER,PR), nije pokazala statističku značajnost, što se shodno prethodnoj diskusiji može objasniti odvojenim prognostičkim ulogama p53 mutacija i gubitka ekspresije ER.

5.3. c-myc i karcinom dojke

Pokazano je da je c-myc onkogen amplifikovan i/ili povećano eksprimiran u više tipova humanih kancera (Marcu et al., 1992; Nass and Dickson, 1997; Nessbit et al., 1999; Liao and Dickson 2000). Brojni eksperimenti *in vivo* pokazali su vezu između izmenjene ekspresije ovog gena i razvića i progresije kancera (Marcu et al., 1992; Nass and Dickson, 1997; Nessbit et al., 1999; Liao and Dickson 2000). Povećana ekspresija c-myc gena može dovesti do čitavog niza događaja: izmenjene progresije ćelijskog ciklusa, genomske nestabilnosti, i do tumorogeneze. Ipak, kod karcinoma dojke studije o povezanosti između biološke funkcije i moguće kliničke upotrebe c-myc amplifikacije nisu dale ujednačene rezultate.

Radovi koji su ispitivali c-myc u karcinomu dojke, pokazali su jako različite procene amplifikovanog c-myc: 1-94% (Liao and Dickson, 2000), dok se u meta-analizi 29 studija (Deming et al., 2000), procenat amplifikovanog c-myc kretao od 1-50%. Razlozi ovako velikoj varijaciji mogu biti u niskoj osetljivosti nekih metoda, različito dizajniranim grupama u odnosu na patobiološke osobine tumora kao i različitim brojem pacijenata uključenim u studije. Osim učestalosti amplifikovanog c-myc gena razlikuju se i nivoi ekspresije mRNK i samog proteina i kreću se od 22-95% za mRNK i 50-100% za c-myc protein (Liao and Dickson, 2000).

Većina studija koja je detektovala c-myc protein IHC metodom, pokazala je da 50-100% kancera dojke ima povećane nivoe c-myc proteina (Agnantis et al., 1992; Sacani et al., 1992; Hehir et al., 1993; Spaventi et al., 1994; Pietilainen et al., 1995). Očito je da je procenat kancera dojke sa povećano eksprimiranim c-myc proteinom veći od onih sa amplifikovanim c-myc genom. Ovo ukazuje da u mnogim slučajevima, izmenjena

ekspresija ili izmenjena stabilnost mRNK ili proteina može biti mehanizam za povećanje nivoa c-myc proteina, što je u saglasnosti sa prvim zapažanjima da povećana ekspresija c-myc proteina prethodi genskoj amplifikaciji i ima ulogu u amplifikaciji mnogih drugih gena (Mai, 1994).

U cilju boljeg razumevanja relacije gen-mRNK-protein, u nedavno objavljenom radu američka grupa autora (Blancato et al., 2004), analizirala je istovremeno amplifikaciju c-myc gena, ekspresiju RNK i ekspresiju proteina *in situ* metodama. Prednost *in situ* metoda je što su jasno razdvojene komponente strome i komponente samog kancera. Za ispitivanje na sva tri nivoa korišćene su *in situ* metode: za određivanje genske amplifikacije korišćena je FISH metoda (Fluorescent *in situ* Hibridization), za detekciju mRNK korišćena je ne-radioaktivna *in situ* hibridizacija (ISH), i za određivanje ekspresije proteina upotrebljena je IHC metoda. Svi uzorci su bili N₊ i visokog gradusa. Rezultati su sledeći: c-myc genska amplifikacija zastupljena je u 70% slučajeva, povećana ekspresija mRNK zabeležena je u 92% uzoraka i povećana ekspresija proteina detektovana je u 70% slučajeva. U većini slučajeva gde je c-myc gen amplifikovan (84%), radilo se o 1-2 kopije gena što je u saglasnosti sa drugim radovima koji su amplifikaciju određivali FISH-om ili PCR metodom. (Jenkins et al., 1997; Deming et al., 2000), kao i sa rezultatima našeg rada. Ova grupa autora je pokazala da je genska amplifikacija značajno povezana sa ekspresijom mRNK i proteina.

Da bi se dobila jasna slika o ulozi c-myc u stvaranju tumora i njegovoj progresiji, neophodno je analizirati status c-myc u tumorima dojke nižeg gradusa, premalignim lezijama kao i u neinvazivnim neoplazijama (DCIS), kako bi se utvrdilo da li se putevi c-myc amplifikacije razlikuju u različitim fazama inicijacije i progresije bolesti. Neke ranije studije su pokazale da je samo mala promena u regulaciji c-myc dovoljna za pojavu genske nestabilnosti (Liao et al., 1998; 2000). Ovo postavlja već pomenuto pitanje da li ekspresija c-myc proteina prethodi ili prati gensku amplifikaciju tokom prirodnog toka bolesti kod bolesnica sa karcinomom dojke. Grupa nemačkih autora (Aulmann et al., 2000), analizirala je amplifikaciju c-myc FISH metodom u duktalnom *in situ* karcinomu dojke (DCIS). Pokazali su da je amplifikacija c-myc značajno povezana sa visokom proliferativnom aktivnošću i većim tumorima, odnosno da je c-myc verovatno uključen u razviće agresivnijeg fenotipa DCIS. Jedna druga grupa autora (Robanus-Maandag et al., 2003), FISH-om je određivala amplifikaciju c-myc u *in situ* i invazivnoj komponenti u istom uzorku karcinoma dojke. Amplifikacija c-myc detektovana je samo u invazivnoj komponenti, iz čega su autori zaključili da je alteracija c-myc povezana sa progresijom od *in situ* do invazivnog karcinoma dojke. Pretpostavlja se da u čistim *in situ* karcinomima dojke, sama amplifikacija c-myc nije dovoljna za progresiju do invazivnog karcinoma dojke. Više eksperimenata na transgenim miševima je pokazalo da su dodatne genske alteracije neophodne za promociju tumorogeneze. Genske alteracije za koje je pokazano da imaju sinergističko dejstvo sa amplifikacijom c-myc, uključuju ekspresiju bcl-2 (Jager et al., 1997), amplifikaciju c-erbB-2 (Cardiff et al., 1991), i inaktivaciju p53 gena (McCormack et al., 1998).

Ispitivanje prognostičkog značaj c-myc amplifikacije u karcinomu dojke dalo je kontroverzne rezultate. Centralna uloga c-myc proteina u ubrzavanju ćelijske proliferacije vodi zaključku da amplifikacija ovog gena može biti povezana sa lošijim preživljavanjem pacijenata, što je pokazano u mnogim radovima (Berns et al., 1992,1996; Nass and Dickson, 1997; Nesbit et al., 1999; Visca et al., 1999, Liao and Dickson, 2000). Međutim veliki broj studija dao je suprotne rezultate (Melhem et al., 1992, Pietilainen et al., 1995,

Augenlich et al., 1997, Bieche et al., 1999), dok određeni broj radova nije pronašao ikakvu korelaciju između statusa c-myc i prognoze. Ovako različite prognostičke implikacije c-myc amplifikacije nisu iznenadjujući iz više razloga. Prvo, pokazano je da je amplifikacija c-myc povezana sa boljom diferencijacijom tumora i boljim preživljavanjem pacijenata sa kancerom testisa, ovarijuma, kolona i kancerom dojke (Sikora et al., 1985; Polaczar et al., 1989; Smith and Goh, 1996; Bieche et al., 1999). Drugo, c-myc može suprimirati ekspresiju VEGF (vaskularnog endotelijalnog faktora rasta) u tumorima (Barr et al., 2000), što također može biti povezano sa boljom prognozom). Treće, c-myc gen kodira sintezu više izoformi proteina c-myc koje mogu imati različite i često suprotne funkcije.

Postoji mali broj radova, naročito u karcinomu dojke, koji je pratio povezanost amplifikacije c-myc i odgovora na specifičnu antikancersku terapiju. Ovo predstavlja izazov za buduća istraživanja, imajući u vidu značajnu ulogu c-myc u apoptozi i rezultate nekih radova koji impliciraju da amplifikacija c-myc može uticati na rezistentnost na neke vrste tretmana kao što su; cisplatina (Walker et al., 1996), ili 5-fluorouracil (Riva-Lavielle, 1996).

U određenom broju studija pokazana je korelacija c-myc sa visokim histološkim gradusom, pozitivnim limfnim čvorovima kao i ER-PR- tumorima (Liao and Dickson, 2000). Medjutim u meta-analizi (Deming et al., 2000), potvrđena je samo korelacija između amplifikacije c-myc i PR-negativnih tumora. U našem radu nije pokazana korelacija amplifikovanog c-myc sa ispitivanim parametrima tumora. S obzirom da je c-myc analiziran samo u grupi od 40 N₊ tumora, dobijene rezultate treba proveriti u većoj grupi bolesnica.

5.4. Korelacija ispitivanih alteracija gena (p53, c-myc) sa tokom maligne bolesti u N₊ grupi bolesnica

5.4.1. p53 kao prognostički faktor u karcinomu dojke

Već smo pomenuli da veliki broj studija koji je analizirao p53 nije razgraničavao njegovu prognostičku i prediktivnu vrednost. Svi biomarkeri, povezani sa kliničkim ishodom, svrstavani su u istu kategoriju «prognostički faktori», bez obzira na to da li taj marker daje informaciju o biološkoj agresivnosti tumora ili odgovoru na specifičnu terapiju.

Prognostički faktor obezbeđuje informaciju o biološkoj agresivnosti tumora, što se odražava prirodnim tokom bolesti posle primenjene lokalne terapije. Prema tome, najbolje je analizirati prognostički značaj nekog markera kod pacijenata koji nisu primili neki vid sistemske terapije. Primer prognostičkog faktora je limfonodalni status (N). Prediktivni faktor predviđa verovatnoću odgovora na određenu vrstu terapije. Prognostičke i prediktivne osobine nekog faktora nisu uzajamno isključive, tako taj faktor može biti i

prognostički i prediktivni kao ER. Postavlja se pitanje da li je p53, prognostički ili prediktivni faktor, ili može biti i jedno i drugo?

S obzirom da je inaktivacija p53 gena mnogo češća u odmaklom kanceru dojke, da je povezana sa povećanom proliferacijom, rezistentnošću na apoptozu, kao i da olakšava metastatsko širenje kroz angiogenezu, treba očekivati da inaktivacija p53 bude povezana sa lošom prognozom.

Prve studije koje su pokušale da analiziraju ulogu mutiranog p53 gena u u prognozi kancera dojke bile su bazirane na detekciji mutiranog p53 proteina IHC metodom. Većina ovih studija nije pokazala mogući prognostički značaj povišeno eksprimiranog p53 proteina (Barbareschi et al., 1996; Elledge and Allred, 1998). (Tabela 17).

Tabela 17. Prognostički značaj p53 u karcinomu dojke - pregled studija koje su p53 analizirale IHC metodom.

Studija	n	Metodologija	OS
Bosari et al., 1992.	124	IHC	NS
Hanzel et al., 1992.	117	IHC	NS
Liponnen et al., 1993.	193	IHC	NS
Masood et al., 1993.	105	IHC	NS
Domagala et al., 1994.	227	IHC	NS
Taikikawa et al., 1994.	111	IHC	SS
Cunningham et al., 1994.	247	IHC	NS
Jacquimer et al., 1994.	106	IHC	NS
Haerslev et al., 1995.	490	IHC	NS
Rosen et al., 1995.	440	IHC	NS
MacGrogan et al., 1995.	942	IHC	SS
Sjogren et al., 1996.	308	IHC	NS
Seshadi et al., 1996	740	IHC	SS
Nakopoulou et al., 1996.	130	IHC	NS
Barbareschi et al., 1996.	91	IHC	NS

Na početku diskusije pomenuli smo ograničenja IHC metode, u smislu da ne može detektovati sve vrste p53 genskih alteracija kao i da u nekim slučajevima daje lažno pozitivne rezultate, što je mogući razlog rezultata prikazanih u Tabeli 17. U meta-analizi koja je obuhvatila više od 9000 pacijenata (Barbareschi et al., 1996), takodje nije pokazan prognostički značaj p53.

