

## p53: een nieuwe prognostische marker voor oppervlakkige blaastumoren?

J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK

progressie van oppervlakkige blaastumoren bij patiënten die behoren tot de risicogroep wordt bepaald in een "multicentre study" waaraan drie ziekenhuizen deelnemen: Academisch Ziekenhuis Nijmegen, afdeling Urologie, o.l.v. Prof. Dr. J.A. Schalken; Eemland Ziekenhuis in Amersfoort o.l.v. Dr. W.W. van Solinge en Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis in Nijmegen o.l.v. Dr. J.D. Oosting en Dr. J.M.T. Klein Gunnewiek.

Blaastumoren zijn bij de eerste diagnose meestal oppervlakkig met een goede prognose. Ondanks het feit dat na behandeling bij meer dan 70% van de patiënten de tumor na verloop van tijd terugkeert, vertoont slechts een klein percentage van deze patiënten met recidieven progressie van een oppervlakkige naar een invasieve tumor wat uiteindelijk kan leiden tot metastaseringen. Aangezien de markers die tot op heden worden gebruikt om de risicogroep, patiënten met een verhoogde kans op tumorprogressie, vast te stellen geen volledig uitsluitsel geven is het van belang over nieuwe (moleculair biologische) markers te kunnen beschikken. Eén van deze potentiële markers is het p53-gen, een tumorsuppressor-gen dat in meer dan 50% van alle humane tumoren gemuteerd is (1). Bij blaastumoren is een sterke associatie tussen tumorprogressie en de aanwezigheid van p53-mutaties aangetoond (2). Om inzicht te krijgen in de voorspellende waarde van p53-mutaties voor de diagnostiek van oppervlakkige blaastumoren worden in een prospectieve studie p53-mutatie-analyses uitgevoerd in drie ziekenhuizen.

### Blaastumoren

Blaaskanker is in de westerse samenleving bij mannen de vijfde in de rij van de meest voorkomende kankersoorten en nummer 8 bij vrouwen (3). Het ontstaan van blaastumoren is sterk geassocieerd met roken (4). Ongeveer 90% van de maligne blaastumoren zijn epitheliaal van oorsprong en de overgrote meerderheid behoort tot het type 'transitional cell carcinoma' (TCC) (2). Verschillende histologische

stadia zijn bij TCC te onderscheiden (figuur 1) en elk stadium is onder te verdelen in een drietal graden. Bij de eerste openbaring van de blaastumor is in 75-85% sprake van een oppervlakkige tumor (CIS 'carcinoma in situ', pTa of pT1) terwijl in de resterende 15-25% sprake is van een invasieve tumor (stadium pT2 of hoger) met een slechte prognose. Meer dan 70% van de patiënten met een oppervlakkige blaastumor krijgen na behandeling één of meerdere recidieven en ongeveer 25-30% van deze patiënten met recidieven vertonen progressie wat uiteindelijk kan leiden tot metastaseringen. Het is daarom letterlijk van levensbelang om over betrouwbare markers te beschikken die aangeven of een patiënt al dan niet behoort tot de risicogroep waarbij progressie zeer waarschijnlijk waargenomen zal worden.

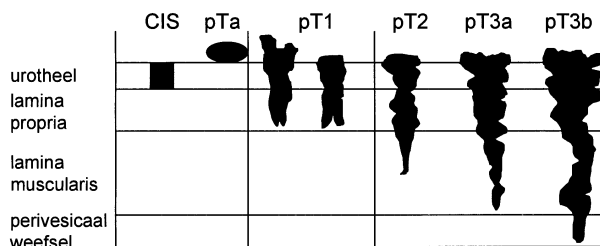
Markers, die door de urologen worden gebruikt om te bepalen of patiënten tot de risicogroep behoren zijn het vroegtijdig voorkomen van recidieven, het gelijktijdig voorkomen van meerdere tumoren, de diagnose CIS en stadium, graad en grootte van de tumor (een pT1G3 tumor heeft de meeste kans op progressie) (5). Tevens is de waarde van de Quanticyt (kwantitatieve cytologie), dat inzicht geeft in de genetische schade, aangetoond. In de Quanticyt bepaling worden de celkernen van maligne cellen beoordeeld met betrekking tot de DNA-inhoud en de vorm (een grillige celkern en een afwijkende DNA-inhoud duidt op maligniteit), op grond waarvan een patiënt ingedeeld wordt in de lage, intermediaire of hoge risicogroep. Patiënten, die behoren tot de hoge risicogroep hebben een slechte prognose. Door het gebruik van deze methode neemt de gevoeligheid voor de detectie van tumoren met een lage graad toe (6). Echter, er wordt naarstig gezocht naar nieuwe markers waarvan de prognostische waarde nauwkeuriger is dan die van de hierboven beschreven markers. De aandacht richt zich hierbij met name op moleculair biologische markers omdat uit moleculair biologisch onderzoek

Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium

Afkortingen: CIS: carcinoma in situ; LOH: loss of heterozygosity; PCR: polymerase chain reaction; SSCP: single strand conformation polymorphism; TCC: transitional cell carcinoma

Correspondentie: Dr. J.M.T. Klein Gunnewiek, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 9015, 6500 GS Nijmegen.