S druge strane, više od 25 studija koje su analizirale p53 na nivou gena (SSCP, sekvenciranje), i uključile u ispitivanje oko 6000 pacijenata pokazale su jak prognostički značaj p53 gena (Borresen-Dale, 2003). Pregled ovih studija dat je u Tabeli 18. 16 od ovde navedenih studija (3500 bolesnica) bilo je uključeno u meta analizu (Pharaoh et al., 1999), koja je pokazala da su mutacije u p53 genu povezane sa kraćim ukupnim preživljavanjem i kraćim periodom bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) kako kod N₀ tako i kod N₊ bolesnica.

Tabela 18. Prognostički značaj p53 u karcinomu dojke - pregled studija koje su p53 analizirale na nivou gena

Studija	n	Metodologija	OS
Andersen et al., 1993.	163	CDGE eksoni 5-8	SS
Elledge et al., 1993.	200 N ₀	SSCP eksoni 5-9	SS
Riou et al., 1993.	24	Sekvenc.eks.2-11	SS
Thorlacius et al., 1993, 1995.	106	CDGE eksoni 5,7,8	SS
Caleffi et al., 1994.	192	CDGE eksoni 5-9	NS
Saitoh et al., 1994.	52	DdF eksoni 2-11	SS
Bergh et al., 1995.	312	Sekvenc.cDNK	SS
Borresen et al., 1995.	600	CDGE eksoni 5-8	SS
Shiao et al., 1995	92	SSCP eksoni 5-8	SS
de Witte et al., 1996.	142	SSCP eksoni 5-8	SS
Gretarsdottir, 1996.	186	CDGE eksoni 5-8	SS
Kovach et al., 1996.	44	DdF eksoni 4-10	SS
Seshadri et al., 1996	727	SSCP eksoni 5,6	SS
Soong et al., 1997.	375	SSCP eksoni 4-10	SS
Valgardsdottir, 1997.	87	CDGE eksoni 5-8	SS
Berns et al., 1998.	222	SSCP eksoni 5-8	SS
Falette et al., 1998.	113 N ₀	Sekvenc.eks.2-11	SS
Iacopetta et al., 1998.	422 N ₀	SSCP eksoni 4-8	SS
Tsuda, 1998.	150 N ₊	SSCP eksoni 4-8	SS
Alsner et al. 2000.	315	DGGE eksoni 2-11	SS
Blaszyk et al., 2000.	90	DdF eksoni 4-10	SS
Berns et al., 2000.	243	Sekvenc.eks.2-11	SS
Kandioler-Eckersberger, 2000.	67	Sekvenc.eks.2-11	SS
Geisler et al., 2001.	91	CDGE eksoni 2-11	SS
Powell et al., 2001.	908	SSCP eksoni 4-8	SS
Simao et al., 2002.	120	SSCP eksoni 5-8	SS
Conway et al., 2002.	456	SSCP eksoni 4-8	SS
Marchetti et al., 2003.	13 N ₊	FAMA	SS
Lai et al. 2004.	271	Sekvenc.eks.5-8	SS

*DGGE-denaturing gradient gel electrophoresis (denaturišuća gradijent gel elektroforeza)

*CDGE-constant denaturant gel electrophoresis (konstantna denaturišuća gel elektroforeza)

*ddF-dideoxy fingerprinting

* FAMA-fluorescence assisted mismatch analysis

Da li je prognostički značaj svih mutacija isti, ostaje i dalje predmet novih istraživanja. Borresen i saradnici (Borresen et al., 1995), pokazali su da su pacijenti sa mutacijama lociranim u DNK-vezujućem domenu p53 (eksoni 5-8), imali lošiju prognozu od bolesnica sa mutacijama detektovanim van ovog regiona p53 gena. Berns i saradnici (Berns et al., 1998), pronašli su da su mutacije koje dovode do izmene amino-kiselina direktno uključenih u vezivanje proteina za DNK, takodje povezane sa lošijom prognozom. Ovi rezultati potvrđeni su u radu Alsnera i saradnika (Alsner et al., 2000), gde su pacijenti sa tačkastim mutacijama u DNK-vezujućem domenu pokazali agresivniji fenotip i kraće

preživljavanje. Za razliku od njih, Kučera i saradnici (Kucera et al., 1999), nisu pokazali da su mutacije u ovom regionu povezane sa ukupnim preživljavanjem.

Powell i saradnici (Powell et al., 2000), pronašli su da su mutacije koje dovode do denaturacije p53 proteina povezane sa lošijim preživljavanjem, dok nisu potvrdili rezultate prethodnih studija da su mutacije u DNK-vezujućem domenu takodje povezane sa lošom prognozom. Berg i saradnici (Bergh et al., 1995), su pokazali da su u okviru DNK-vezujućeg domena, bolesnice sa mutacijama u regionima II i V (Uvod, Slika 4) imale lošiju prognozu u odnosu na bolesnice sa mutacijama u regionima III i IV. Lošija prognoza za pacijente sa specifičnim p53 mutacijama ukazuje da je svaki tip mutacija povezan sa ispoljavanjem određenog fenotipa, i da je poželjno povezati analize p53 na nivou gena sa strukturnim analizama samog proteina, odnosno ispitati biološke i biohemijske efekte specifičnih mutacija.

Ovim se opet vraćamo na pitanje metodologije. Sekvenciranje celog kodirajućeg regiona gena predstavlja «zlatni standard» za analizu p53. Medjutim sekvenciranje je dugotrajna, skupa metodologija koja za izvodjenje zahteva obučen kadar. Naročito je teško odrediti sekvencu u trajnim histološkim preparatima, što predstavlja najčeći izvor tkiva za analizu. SSCP metoda, koja predstavlja elektroforetsko određivanje konformacionih promena u jednolančanoj DNK, je visoko osetljiva (detektuje oko 85% genskih alteracija) i znatno je jeftinija od sekvenciranja tako da se rutinski primenjuje u mnogim laboratorijama. 1995 godine grupa autora (Flaman et al., 1995), prvi put je opisala metodu baziranu na RNK koja detektuje mutacije koje se odražavaju na funkcionalnost proteina. Amplifikuje se p53 cDNK RT-PCR-om, a potom se putem plazmida umnožena DNK ubaci u kvasac. Ako je eksprimirani p53 wt, on će aktivirati transkripciju reporter gena, što znači da je protein funkcionalan. Na ovaj način moguće je testirati veliki broj uzoraka za relativno kratko vreme i istovremeno ispitati biološko značenje specifičnih mutacija. Ova metoda je poznata pod nazivom FASAY (Functional Assay for the Separation of Alleles in Yeast), i od prvog rada objavljenog 1995. korišćena je u mnogo studija (Chappius et al., 1999; Takahashi et al., 2000; Bonnefoi et al., 2002). Iako ova tehnika ne može zameniti sekvenciranje gena može biti metoda izbora za rutinsku analizu p53 mutacija u kliničkoj praksi.

Praćenjem naučne literature u poslednje dve godine može se primetiti da je veliki broj studija ispitivao uticaj alteracija u dva ili više gena na ukupno preživljavanje pacijenata. Imajući u vidu da je cilj istraživanja u onkologiji određivanje molekularnog profila svakog tumora ponaosob u smislu dizajniranja što preciznije, po mogućstvu individualne terapije, ova istraživanja su očekivana i neophodna. Opisaćemo rezultate nekih od ovih studija.

Grupa finskih autora (Rahko et al., 2003) ispitivala je prognostički značaj p53 i c-erbB-2 statusa kod bolesnica sa primarnim karcinomom dojke. C-erbB-2 je onkogen koji kodira membranski glikoprotein, sličan receptoru za epidermalni faktor rasta (EGFR), i amplifikacija ovog gena može biti povezana sa nekontrolisanim ćelijskim rastom. C-erbB-2 je amplifikovan i/ili povišeno eksprimiran u oko 25% karcinoma dojke, i povezan je sa N₊, ER,PR-negativnim tumorima, što rezultira pojavom ranog relapsa i lošim preživljavanjem (Borg et al., 1991). U radu je pokazano je da su bolesnice sa mutiranim p53 imale kraće preživljavanje od onih sa wt p53, što ukazuje na prognostički značaj p53. Sam c-erbB-2 status nije pokazao povezanost sa preživljavanjem. Značajan rezultat ove studije je da ko-ekspresija alterisanih i p53 i c-erbB-2 dramatično smanjuje OS pacijenata.

Grupa kanadskih autora (Bull et al. 2004) je u svom radu ispitivala združeni efekat mutacija u p53 genu i amplifikacije c-erbB-2 gena na ukupno preživljavanje kod N₀ bolesnica. Ova grupa pacijenata generalno ima dobru prognozu, mada oko 20% ipak dobije

relaps bolesti. Nameće se potreba za otkrićem novih biomarkera koji bi u okviru grupe sa dobrom prognozom, identifikovali podgrupu sa lošijom prognozom, koja bi bila agresivnije lečena. Rezultati ovog rada su pokazali da sam p53 status nema prognostički značaj u ovoj grupi, jer se dužina OS nije značajno razlikovala kod bolesnica sa mutiranim p53 u odnosu na bolesnice sa wt p53. Međutim, bolesnice koje su imale i mutirani p53 i amplifikovan c-erbB-2, imale su kraće preživljavane u odnosu na grupu sa wt p53 i wt c-erbB-2.

U našem radu, analizirano je i ukupno preživljavanje (OS) bolesnica sa prisutnim regionalnim metastazama u limfnim čvorovima. Bolesnice su bile podeljene u dve grupe u odnosu na prisustvo/odsustvo p53 mutacija i/ili c-myc amplifikacije: prvu grupu su činile p53+/c-myc+ bolesnice, a drugu grupu p53-/c-myc- bolesnice. Svih šest smrtnih ishoda u opisanom intervalu praćenja, dogodilo se u prvoj grupi bolesnica. Poredjenje dužine ukupnog preživljavanja između ove dve grupe pokazalo je da su bolesnice sa p53/c-myc alteracijama imale značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na grupu bez detektovanih genskih alteracija (Rezultati, Figura 22). Ukupno preživljavanje bolesnica samo sa p53 mutacijama (p53+), nije se značajno razlikovalo od preživljavanja bolesnica bez p53 mutacija (rezultati nisu prikazani zbog malog broja smrtnih slučajeva u p53+ grupi). Može se zaključiti da ispoljavanje alteracija u p53 tumor supresornom genu i c-myc onkogenu, u ovom slučaju određuje grupu bolesnica koja ima lošiju prognozu tj. kraće ukupno preživljavanje. Shodno prethodno pomenutim radovima (Rahko et al, 2003; Bull et al, 2004), možemo potvrditi da istovremena analiza više markera daje potpuniji uvid u biologiju tumora odnosno omogućava preciznije definisanje podgrupe bolesnica sa lošijom prognozom.

5.4.2. p53 kao prediktivni faktor u karcinomu dojke

S obzirom da je p53 uključen u kontrolu ćelijskog ciklusa, u popravak oštećene DNK, i u apoptozu, postoji jako biološko opravdanje za istraživanja da li su mutacije u p53 povezane sa odgovorom na terapiju agensima koji oštećuju DNK.

Eksperimentalne i kliničke studije pokazale su da antikancerski agensi indukuju apoptozu (Hickman, 1992; Ellis et al., 1997). p53 je ključni regulatorni gen u apoptotskim putevima, i eksperimentalni podaci su pokazali da tumori sa wt p53 bolje odgovaraju na terapiju antraciklinima od tumora sa mutiranim p53 (Lowe et al., 1993, 1994; Gudas et al., 1996). Nasuprot tome, mnoge *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da p53 status ne utiče na odgovor na terapiju taksanima (Woods et al., 1995; Brown et al., 1996; Jordan et al., 1996; Perego et al., 1996; Wahl et al., 1996; Lani et al., 1997; O' Connor et al., 1997; Fan et al., 1998). Takodje, pokazano je da bolesnice sa mutiranim p53 bolje odgovaraju na hemioterapiju paclitakselom (Lavarino et al., 2000; Kandioler-Eckersberger et al., 2000).

Ovi eksperimentalni podaci sugerišu da p53 status može biti prediktivni faktor za odgovor na hemioterapiju sa antraciklinima ili taksanima u kliničkoj praksi. Međutim podaci dosadašnjih istraživanja su delimično kontradiktorni i samim tim nameću dalja ispitivanja uloge p53 i drugih proteina u ćelijskom odgovoru na hemioterapiju ili stvaranju rezistentnosti.

Pokazano je da tamoksifen kao i hemioterapijski agensi može dovesti do oštećenja DNK (Shibutani et al., 1998). Međutim, ne postoji precizno objašnjenje kako su p53 alteracije povezane sa lošim odgovorom na terapiju tamoksifenom. Tamoksifen funkcioniše kao antiestrogen, vezujući se za receptor za estrogen (ER). Ali, neka njegova dejstva posredovana su aktivacijom transformišućeg faktora rasta β (TGF- β) i smanjenjem nivoa insulini sličnog faktora rasta 1 (IGF-1) u plazmi. Mutirani p53 inhibira antiproliferativni efekat TGF- β , tako što interferira sa njegovim signalnim putem. Takođe, wt p53 može delovati kao represor promotora IGF-1. Ova kompleksna mreža daje osnovu za povezivanje p53 sa signalnim putevima tamoksifena u ćelijama karcinoma dojke (Berns et al., 1998).

U Tabeli 19. prikazan je kratak pregled studija koje su kod bolesnica sa karcinomom dojke ispitivale povezanost p53 alteracija sa odgovorom na endokrinu terapiju.

Tabela 19. Pregled kliničkih studija o povezanosti p53 i odgovora na tamoksifen.

Studija	n	Metodologija	Vrsta terapije	Prediktivni značaj p53
Bergh et al., 1995.	298	sekvenciranje	TAM	mut.p53-rezistentni
Archer et al., 1995.	92	IHC	TAM	nema značaja
Silvestrini, 1996.	240	IHC	TAM	mut.p53-rezistentni
Elledge et al., 1997.	202	IHC	TAM	nema značaja
Berns et al., 1998.	401	LIA	TAM	mut.p53-rezistentni
Berns et al., 2000.	202	sekvenciranje	TAM	mut.p53-rezistentni

* TAM-tamoksifen

* LIA-luminometrijski esej

U studiji Arčera i saradnika (Archer et al., 1995), u grupi od 92 bolesnice sa metastatskim karcinomom dojke, gde je status p53 analiziran IHC metodom, nije pronađena statistički značajna povezanost između mutiranog p53 i odgovora na endokrinu terapiju. U studiji Eledža i saradnika (Elledge et al., 1997), koja je isto status p53 analizirala IHC metodom nije pokazan prediktivni značaj p53, ali je pokazano da za tu grupu pacijenata p53 ima prognostički značaj. Za razliku od ovih studija, radovi ostalih pomenutih grupa autora (Bergh et al., 1995; Silvestrini et al., 1996, Berns et al., 1998), pokazale su da bolesnice sa mutiranim p53 imaju značajno lošiji odgovor na tamoksifen od bolesnica sa wt p53.

Berns i saradnici (Berns et al., 2000), pokazali su u grupi od 202 bolesnice sa metastatskim karcinomom dojke da su mutacije u DNK-vezujućem domenu p53 povezane sa lošijim odgovorom na tamoksifen.

Rezultati ovih istraživanja pokazuju da status p53 gena može imati značaj u predviđanju odgovora na endokrinu terapiju kod bolesnica sa karcinomom dojke, što treba dalje potvrditi u velikim prospektivnim studijama.

p53 i radioterapija

U prvim radovima pokazano je da su ćelije sa mutiranim p53 manje osjetljive na radioterapiju (Lowe et al., 1994). Također, demonstrirano je da su heterozigotne ćelijske linije (mutirani p53/wt53) manje osjetljive na zračenje od ćelija sa wt p53 (Delia et al., 1996). Međutim, rezultati kliničkih studija ukazivali su na drugačije rezultate.

Studija u grupi 168 N₀ bolesnica, gde je status p53 određen sekvenciranjem, pokazala je da su bolesnice sa mutiranim p53, imale značajno smanjen rizik za pojavu relapsa ako su primale postoperativnu radioterapiju, od bolesnica sa mutiranim p53 koje nisu primile radioterapiju (Jansson et al., 1995). Nasuprot njima, bolesnice sa wt p53 imale su lošiji odgovor na radioterapiju. Slične rezultate pokazala je studija grupe autora (Silvestrini et al., 1997). U grupi od 613 bolesnica sa karcinomom dojke gde je status p53 određivan na nivou proteina IHC metodom, bolesnice sa mutiranim p53 imale su bolji odgovor na adjuvantnu radioterapiju od bolesnica sa wt p53.

Objašnjenje ovih rezultata može biti da pojedine mutacije u p53 genu ne dovode do narušavanja procesa apoptoze, delom zbog produženog polu-života p53 proteina (Bergh, 1997). Ipak, zapažanje da adjuvantna radioterapija ima veći benefit za pacijentkinje sa mutiranim p53 tek treba potvrditi u velikim randomizovanim studijama.

p53 i hemioterapija

Na početku ovog poglavlja rečeno je da dosadašnji eksperimentalni podaci ukazuju da p53 status može biti prediktivni faktor za odgovor na hemioterapiju antraciklinima i taksanima. Jedan od najčešće korišćenih antraciklinskih antimetabolita u kliničkoj praksi je fluoropirimidin, 5-fluoruracil (5-FU), koji je kao vid terapije razvijen još pre 40 godina (Rutman et al., 1954). Mehanizam citotoksičnosti 5-FU zasniva se inkorporaciji fluronukleotida u RNK i DNK i inhibiciji enzima timidilat sintaze (TS), koja učestvuje u sintezi nukleotida (Longley et al., 2003).

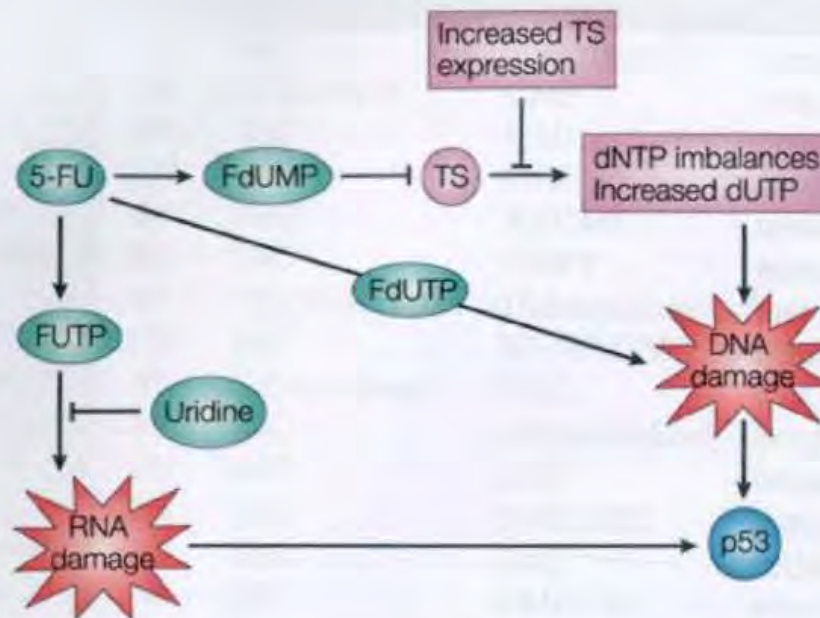
5-FU je široko korišćen citostatik posebno u kombinaciji sa drugim hemioterapijskim agensima, i to najviše u lečenju kolorektalnog kancera i kancera dojke. Poznavanje mehanizma kojim 5-FU dovodi do smrti tumorskih ćelija, i mehanizma kojim tumori postaju rezistentni na 5-FU, omogućiće predviđanje terapijskog odgovora.

In vitro studije pokazale su da gubitak funkcije p53 smanjuje osjetljivost ćelija na 5-FU (Bunz et al., 1999; Longley et al., 2002). Inaktivacija oba alela p53 ili bax u ćelijama kancera kolona, čini ćelije striktno rezistentnim na 5-FU indukovanu apoptozu (Bunz et al., 1999; Zhang et al., 2000).

5-FU aktivira p53 kroz dva glavna mehanizma: (1) inkorporacijom svog metabolita, fluorouridin trifosfata (FUTP) u RNK, inkorporacijom fluorodeoksiuridin trifosfata (FdUTP) u DNK i (2) inhibicijom timidilat sintaze (TS) fluorodeoksiuridin monofosfatom (FdUMP), što rezultira oštećenjem DNK (Slika 7). TS-posredovana citotoksičnost može biti narušena povećanjem ekspresije TS, dok RNK-posredovana citotoksičnost može biti poništena povećanjem unutarćelijskih nivoa uridina (Longley et al., 2003).

U kliničkoj praksi 5-FU se koristi u kombinaciji sa drugim citostaticima i to najčešće sa metotreksatom i ciklofosfamidom (CMF), ciklofosfamidom i adriamicinom (FAC),

epirubicinom i ciklofosfamidom (CEF). Od taksana, najzastupljeniji u kliničkoj upotrebi je paclitaksel.



Nature Reviews | Cancer

Slika 7. Aktivacija p53 5-fluorouracilom (Longley et al., 2003).

U Tabeli 20. prikazan je pregled studija koje su ispitivale prediktivni značaj p53 gena za odgovor na određeni vid hemioterapije kod bolesnica sa karcinomom dojke. Iz datog prikaza jasno je da su dobijeni rezultati prilično raznoliki.

Interesantno je pomenuti tri studije iste grupe autora (Aas et al., 1996; Geisler et al., 2001; Geisler et al., 2003), koje su sva tri puta potvrdile iste rezultate tj. da su bolesnice sa mutiranim p53 bile rezistentne na hemioterapijske agense. U prvom radu iz 1996. godine, u grupi 63 bolesnice sa lokalno odmaklim karcinomom dojke, koje su sve tretirane doksorubicinom, bolesnice sa mutacijama u DNK-vezujućem regionu p53 imale su raniji relaps u odnosu na bolesnice sa wt p53. Ovi rezultati potvrđjeni su u radu iz 2001. godine u proširenoj grupi od 91 pacijenta koje su isto primale doksorubicin. U studiji iz 2003. godine, grupa autora je otišla korak dalje. Analizirana je grupa 35 bolesnica sa lokalno odmaklim karcinomom dojke koja je primila kombinaciju antraciklinskog/neantraciklinskog tretmana, 5-FU/mitomicin. Pokazano je da bolesnice sa mutacijama u DNK-vezujućem domenu p53 gena ne odgovaraju na terapiju sa 5-FU/mitomicinom. Iako ne postoje *in vitro* podaci da mitomicin svoje citotoksično dejstvo ostvaruje putem intaktnog p53, moguće je da u *in vivo* uslovima p53 ima ulogu u funkciji mitomicina.

Često citiran rad grupe austrijskih autora (Kandioler-Eckersberger et al., 2000), analizirao je povezanost p53 mutacija sa odgovorom na FEC (35 bolesnica) i odgovorom na paclitaksel (32 bolesnice). Pokazano je da su bolesnice sa mutiranim p53 bile rezistentne na tretman sa FEC ali ne i na tretman paclitakselom.

Tabela 20. Povezanost p53 statusa sa odgovorom na hemioterapiju-pregled literature

Studija	N	Metodologija	Vrsta terapije	Prediktivni značaj p53
Jacquemier, 1994 _b .	81	IHC	Vinkristin/CF	nema značaja
Faille et al., 1994.	38	PCR-SSCP	CMF	mut.p53-rezistentni
Muss et al., 1994	394	IHC	FAC	nema značaja
Stal et al., 1995.	139	IHC	CMF	mut.p53-senzitivni
Mathieu et al.1995.	86	IHC	AVCMF	nema značaja
Elledge et al., 1995.	261	IHC	CMFP	nema značaja
Aas et al., 1996.	63	CDGE/sekvenc.	Doksorubicin	mut.p53-rezistentni
MacGrogan, 1996.	128	IHC	EVM/MTV	nema značaja
Chevillard, 1997.	53	Sekvenciranje	FAC	mut.p53-senzitivni
Linn et al., 1997.	51	IHC	AC/paclitaksel	nema značaja
Dublin et al., 1997.	277	IHC	CMF	nema značaja
Formenti, 1997.	35	IHC	5-FU/XRT	mut.p53-rezistentni
Niskanen et al.1997	103	IHC	FEC	nema značaja
Bonetti et al, 1998.	43	IHC	CMF/FAC	nema značaja
Rozan et al., 1998.	329	IHC	FAC	nema značaja
DeGeorges, 1998.	277	IHC	CMF	nema značaja
Clahsen et al., 1998.	440	IHC	FAC	mut.p53-rezistentni
Jarvinen et al.1998.	55	IHC	Epirubicin	nema značaja
Thor et al., 1998.	994	IHC	FAC	mut.p53-senzitivni
Colleoni et al., 1999.	73	IHC	FUFAvino	mut.p53-senzitivni
Daidone et al., 1999.	136	IHC	CMF/FAC	mut.p53-rezistentni
Bottini et al., 2000.	143	IHC	CMF	nema značaja
Sjostrom et al, 2000	72	IHC	Docetaksel	nema značaja
	62	IHC	MF	nema značaja
Blaszyk et al., 2000.	90	ddF, eks.4-10	CMF	mut.p53-rezistentni
	35	Sekvenciranje	FEC	mut.p53-rezistentni
Kandioler- Eckesberger, 2000.	35	IHC	FEC	mut.p53-rezistentni
	35	Sekvenc./IHC	FEC	mut.p53-rezistentni
	32	Sekvenciranje	Paclitaksel	mut.p53-senzitivni
	32	IHC	Paclitaksel	nema značaja
	32	Sekvenc./IHC	Paclitaksel	mut.p53-senzitivni
Geisler et al., 2001.	91	CDGE,eks.2-11	Doksorubicin	mut.p53-rezistentni
Rahko et al., 2003.	240	IHC	CMF/CEF	mut.p53-rezistentni
Anelli et al., 2003.	73	Sekvenc./IHC	Paclitaksel/ doksorubicin	mut.p53-rezistentni
Geisler et al., 2003.	35	Sekv.eks.2-11	5-FU/ mitomicin	mut.p53-rezistentni

Svi ovi radovi ukazuju na značajnu kliničku implikaciju p53 mutacija, i pokazuju da analiza p53 statusa primarnih tumora može pomoći u predviđanju odgovora na agense koji oštećuju DNK kao što su doksorubicin, CMF ili FEC.

Mogući značaj p53 u predviđanju odgovora na hemioterapiju antraciklinima (CMF), potvrđen je i u ovom radu. Iako nije dobijeno da se dužina perioda bez ponovnog javljanja bolesti (DFI) značajno razlikuje kod bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) mutacija (Rezultati, Figura 16), pokazano je da p53 mutacije mogu biti faktor predviđanja ranog relapsa. Kada se razmatra ponovno javljanje bolesti u okviru praćenja od 24 meseca, uočava se da se u grupi bolesnica sa p53 mutacijama, 8 od ukupno 10 relapsa bolesti, dešava baš u okviru prvih 24 meseci. Upoređivanjem vremenskog intervala bez ponovnog javljanja bolesti u grupi bolesnica sa i bez p53 mutacija u okviru prvih 24 meseca praćenja, dobijena je statistički značajna razlika; p53+ bolesnice su imale značajno kraći period bez ponovnog javljanja bolesti (Rezultati, Figura 17).

U odnosu na pojavu ponovnog javljanja bolesti u intervalu u prvih 36 meseci, kao i u intervalu posle 36 meseci praćenja (kasni relaps), nije pokazana značajna razlika između bolesnica sa (p53+) i bez (p53-) mutacija (Rezultati, Figure 18 i 19).

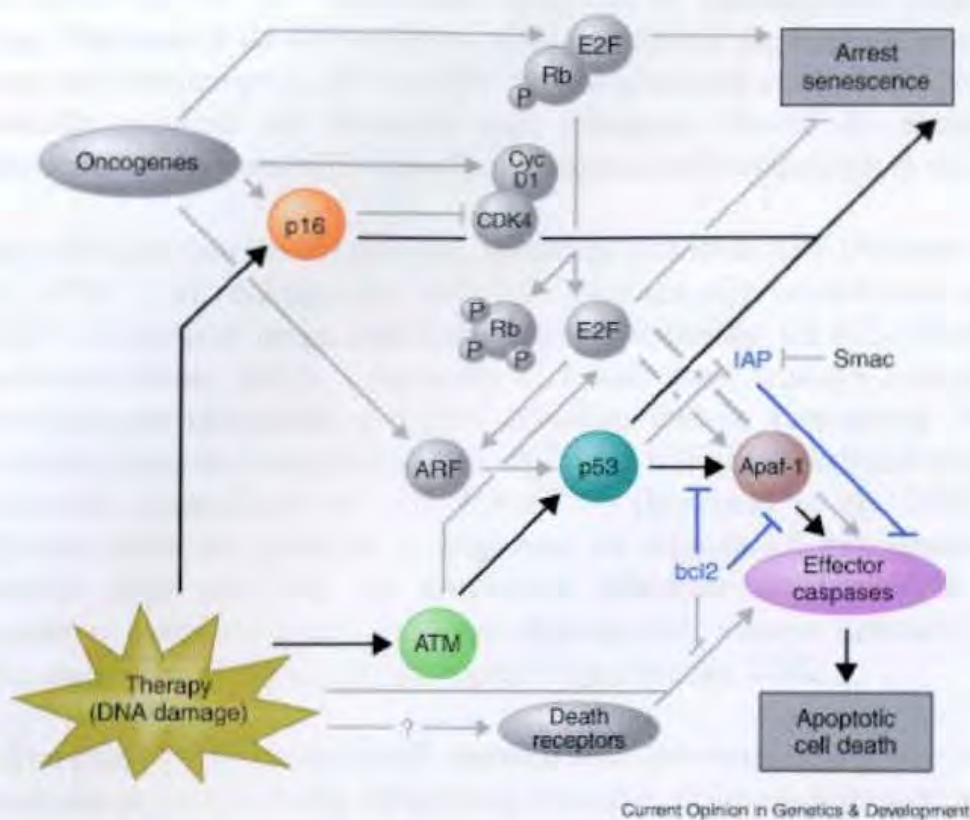
U okviru grupe bolesnica koje su razvile relaps, upoređivan je vremenski interval do progresije bolesti (PFI) između grupa bolesnica sa i bez p53 mutacija, pri čemu je pokazano da je taj interval kod p53+ bolesnica bio značajno kraći (Rezultati, Figura 20). S obzirom da prisustvo p53 mutacija u našoj ispitivanoj grupi određuje podgrupu bolesnica sa agresivnijom formom bolesti (rani relaps i kraći period do progresije bolesti), možemo potvrditi da analiza p53 statusa u karcinomu dojke može biti primenljiva u kliničkoj praksi kao faktor predviđanja odgovora na hemioterapiju (CMF).

Sve ovde navedene studije, uključujući i našu ukazuju na neophodnost translacionih istraživanja, tj. povezivanju znanja o samoj biologiji maligne ćelije sa potencijalnom primenom stečenih znanja u lečenju pacijenata. Prvi odgovor na pitanje da li će pacijent odgovoriti na hemioterapiju ili ispoljiti rezistentnost, treba tražiti u poznavanju funkcionisanja ćelijskih regulatornih mehanizama.

Odgovor na hemioterapiju ili rezistentnost ?

Ćelijska homeostaza je neophodan uslov za pravilno funkcionisanje organizma. Iako ćelijski ciklus mora da odgovori na veliki broj fizioloških signala koji ubrzavaju rast, kao što je slučaj u toku embrionalnog razvića ili zaceljivanja rana, ne dozvoljava se mitogenim signalima u višku da dovedu do nekontrolisane ćelijske proliferacije. Prema tome, ćelijski zaštitni mehanizmi koji zaustavljaju progresiju kroz ćelijski ciklus, mogu biti aktivirani delovanjem onkogena. Mutacije koje narušavaju funkcionisanje ovih zaštitnih mehanizama, mogu dovesti do stvaranja tumora. Kao što je već rečeno u uvodu, mnogi od gena koji su uključeni u supresiju tumorskog rasta, takodje utiču na osetljivost na antikancersku terapiju, povezujući na taj način genetiku kancera sa hemioterapijom (Johnstone et al., 2002).

Već decenijama se smatra da antikancerski agensi svoje dejstvo ostvaruju tako što teško i nepovratno oštećuju ćeliju. Kroz interakciju sa svojim unutarćelijskim ciljevima, većina antikancerskih agenasa direktno ili indirektno oštećuje DNK. Ovo oštećenje ne znači samo po sebi smrt ćelije, ali sprečava ćelije da prođu kroz kontrolne tačke ćelijskog ciklusa. Kada kontrolna tačka za oštećenje DNK registruje prekid u dvolančanoj DNK, ili neki drugi vid anomalije (kroz mutirani ATM), aktiviraju se efektorne kinaze kao što su Chk1 ili Chk2, koje zatim reaguju sa p53 i drugim «čuvarima» ćelijskog integriteta (Melo et al., 2002) (Slika 8).



Slika 8. Antikancerskim agensima indukovano oštećenje DNK – različiti načini završetka ćelijskog ciklusa (Lee and Schmitt, 2003).

U zavisnosti od inteziteta oštećenja DNK, nishodne p53-zavisne kontrolne tačke mogu usporiti progresiju kroz S-fazu, zadržati privremeno ćelije u G₁, G₂ ili M-fazi ili pokrenuti program koji će definitivno oštećenu ćeliju isključiti iz dalje progresije kroz ćelijski ciklus. Pokazano je da paralelni signalni putevi ili signali koji u nekim tačkama interferiraju sa p53-zavisnom apoptozom, mogu uticati na ćelijski odgovor na oštećenje DNK. «Receptor smrti» signale šalje kroz Fas/Fas ligand-sistem, ili tako što pokreće TNF-zavisnu apoptozu indukcijom TRAIL liganda koji preko aktivacijom kaspaze-8 povećava intezitetet apoptoze indukovane lekovima (Lee and Schmitt, 2003).

Lekovima izazvano oštećenje DNK može indukovati p16^{INK4a}, inhibitora CDK4 kinaze, koji dalje blokira hiperfosforilaciju retinoblastoma proteina (Rb), a samim tim E2F-zavisnu ekspresiju gena neophodnih za ulazak ćelije u S-fazu (Robles et al., 1998). Pretpostavlja se da aktivacija p16^{INK4a}, kao i aktivacija p53, u paralelnom putu kontrolišu akutni, stresom indukovani finalni zastoj ćelijskog ciklusa koji se po morfološkim i biohemijskim osobinama razlikuje od zaustavljanja same replikacije (te Poêle et al., 2002; Schmitt et al., 2002). Zaključak je da oštećenje DNK može aktivirati različite izvršne programe koji primoravaju ciljne ćelije da izadju iz ćelijskog ciklusa, bilo apoptozom ili kroz prerano zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Slika 8).

Aktivacija onkogeno kao što su c-myc ili ras predstavlja prototip događaja koji iniciraju malignu transformaciju. Onkogenima izazvana hiperproliferacija aktivira ćelijske zaštitne

mehanizme kao što su spomenuta apoptoza ili permanentno zaustavljanje ćelijskog ciklusa. Pokazano je da aktivacija ras onkogene dovodi do finalnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa aktiviranjem p53 i INK4a/ARF lokusa (Ferbeyre et al., 2002). Nalazi nekih studija su takodje pokazali da aktivacija myc onkogene dovodi do apoptoze, što rezultira sprečavanjem rasta tumora ili regresijom neoplastičnih lezija (Jain et al., 2002).

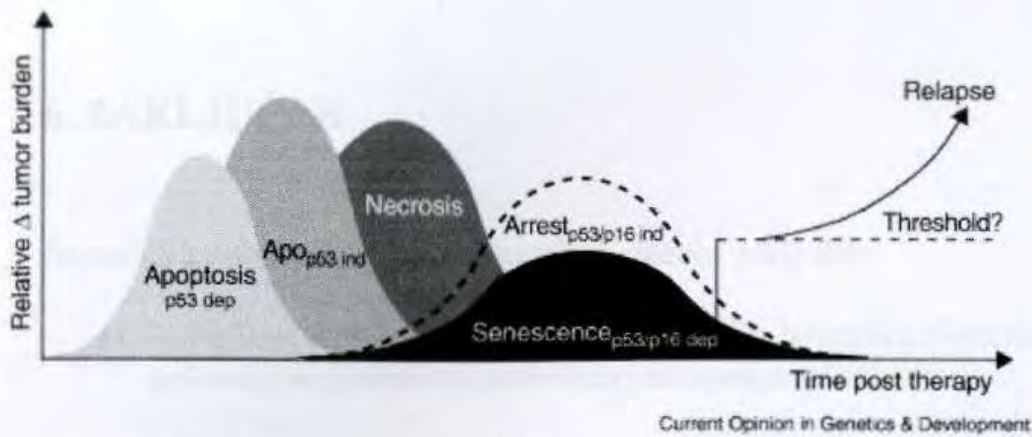
Mnogi onkogeni kao što su ras i myc, aktiviraju p53 kroz ARF (Palmero et al., 1998; Zindy et al., 1998). Ipak, onkogenima aktivirana apoptoza nije posredovana samo preko sprege ARF-p53. Onkogeni mogu aktivirati kaspaze nezavisno od p53 (Fernhead et al., 1997; Mendelsohn et al., 2002), i iskoristiti E2F kao most između onkogenima indukovane ekspresije gena uključenih u S-fazu ćelijskog ciklusa i apoptoze. Pretpostavlja se da kompleksi represora transkripcije koji uključuju E2F imaju kritičnu ulogu u zaustavljanju proliferacije kontrolisanu sa p53 i p16^{INK4a} (Rowland et al., 2002). Ova višestruka osetljivost ćelija na apoptozu u odgovoru na stimulaciju onkogenima, sugerise da su tumorske ćelije osetljivije na apoptotske stimuluse od normalnih ćelija. Aktivirani onkogeni u transformisanim ćelijama stvaraju tzv. «stanje uzbune» koje te ćelije čini visoko osetljivim na antikancerske agense koje oštećuju DNK

Detaljno poznavanje molekularnih mehanizama delovanja nekog leka ne znači automatski da možemo predvideti ishod terapijskog tretmana. Osim osobina samog jedinjenja kao što su njegova farmakokinetika, distribucija u tkivima, interakcije sa drugim ćelijskim komponentama, efikasnost leka u najvećoj meri zavisi od njegove sposobnosti da izazove oštećenje DNK i deluje dalje kroz izvršne ćelijske mehanizme. Iz tog ugla, apoptoza i permanentno zaustavljanje ćelijskog ciklusa predstavljaju najradikalnije forme programiranog ćelijskog odgovora, zato što sprečavaju ciljane ćelije da učestvuju u rastu tumora.

Rezultati studija ispitivanja odgovora na antikancerske tretmane u transgenim miševima, pokazali su da i lekovima indukovana apoptoza i zaustavljanje ćelijskog ciklusa doprinose ishodu antikancerske terapije (Schmitt et al., 2002).

Lekovima indukovano zaustavljanje ćelijskog ciklusa deluje kao dodatni program koji eliminiše ćelije iz ćelijskog ciklusa, funkcionišući kao alternativni mehanizam za ćelije koje nisu podlegle indukovanoj ćelijskoj smrti, što doprinosi krajnjem ishodu antikancerske terapije (Schmitt et al., 2002). Po ovoj hipotezi, lekovima indukovana represija rasta tumora primarno zavisi od redukcije tumorskih ćelija apoptozom, što je posle izvesnog perioda latencije praćeno p53/p16^{INK4a} – posredovanim zaustavljanjem ćelijskog ciklusa (Slika 9). Treba naglasiti da individualno učešće ova dva programa varira u zavisnosti od različitih terapijskih modaliteta u različitim tipovima ćelija. I apoptoza i zaustavljanje ćelijskog ciklusa doprinose povoljnom ishodu antikancerskog tretmana smanjivanjem «aktivne» tumorske mase (tj. broja ćelija koje mogu ponovo da udju u ćelijski ciklus), ispod pretpostavljene granične vrednosti.

Usaglašeno dejstvo oba ćelijska programa je neophodno da bi se postigla redukcija rasta tumora i smanjila verovatnoća pojave relapsa bolesti (Slika 9).



Slika 9. Hipotetički model različitih ćelijskih programa koji učestvuju u lekovima-indukovanoj redukciji rasta tumora (Lee and Schmitt, 2003).

Rezistentnost na antikancerske tretmane predstavlja veliki problem i u kliničkoj i u molekularnoj onkologiji. Istraživanja su potvrdila da osim apoptoze, i program permanentnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa utiče na ishod određene terapije. Mutacije učesnika ovih izvršnih ćelijskih programa verovatno predstavljaju glavni razlog stvaranju rezistentnosti. Ciljane terapije, dizajnirane tako da obnove funkciju izmenjenih ćelijskih programa kao što su apoptoza ili zaustavljanje ćelijskog ciklusa, mogle bi da povećaju efikasnost konvencionalnih antikancerskih terapija.

Razviće novih tehnologija kao što su cDNK-mikroareji, omogućava istovremeno i brzo ispitivanje velikog broja gena uključenih u određene ćelijske signalne puteve. Na ovaj način moguće je odrediti genski profil svakog tumora posebno, što znatno olakšava definisanje najoptimalnije terapije.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata iznosimo sledeće zaključke:

1. Učestalost p53 mutacija u našoj populaciji bolesnica obolelih od karcinoma dojke pokazuje saglasnost sa podacima prikazanim u literaturi.
2. Statistički značajna razlika u zastupljenosti p53 mutacija pokazana je u okviru limfonodalnog statusa i histološkog tipa tumora. Učestalost mutacija p53 gena bila je veća u N₊ u odnosu na N₀ grupu bolesnica. S obzirom da N₊ karcinomi predstavljaju odmakliji stadijum bolesti, zaključujemo da pojava p53 mutacija predstavlja kasniji događaj u kancerogenezi. Značajno veća zastupljenost p53 mutacija detektovana je kod bolesnica sa invazivnim duktalnim (IDC), u odnosu na bolesnice sa inavazivnim lobularnim karcinomom dojke (ILC). Naši rezultati potvrđuju da su IDC i ILC dva odvojena entiteta i da veća učestalost p53 mutacija u IDC doprinosi agresivnijem fenotipu IDC tumora.
3. Prediktivni značaj p53 mutacija, procenjivan je upoređivanjem dužine intervala do ponovnog javljanja bolesti (DFI), kod bolesnica sa i bez p53 mutacija, posle adjuvantne hemioterapije. Iako u odnosu na ukupni DFI p53 mutacije nisu imale prediktivni značaj, pokazano je da p53 status može biti faktor predviđanja ranog relapsa kod bolesnica sa karcinomom dojke. Prediktivni značaj p53 mutacija potvrđen je u grupi bolesnica koje su sve imale relaps bolesti: pokazano je da su bolesnice sa p53 mutacijama imale značajno kraći vremenski interval do progresije bolesti (PFI) u odnosu na bolesnice bez mutacija.
4. Tokom praćenja bolesnica zabeleženo je šest smrtnih isoda. Svih šest događaja desilo se u grupi bolesnica sa p53 mutacijama i/ili amplifikacijom c-myc (p53+/c-myc+). Ova grupa bolesnica sa genskim alteracijama imala je značajno kraće ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na grupu bolesnica bez genskih alteracija. Iako sama c-myc amplifikacija nije pokazala korelaciju sa tokom bolesti, udružena pojava p53/c-myc alteracija je u ovoj grupi bolesnica iskazala prognostički značaj. Ovaj rezultat ukazuje na potrebu istovremene detekcije alteracija više gena, naročito onih koji učestvuju u istim signalnim putevima ćelija, što će omogućiti bolje subgrupisanje bolesnica a samim tim i preciznije određivanje terapijskog tretmana.

Opšti zaključak je da status p53 može biti primenljiv u kliničkoj praksi i kao prognostički i kao prediktivni faktor. Istovremeno određivanje više genskih alteracija, što je danas moguće zahvaljujući novim metodologijama (DNK-mikroareji), omogućiće definisanje genskog profila svakog tumora ponaosob, što za krajnji cilj ima optimalno zbrinjavanje svakog pacijenta.

7. LITERATURA

- Aas T, Borresen AL, Geisler S et al. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Med* 2, 811-814 (1996).
- Abou-Ellela A, Gramlich T, Fritsch c and Ganster T. c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mod Pathol* 9(2), 95-98 (1996).
- Agnantis NJ, Mahera H, Maounis N and Spandidos DA. Immunohistochemical study of ras and myc oncoproteins in apocrine breast lesions with and without papillomatosis. *European Journal of Gynaecological Oncology* 13, 309-315 (1992).
- Alsner J, Yilmaz M, Guldborg P. Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 3923-3931 (2000).
- Amati B. Integrating Myc and TGF-beta signaling i cell cycle control. *Nature Cell Biol* 3, E112-E113 (2001).
- Amati B. Ocogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245 (1993).
- An WG, Kanekal M, Simon MC et al. Stabilization of wilde type p53 by hipoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 392, 405-408 (1998).
- Andersen TI and Borresen AL. Alterations of the TP53 gene as a potential prognostic marker in breast carcinomas. Advantages of using constant denaturant gel electrophoresis in mutant detection. *Diagn Mol Pathol* 4, 203-211 (1995).
- Andersen TI, Holm R, Nesland JM et al. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *Br J Cancer* 68, 540-548 (1993).
- Anelli A, Brentani RR, Gadelha AP, et al. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. *Annals of Oncology* 14, 428-432 (2003).
- Arango D, Corner GA, Wadler S et al. c-myc/p53 interactions determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 61, 4910-4915 (2001).
- Archer SG, Eliopoulos A, Spandidos D et al. Expression of ras, p21, p53 and c-erbB-2 in advanced breast cancer and respomse to first line hormonal therapy. *Br J Cancer* 72, 1259-1266 (1995).
- Arriola EL, Lopez AR and Chresta CM. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm-2 by etoposide inhibits the p53-Mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 18, 1081-1091 (1999).
- Augenlich I, Wadler S, Gorner G et al. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* 57, 1769-1775 (1997).
- Aulmann S, Bentz M and Sinn HP. C-myc oncogene amplification in ductal carcinoma *in situ* of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 74, 25-31 (2002).
- Baker SJ et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221 (1989).
- Balsley I, Axelsson CK, Zedeler K et al. The Nottingham Prognostic Index applied to 9149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *Breast Cancer Res treat* 32, 281-290 (1994).

Barbarechi M. Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9,000 patients. *Appl Immunohistochem* 4, 106-116 (1996).

Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C et al. p21^{WAF1} immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlation with clinicopathological data, estrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. *Br J Cancer* 74, 208-215 (1996).

Barr LF, Campbell SE, Diette GB et al. c-myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 60, 143-149 (2000).

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 196, 80-83 (1991).

Baudino TA and Cleveland JL. The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21, 691-702 (2001).

Bergh J, Norberg T, Sjogren S et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1, 1029-1034 (1995).

Bergh J. Time for integration of predictive factors for selection of breast cancer patients who need postoperative radiation? *J Nat Cancer Inst* 89, 605-607 (1997).

Berns EM, Foekens JA, Vossen R et al. Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer. *Cancer Res* 60, 2155-2162 (2000).

Berns EM, van Staveren IL, Look MP et al. Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor outcome in human primary breast cancer. *Br J Cancer* 77, 1130-1136 (1998).

Berns EMJJ, Foekens JA, Putten WLJV et al. Prognostic factors in human primary breast cancer: comparison of c-myc and HER2/neu amplification. *J Steroid Biochem mol Biol* 43, 13-19 (1992).

Berns EMJJ, Klijn JG, Smid M et al. TP53 and MYC gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients. *Genes Chrom Cancer* 16, 170-179 (1996).

Berns EMJJ, Klijn JGM, van Putten WLJ et al. p53 protein accumulation predicts poor response to tamoxifen therapy of patients with recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* 16, 121-127 (1998).

Bhatia U, Danishefsky K, Traganos F et al. Induction of apoptosis and cell cycle-specific change in expression of p53 in normal lymphocytes and MOLT-4 leukemic cells by nitrogen mustard. *Clin Cancer Res* 1, 873-880 (1995).

Bible KC, Bible RHJ, Kottke TJ et al. Flavopirodol binds to duplex DNA. *Cancer Res* 60, 2419-2428 (2000).

Bieche I, Laurendeau I, Tozlu S et al. Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time transcription-PCR assay. *Cancer Res* 58, 2759-2765 (1999).

Blackwood EM and Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 12121-12127 (1991).

Blagosklonny MV, Fojo T. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality. *Int J Cancer* 83, 151-156 (1999).

Blagosklonny MV, Giannakakou P, Romanova L et al. Inhibition of HIF-1 and wt p53-stimulated transcription by codon Arg 175 p53 mutants with selective loss of functions. *Carcinogenesis* 22, 861-867 (2001).

Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P et al. Taxol induction of p21Waf1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Res* 55, 4623-4626 (1995).

Blagosklonny MV. p53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int J Cancer* 98, 161-166 (2002).

Blancato J, Singh B, Liu A et al. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, *in situ* hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer*, 1-8 (2004).

Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM et al. A prospective trial of midwest breast cancer: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer* 89, 32-38 (2000).

Blattner C, Tobiasch E, Liften M et al. DNA damage induced p53 stabilization: no induction for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene* 18, 1723-1732 (1999).

Bloom HJG and Richardson WW. Histological grading in breast cancer. *Br J Cancer* 11, 359-377 (1975).

Blyth K. Synergy between a human c-myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene* 10, 1717-1723 (1995).

Bonetti A, Zaninelli M, Leone R et al. bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 4, 2331-2336 (1998).

Bonnefoi H, Ducraux A, Movarekhi S et al. p53 as a potential predictive factor of response to chemotherapy: feasibility of p53 assessment using a functional test in yeast from trucut biopsies in breast cancer patients. *Br J Cancer* 86, 750-755 (2002).

Borg A, Baldetorp F, Ferno M et al. ERBB2 amplification in breast cancer with high rate of proliferation. *Oncogene* 6, 137-141 (1991).

Borresen AL, Anderesen TI, Eyford JE et al. TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 14, 71-75 (1995).

Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 21, 292-300 (2003).

Borst MJ and Ingold JA. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery* 114, 637-641 (1993).

Bosari S, Lee A, Viale G et al. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 421, 291-295 (1992).

Bottini A, Berruti A, Bersiga A et al. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 2751-2758 (2000).

Brachmann RK. Genetic selection of intragenic suppressor mutations that reverse the effect of common p53 cancer mutations. *EMBO J* 17, 1847-1849 (1998).

Brown JM. Cell status dead or alive? *Nat Med* 2, 1055-1056 (1996).

Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D et al. The combination of p53 mutation and neu-erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 22, 86-96 (2004).

Bullock AN and Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer* 1, 68-76 (2001).

Bullock AN, Henckel J and Fersht AR. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* 19, 1245-1256 (2000).

Bunz F, Hwang PM, Torrance C et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 104, 263-269 (1999).

Bunz F, Hwang PM, Torrance T et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 104, 263-269 (1999).

Caleffi M, Teague MW, Jense RA et al. p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer* 73, 2147-2156 (1994).

Cardiff RD, Sinn E, Muller W and Leder P. Transgenic oncogene mice. Tumor phenotype predicts genotype. *Am J Pathol* 139, 495-501 (1991).

Caspari T. How to activate p53. *Curr Biol* 10, R315-R317 (2000).

Chappuis PO, Estreicher A, Dietrich B et al. Prognostic significance of p53 mutation in breast cancer: frequent detection of non-missense mutations by yeast functional assay. *Int J Cancer* 84, 587-593 (1999).

Chene P. *In vitro* analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J Mol Biol* 281, 205-209 (1998).

Chevillard S, Lebeau J, Pouillart P et al. Biological and clinical significance of concurrent p53 gene alterations, MDR1 gene expression, and S-phase fraction analyses in breast cancer patients treated with primary chemotherapy or radiotherapy. *Clin Cancer Res* 3, 2471-2478 (1997).

Cho Y. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355 (1994).

Chou Q, Russell M, Birch DE et al. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acid Res* 20(7), 1717-1723 (1992).

Clahsen PC, van de Velde CJH, Duval C et al. p53 accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol* 16, 470-479 (1998).

Clark GM and McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 15, 20-25 (1988).

Colleoni M, Orvieto E, Nole F et al. Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer* 35, 574-579 (1999).

Conway K, Edminston SN, Cui L et al. Prevalence and spectrum of p53 mutations associated with smoking in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1987-1995 (2002).

Coradini D, Pellizzaro C, Veneroni S et al. Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Br J Cancer* 87, 1105-1111 (2002).

Corbet SW, Clarke AL, Gledhill S and Wyllie AH. P53-dependent and -independent links between DNA-damage, apoptosis and mutation frequency in ES cells. *Oncogene* 18, 1537-1544 (1999).

Cunningham J, Ingle J, Jung S et al. p53 gene expression in node-positive breast cancer: relationship to DNA ploidy and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 86, 1871-1873 (1994).

Daidone MG, Veneroni S, Benini E et al. Biological markers as indicators of response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 84, 580-586 (1999).

- Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Oren M et al. Deregulated beta-katenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J* 20, 4912-4922 (2001).
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927 (1999).
- de Rozières S. The loss of Mdm-2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 1691-1697 (2000).
- de Witte HH, Foekens JA, Lennerstrand J et al. Prognostic significance of TP53 accumulation in human primary breast cancer: comparison between a rapid quantitative immunoassay and SSCP analysis. *Int J Cancer* 69, 125-130 (1996).
- DeGeorges A, Roquancourt A, Extra JM et al. Is p53 a protein that predicts the response to chemotherapy in node negative breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 47, 47-55 (1998).
- Delia D, Mizutani S, Lamorte G et al. p53 activity and chemotherapy. *Nat Med* 2, 724-725 (1996).
- Deming S, Nass S, Dickson R and Trock BJ. c-myc amplification in breast cancer: a meta analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 83, 1688-1695 (2000).
- Domagal W, Striker G, Szadowska A et al. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma-relationship with survival and sites of metastases. *Eur J Cancer* 30A, 1527-1534 (1994).
- Dublin EA, Miles DW, Rubens RD et al. p53 immunohistochemical staining and survival after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Int J Cancer* 74, 605-608 (1997).
- Elledge R, Green S, Howes L et al. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 15, 1916-1922 (1997).
- Elledge RM and Allred C. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 52, 79-98 (1998).
- Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM et al. McGuire memorial symposium. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 27, 95-102 (1993).
- Elledge RM, Gray R, Mansour E et al. Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, metotrexate, fluorouracil and prednisone for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87, 1254-1256 (1995).
- Ellend M and Eilers M. Cell growth: downstream of Myc-to grow or to cycle? *Curr Biol* 9, R936-R939 (1999).
- Ellis PA, Smith IE, McCarthy K et al. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet* 349, 849 (1997).
- Elston CW, Ellis IO et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 19, 403-410 (1991).
- EORTC Breast Cancer Cooperative Group. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer* 16, 1513-1515 (1980)
- Esteller M, Tortola S, Toyota M et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60, 129-133 (2000).

- Evan GI and Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348 (2001).
- Evan GI. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128 (1992).
- Faille A, Cremoux P, Extra JM et al. p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 69, 1145-1150 (1994).
- Falette N, Paperin MP, Treilleux I et al. Prognostic value of p53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 58, 1451-1455 (1998).
- Fan S, Cherney B, Reinhold W et al. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment. *Clin Cancer Res* 4, 1047-1054 (1998).
- Fearnhead HO, McCurrach ME, O'Neill J et al. Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells. *Genes Dev* 11, 1266-1276 (1997).
- Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3497-3508 (2002).
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC CancerBase No 5, Lyon, IARC Press (2001).
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biologic aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 1-30 (1999).
- Field S, Jang SJ. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049 (1990).
- Flaman JM, Frebourg T, Moreau V et al. a simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3963-3967 (1995).
- Formenti SC, Dunnington G, Uzieli B et al. Original p53 status predicts for pathological response in locally advanced patients treated perioperatively with continuous infusion 5-fluorouracil and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 39, 1059-1068 (1997).
- Freedman DA et al. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55, 96-107 (1999).
- Fresno M, Molina R, Perez del Rio MJ et al. p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer* 33, 1268-1274 (1997).
- Friedler A et al. A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 937-942 (2002).
- Gasco M, Yulug IG and Crook T. TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Hum Mutat* 21, 301-306 (2003).
- Geisler S, Borresen-Dale AL, Johnsen H et al. TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5582-5588 (2003).
- Geisler S, Lonning PE, Aas T et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 61, 2505-2512 (2001).
- Geisler S, Lonning PE, Aas T et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 61, 2505-2512 (2001).
- Ghaneh P. Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16 (INK4A) results in pancreatic cancer regression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 8, 199-208 (2001).
- Giannakakou P, Robey R, Fojo T et al. Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 cell cycle arrest instead of mitotic arrest:

molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* 20, 3806-3813 (2001).

Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y et al. P53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nature Cell Biol* 2, 709-717 (2000).

Gottlieb TM, Leal JFM, Seger R et al. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm-2: possible implications for regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303 (2001).

Greenblat MS, Chappius PO, Bond JP et al. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res* 61, 4092-4097 (2001).

Gretarsdottir MS, Chappius PO, Bond JP et al. TP53 mutation analyses on breast carcinomas: a study of paraffin-embedded archival material. *Br J Cancer* 74, 555-561 (1996).

Griffits SD, Clarke AR, Healy LE et al. Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 14, 523-531 (1997).

Gudas JM, Nguyen H, Li T et al. Drug-resistant breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. *Carcinogenesis* 17, 1417-1427 (1996).

Gyllensten UB and Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(20), 7652-7656 (1988).

Haerslev T, Jacobsen G. An immunohistochemical study of p53 with correlation to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis. *Hum Pathol* 26, 295-301 (1995).

Hahnel R. Estimation of estrogen receptors in the clinical laboratory. *Pathol Immunopathol Res* 5, 54-72 (1986).

Hanzel E, Gitsch G, Kohlberger P et al. Immunohistochemical detection of mutant p53-suppressor gene product in patients with breast cancer. Influence on metastasis-free survival. *Anticancer Res* 12, 2325-2330 (1992).

Harbour JW and Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409 (2000).

Harris JR, Lippman ME, Veronesi U et al. Breast Cancer (1). *New Engl J Med* 327, 319-328 (1992).

Herr I and Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98, 2603-2614 (2001).

Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11, 121-139 (1992).

Hill K and Sommer SS. P53 as a mutagen test in breast cancer. *Environ Mol Mutagen* 39, 216-227 (2002).

Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127 (2000).

Hupp TR, Lane DP & Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 352, 1-17 (2000).

Hupp TR and Lane DP. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 4, 865-875 (1994).

Iacopetta B, Grieco F, Powell B et al. Analysis of p53 gene mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism provides independent prognostic information in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 4, 1597-1602 (1998).

Jacobs JJ. Bmi-1 collaborates with c-myc in tumorigenesis by inhibiting c-myc induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13, 2678-2690 (1999).

- Jacquemier J, Moles J, Penault-Llorca F et al. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. *Br J Cancer* 69, 846-852 (1994).
- Jacquemier J, Penault-Llorca F, Viens P et al. Breast cancer response to adjuvant chemotherapy in correlation with erbB-2 and p53 expression. *Anticancer Res* 14, 2773-2778 (1994b).
- Jager R, Herzer U, Schenkel J and Weiher H. Overexpression of bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* 15, 1787-1795 (1997).
- Jain M, Arvantis C, Chu K et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297, 102-104 (2002).
- Jain S, Fischer C, Smith P et al. Patterns of metastatic breast cancer in relation to histological type. *Eur J Cancer* 29, 2155-2157 (1993).
- Jansson T, Inganas M, Sjogren S et al. p53 status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. *J Clin Oncol* 13, 2745-2751 (1995).
- Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T et al. Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 77, 2267-2273 (1998).
- Jenkins R, Qian J, Lieber M, Bostwick D et al. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 57, 524-531 (1997).
- Johnston LA, Prober DA, Edgar BA et al. *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* 98, 779-790 (1999).
- Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164 (2002).
- Johnstone RW, Ruefli AA and Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 25, 1-6 (2000).
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S et al. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 56, 816-825 (1996).
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T and Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 13, 1367-1381 (1998).
- Kamijo T, Weber JS, Zambetti G, Zindy F et al. Interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8292-8297 (1997).
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. *Cell* 91, 649-659 (1997).
- Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M et al. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 50-56 (2000).
- Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53, 457-481 (1958).
- Kim AL. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem* 274, 34924-34931 (1999).
- Komarov PG et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285, 1733-1737 (1999).

- Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H et al. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc Natl Acad Sci* 93,1093-1096 (1996).
- Kruger S, Fahrenkrog T, Muller H et al. Proliferative and apoptotic activity in lobular breast carcinoma. *Int J Mol Med* 4, 171-174 (1999).
- Kucera E, Speiser P, Gnant M et al. Prognostic significance of mutations in the p53 gene, particularly in the zinc-binding domains, in lymph node- and steroid receptor positive breast cancer patients. Austrian breast cancer study group. *Eur J Cancer* 35, 398-405 (1999).
- Lai H, Ma F, Trapido E, et al. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 83, 57-66 (2004).
- Lakhani SR, Chaggar R, Davies S et al. Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. *J Pathol* 189, 496-503 (1999).
- Lane DP and Benchimol S. p53: oncogene or antioncogene? *Genes Dev* 4, 1-8 (1990).
- Lane DP and Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263 (1979).
- Lane DP and Hupp TR. Drug discovery and p53. *Drug Discovery Today* 8, 347-355 (2003).
- Lane DP and Lain S. Therapeutic exploitation of the p53 pathway. *Trends in Molecular Medicine* 8 (Suppl.), S38-S43 (2002).
- Lani JS, Lowe SW, Licitra EJ et al. p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9679-9683 (1997).
- Lavarino C, Pilotti S, Oggioni M et al. p53 gene status and response to platinum/paclitaxel based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 18, 3936-3944 (2000).
- Lee AHS, Dublin EA, Bobrow LG et al. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol* 185, 394-401 (1998).
- Lee S and Schmitt C. Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Gen Development* 13, 90-96 (2003).
- Liao and Dickson R. c-myc in breast cancer. *Endocrine-Relat Cancer* 7, 143-164 (2000).
- Liao D, Pantazis C, Hou X and Li S. Promotion of estrogen-induced mammary gland carcinogenesis by androgen in the male Noble rat: probable mediation by steroid receptors. *Carcinogenesis* 19, 2173-2180 (1998).
- Linke SP, Clarkin KC, di Leonardo A et al. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotidedepletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 10, 934-947 (1996).
- Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J et al. Expression of drug resistance in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int J Cancer* 71, 787-795 (1997).
- Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S et al. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 55, 51-56 (1993).
- Liu WL et al. Biological significance of a small highly conserved region in the N terminus of the p53 tumor suppressor protein. *J Mol Biol* 313, 711-731 (2001).
- Longley DB et al. The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates. *Cancer Res* 62, 2644-2649 (2002).
- Longley DB, Harkin DP and Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338 (2003).

- Lowe SW and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495 (2000).
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266, 807-810 (1994).
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967 (1993).
- Lowe SW. Activation of p53 by oncogenes. *Endocrine-Related Cancer* 6, 45-48 (1999).
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275 (1951).
- Lu W et al. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene* 20, 3206-3216 (2001).
- MacGrogan G, Bonichon F, Mascarel I et al. p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 36, 71-81 (1995).
- MacGrogan G, Mauriac L, Durand M et al. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, pS2 and GST. *Br J Cancer* 74, 1458-1465 (1996).
- Mai S. Overexpression of c-myc precedes amplification of the gene encoding dihydrofolate reductase. *Gene* 148, 253-260 (1994).
- Maniatis TFE and Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Marchetti P, Cannita K, Ricevuto E et al. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Annals of Oncology* 14, 704-708 (2003).
- Marcu K, Bossone S, Patel A. Myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 61, 809-860 (1992).
- Masood S, Barnes R, Vilas B et al. p53 oncosuppressor protein carcinoma of the breast. *Lab Invest* 68, 17A (1993).
- Mateu MG and Fersht AR. Mutually compensatory mutations during evolution of the tetramerization domain of tumor suppressor p53 lead to impaired heterooligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3595-3599 (1999).
- Mathieu MC, Koscielny S, Le BM et al. p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 345, 1182 (1995).
- Mayo LD, Dixon JE, Durden DL et al. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 277, 5484-5489 (2002).
- McCormack SJ, Weaver Z, Deming S et al. Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* 16, 2755-2766 (1998).
- Mellhem M, Meisler A, Finley G et al. distribution of cells expressing Myc proteins in human colorectal epithelium, polyps, and malignant tumors. *Cancer Res* 52, 5853-5864 (1992).
- Melo J, Toczyski et al. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 237-245 (2002).
- Mendelsohn AR, Hamer JD, Wang ZB et al. Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6871-6876 (2002).
- Merritt JA et al. Clinical evaluation of adenoviral-mediated p53 gene transfer: review of INGN 201 studies. *Semin Oncol* 28 (Suppl.), 105-114 (2001).
- Milner J. Flexibility: the key to p53 function? *Trends Biochem Sci* 20, 49-51 (1995).
- Mori I, Yang Q and Kakudo K. Predictive and prognostic markers for invasive breast cancer. *Pathology International* 52, 186-194 (2002).

- Muss HB, Thor AD, Berry DA et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330, 1260-1266 (1994).
- Myrray IA, Gil JA, Hopwood DA and Shaw WV. Nucleotid sequence of the chloromphenicol acetyltransferaze gene of streptomyces acrimycini. *Gene* 85(2), 283-291 (1989).
- Nakopoulou L, Alexiadou A, Theodoropoulos G et al. Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 in breast cancer. *J Pathol* 179, 31-38 (1996).
- Nass and Dickson R. Defining a role for c-myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 44, 1-22 (1997).
- Nesbit C, Tersak J, Prochownik E. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016 (1999).
- Nikolova PV. Mechanism of rescue of common p53 cancer mutations by second-site suppressor mutations. *EMBO J* 19, 370-378 (2000).
- Nilolić-Vukosavljević D, Branković-Magić M, Polić Dj and Janković R. Standardization of steroid hormone receptor assay. *Jugoslav Med Biochem* 17, 391-394 (1998).
- Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K et al. Predictive value of c-erbB-2, p53, cath-D and histology of the primary tumor in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 76, 917-922 (1997).
- Norberg T, Lennerstrand J, Inganas M and Bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *Int J Cancer* 79, 376-383 (1998).
- O'Connor PM and 12 others. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57, 4285-4300 (1997).
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19, 607-614 (2002).
- Oren M, Damalas A, Gottlieb T et al. Regulation of p53: intricate loops and delicate balans. *Biochem Pharm* 64, 865-871 (2002).
- Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274, 36031-36034 (1999).
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H et al. detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2766-2770 (1989).
- Overgaard J, Yilmaz M, Guldberg P et al. TP53 mutations is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol* 39, 327-333 (2000).
- Palmero I, Pantoja C and Serrano M. p19ARF links the tumor suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126 (1998).
- Peiro G, Bornstein BA, Connoly JL et al. The influence of infiltrating lobular carcinoma on the outcome of patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat* 59, 49-54 (2000).
- Pelengaris S, Khan M and Evan G. c-myc: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* 2, 764-776 (2002).

- Pelengaris S, Littlewood T and Evan G. Reversible activation of c-myc in skin: induction of a complex phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577 (1999).
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, et al. Associations between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 56, 556-562 (1996).
- Petz B. Osnovne statističke metode za nematematičare. SNL, Zagreb (1985).
- Pezeshki AM, Farjadin S, Talei A et al. p53 gene alteration and protein expression in Iranian women with infiltrative ductal breast carcinoma. *Cancer Letters* 169, 69-75 (2001).
- Pharaoh PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta analysis. *Br J Cancer* 80, 1968-1973 (1999).
- Phelan A et al. Intercellular delivery of functional p53 by the herpes virus protein VP22. *Nat Biotechnol* 16, 440-443 (1998).
- Pietilainen T, Lipponen P, Aaltomaa S et al. Expression of c.myc proteins in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Anticancer Res* 15, 959-964 (1995).
- Platet N, Prevostel C, Deroco d et al. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int j Cancer* 75, 750-756 (1998).
- Polaczar S, Hey N, Stephenson T and Hill A. c-myc oncogene product p62^{c-myc} in ovarian mucinous neoplasms: immunohistochemical study correlated with malignancy. *J Clin Pathol* 42, 148-152 (1989).
- Pooart J, Limpaboon T and Lulitanond V. Improved nonisotopic PCR-SSCP for screening of p53 mutations. *Clin Biochem* 32, 233-235 (1999).
- Powell B, Soong R, Iacopetta B et al. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 6, 443-451 (2000).
- Powell BL, Bydderr S, Grieu F et al. Prognostic value of TP53 gene mutation in adjuvant treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 69, 65-68 (2001).
- Protokoli – Nacionalni protokol dijagnostike i lečenja malignih tumora dojke. republička stručna komisija za onkologiju i Institut za onkologiju i radiologiju Srbije. Beograd, 1993.
- Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA and Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000 (1995).
- Rahko E, Blanco M, Soini Y et al. A mutant TP53 status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 39, 447-453 (2003).
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 14, 34-44 (2000).
- Ries S, Biederer C, Woods D, et al. Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm-2 and induction of p19ARF. *Cell* 103, 321-330 (2000).
- Riou G, Le MG, Travagli JP et al. Poor prognosis of p53 gene mutation and nuclear overexpression of p53 protein in inflammatory breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85, 1765-1767 (1993).
- Riva-Lavielle C. Drug resistance, oncogenes, and anti-oncogenes in epithelial tumors. *Bull Cancer* 81, 105_s-111_s (1994).

- Robanus-Maandag EC, Bosch CAJ, Kristel PM et al. Association of c-myc amplification with progression from the in situ to the invasive stage in c-myc-amplified breast carcinomas. *J Pathol* 201, 75-82 (2003).
- Robles SJ, Adami GR, et al. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113-1123 (1998).
- Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B. PCR u kliničkoj dijagnostici. Biološki fakulter, PCR centar, Beograd (1999).
- Rosen PR, Lesser ML, Arroy CD et al. p53 in node-negative breast carcinoma: An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 13, 821-830 (1995).
- Rowland BD, Denisov SG, Douma S et al. E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell* 2, 55-65 (2002).
- Rozan S, Vincent SA, Zafrani B et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 79, 917-922 (1997).
- Rutman RJ, Cantarow A and Pachiks KE. Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C¹⁴ by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Res* 14, 119 (1954).
- Sabbatini P, McCormick F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53 mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J Biol Chem* 274, 24263-24269 (1999).
- Saccani JG, Fontanesi M, Bombardieri E et al. Preliminary study on oncogene product immunohistochemistry (c-erbB-2, c-myc) in breast pathology. *International Journal of Biological Markers* 7, 35-42 (1992).
- Sadot E, Geiger B, Oren M and Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-katenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 21, 6768-6781 (2001).
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732) 1350-1354 (1985).
- Saitoh S, Cunningham J, De Vries EM et al. p53 gene mutations in breast cancers in midwestern US women: null as well as missense-type mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 9, 2869-2875 ((1994).
- Scatchard G. Attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51, 660-672 (1949).
- Scheffner M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 prompts the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136 (1990).
- Schmitt C, Fridman JS, Zang M et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346 (2002).
- Schwartz DC and Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1), 67-75 (1984).
- Seshadri R, Leong AS, McCaul K et al. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Int J Cancer* 69, 135-141 (1996).
- Shan B and Lee WH. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol* 14, 8166-8173 (1994).
- Sherr CJ. The Ink4a/ARF network in tumor suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-737 (2001).

- Shiao YH, Chen VW, Scheer WD et al. Racial disparity in the association of p53 gene alterations with breast cancer survival. *Cancer Res* 55, 1485-1490 (1995).
- Shibutani S, Shaw PM Suzuki N et al. Sulfation of a α -hydroxitamoxifen catalyzed by human hydroxysteroid sulfotransferase results in tamoxifen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 19, 2007-2011 (1998).
- Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations in the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60, 6788-6793 (2000).
- Sikora K, Evan G, Stewart J and Watson JV. Detection of the c-myc oncogene product in testicular cancer. *B J Cancer* 52, 171-176 (1985).
- Silvestrini R, Benini E, Veneroni S et al. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 14, 1604-1610 (1996).
- Silvestrini R, Benini E, Veneroni S et al. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 14, 1604-1610 (1996).
- Silvestrini S, veneroni S, Benini E et al. Expression of p53, glutathione S-transferase, and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 89, 639-645 (1997).
- Simao TA, Ribeiro FS, Amorim LMF et al. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio De Janeiro, Brasil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer* 101, 69-73 (2002).
- Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264, 29-41 (2001).
- Sjogren S, Inganas M, Norberg T et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 88, 173-182 (1996).
- Sjogren S, Inganas M, Norberg T et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 88, 173-182 (1996).
- Sjostrom J, Blomqvist C, Heikkila P et al. Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 6, 3103-3110 (2000).
- Smart P, Lane EB, Lane DP et al. Effects on normal fibroblasts and neuroblastoma cells of the activation of the p53 response by the nuclear export inhibitor leptomycin B. *Oncogene* 18, 7378-7386 (1999).
- Smith D and Goh H-S. Overexpression of c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma is associated with a reduced mortality that is abrogated by point mutation of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 2, 1049-1053 (1996).
- Soong R, Iacopetta BJ, Harvey JM et al. Detection of p53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poor survival in breast cancer. *Int J Cancer* 74, 642-647 (1997).
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10869-10874 (2001).
- Soussi T and Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 1, 233-240 (2001).
- Soussi T, Caron de Fromentel C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952 (1990).

Spaventi R, Kamenjicki E, Pecina e. Immunohistochemical detection of TGF-alpha, EGF-R, c-erbB-2, c-myc, estrogen and progesterone in benign and malignant human breast lesions: a a concomitant expression. *In Vivo* 8, 183-189 (1994).

Stal O, Askmal SM, Wingren S et al. p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncolog* 34, 767-770 (1995).

Stambolic V, MacPherson D, Sas D et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8, 317-325 (2001).

Su F, Overholtzer M, Besser D, Levine AJ. WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 16, 46-57 (2002).

Takahashi M, Tonoki H, Tada M et al. Distinct prognostic values of p53 mutations and loss of estrogen receptor and their cumulative effect in primary breast cancers. *Int J Cancer* 89, 92-99 (2000).

Takahashi T et al. p53-a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246, 491-494 (1989).

Takikawa Y, Noguchi M, Kitagawa H et al. Immunohistochemical detection of p53 and cerbB-2 proteins: Prognostic significance in operable breast cancer. *Breast Cancer* 1, 17-23 (1994).

te Poelle RH, Okorokov AL, Jardine L et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 62, 1876-1883 (2002).

Tessitore A, Di Rocco ZC, Cannita K et al. High sensitivity of detection of p53 somatic mutation using fluorescence assisted mismatch analysis (FAMA). *Genes Chromosome Cancer* 35, 86-91 (2002).

Thomas M et al. The role of E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690-7700 (1999).

Thor AD, Berry DA, Budman DR et al. c-erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90, 1346-1360 (1998).

Thorlacius S, borresen AL, Eyford JE. Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic poulation: a prognostic factor. *Cancer Res* 53, 1637-1641 (1993).

Thorlacius S, Thorgilsson B, Bjornsson J et al. TP53 mutations and abnormal p53 protein staining in breast carcinomas related to prognosis. *Eur J Cancer* 31A, 1856-18861 (1995).

Torres K, Horwitz SB. Mechanism of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer res* 58, 3620-3626 (1998).

Trielli MO, Andreassen PR, Lacroix FB et al. Differential taxol-dependent arrest of transformed and non transformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific-related mortality of transformed cells. *J Cell Biol* 135, 689-700 (1996).

Tsuda H, Sakamaki C, Tsugane S et al. A prospective study of the significance of gene and chromosome alterations as prognostic indicators of breast cancer patients with lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 48, 21-32 (1998).

Tyner SD et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53 (2002).

Tzung SP et al. Antimycin A mimics cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nature Cell Biol* 3, 183-191 (2001).

Vafa O. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 9, 1031-1044 (2002).

- Valgardsdottir R, Tryggvadottir L, Steinarsdottir M et al. Genomic instability and poor prognosis associated with abnormal TP53 in breast carcinomas. *Molecular and immunohistochemical analysis* 105, 121-130 (1997).
- van Slooten HJ, van De Vijver MJ, Borresen AL et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 189, 504-513 (1999).
- Varley JM et al. Characterization of germline TP53 splicing mutations and their genetic and functional analysis. *Oncogene* 20, 2647-2654 (2001).
- Vennstrom B, Sheiness D, Zabieski J and Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 42, 773-778 (1982).
- Vogelstein B, Lane DP and Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310 (2000).
- Vousden KH and Lu X. Live or let die. The cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* 2, 594-604 (2002).
- Vousden KH and Vande-Woude. The ins and outs of p53. *Nature Cell Biol* 2, E178-E180 (2000).
- Wahl AV, Donaldson KI, Fairchild C et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 2, 72-79 (1996).
- Walker TL, White JD, Esdale WJ et al. Tumor cells surviving *in vivo* cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression. *Br J Cancer* 73, 610-614 (1996).
- Wallace-Brodeur RR and Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 55, 64-75 (1999).
- Wang et al. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel therapeutic approach to human breast cancer: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanisms. *Clin Cancer Res* 7, 3613-3624 (2001).
- Wang P, Reed M, Wang Y et al. p53 domains: Structure, oligomerization and transformation. *Mol Cell Biol* 14, 5182-5191 (1994).
- Welsh JA, Castren K and Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Clin Chem* 43, 2251-2255 (1997).
- Wieczorek AM. Structure-based rescue of common tumor-derived p53 mutants. *Nature Med* 2, 1143-1146 (1996).
- Woods CM, Zhu J, McQuency PA et al. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1, 506-526 (1995).
- Zeng X, Keller D, Wu L et al. UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing Mdm-2 transcription. *Cancer Res* 60, 6184-6188 (2000).
- Zhang L, Yu J, Park B et al. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 290, 989-992 (2000).
- Zhao R et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-993 (2000).
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433 (1998).



Прилог 1.

Изјава о ауторству

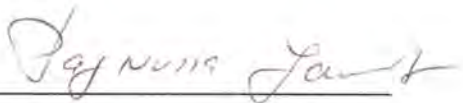
Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Detekcija mutacija u p53 genu kod bolesnica sa primarnim operabilnim karcinomom dojke

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, ____ 10.12.2013. _____



Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Detekcija mutacija u p53 genu kod bolesnica sa primarnim operabilnim karcinomom dojke

која је моје ауторско дело.

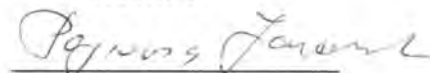
Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, ___10.12.2013._____