Ingekomen: 04.05.98



**Figuur 1.** Verschillende histologische stadia van TCC volgens Dalbagni et al. (7). Naast deze indeling per stadium wordt elk stadium tevens onderverdeeld in graden: graad 1 t/m 3 waarbij graad 3 minder gedifferentieerde cellen bevat dan graad 1.

is gebleken dat progressie van oppervlakkige blaastumoren gepaard gaat met een opeenstapeling van genetische veranderingen. Eén van deze genetische veranderingen is het optreden van LOH ('loss of heterozygosity'), het verlies van bepaalde chromosoomgebieden waarop één of meerdere allelen gelegen zijn. In een aantal uitgebreide studies is gekeken naar het optreden van LOH en de progressie van blaastumoren (2, 7). Daaruit is gebleken dat 9q, 13q en 17p LOH algemene genetische gebeurtenissen zijn verbonden met blaaskanker. 9q en 13q LOH worden in alle stadia en graden van blaaskanker aangetroffen alhoewel 13q LOH frequenter wordt aangetroffen bij invasieve tumoren in vergelijking tot oppervlakkige tumoren. Daarentegen is 17p LOH, waarbij verlies van het p53-gen optreedt, sterk geassocieerd met stadium en graad van de blaastumor wat aangeeft dat het een kenmerk voor tumorprogressie is (2, 7). Naast 17p LOH worden bij blaastumoren ook vaak mutaties in het overgebleven p53-gen aangetroffen (2, 8). Het voorkomen van p53-mutaties is niet alleen beperkt tot blaastumoren maar wordt in meer dan 50% van alle, met name solide, tumoren aangetroffen, zoals prostaat-, colon-, borst- en longtumoren, wat aangeeft dat het een algemene genetische gebeurtenis is dat gepaard gaat met de ontwikkeling van tumoren (1). Daarom wordt sinds een aantal jaren veel aandacht besteed aan de aanwezigheid van p53-mutaties bij verschillende tumoren en de klinische relevantie daarvan.

### **p53: beschermer van ons genoom**

p53 is een tumorsuppressor eiwit dat in de celkern voorkomt en daar een belangrijke functie vervult. Na een stress-signaal (bijv. DNA-schade) vindt een snelle toename van de hoeveelheid p53-eiwit in de celkern plaats. Deze verhoging van het p53-niveau leidt tot een (tijdelijke) stilstand van de celcyclus in de G1 fase zodat het beschadigde DNA hersteld kan worden waarna de celdeling hervat wordt, of apoptose (geprogrammeerde celdood) geïnitieerd kan worden. Vanwege deze functie wordt het p53-eiwit ook wel de beschermer van onze genetische informatie genoemd. Levine (1) en Gottlieb en Oren (9) geven in twee overzichtsartikelen uitgebreid weer hoe het p53-eiwit deze beschermende functie uitvoert. Als echter het p53-eiwit de beschermende functie niet kan uitoefenen doordat het uitgeschakeld is, zijn cellen met genetische afwijkingen in staat zich te blijven vermenigvuldigen wat resulteert in minder stabiele cellen waardoor de kans op ontwikkeling van tumorcellen sterk toeneemt. Uitschakeling van p53 wordt onder andere veroorzaakt door mutaties in het p53-gen. Alle mutaties die tot op heden zijn geanalyseerd resulteren in een verlies van de p53-functie (8). Daarnaast kan p53 uitgeschakeld worden door binding aan bepaalde virale eiwitten, zoals eiwitten van het humane papiloma virus en het adenovirus, waardoor de p53-gemedieerde apoptose verhinderd wordt. Tevens kan p53 geïnactiveerd worden na binding aan cellulaire onco-eiwitten zoals Mdm-2 (9).

### **p53 en blaastumoren**

Aangezien p53-mutaties veelvuldig voorkomen in blaastumoren en de aanwezigheid daarvan geassocieerd wordt met stadium en graad van de tumor bestaat veel belangstelling voor p53 als potentiële progressiemarker voor oppervlakkige blaastumoren (8).

De mogelijke prognostische waarde van de aanwezigheid van p53 mutaties is aangetoond in het geval van Hubert H. Humphrey, voormalig vice-president van de USA en overleden aan een blaastumor.

In de primaire blaastumor is een mutatie in het p53-gen aangetroffen dat eveneens is aangetroffen in het DNA afkomstig uit cellen van het urinesediment verzameld 9 jaar voor de verwijdering van de blaas (radicale cystectomie), 6 jaar voor behandeling van de blaastumor en 2 jaar voordat CIS werd gediagnosticeerd (10). Detectie van p53-mutaties vindt doorgaans plaats met behulp van immunohistochemie of de moleculaire biologie.

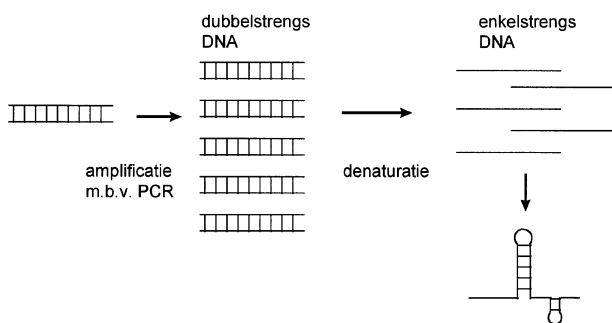
### **Immunohistochemische detectie van p53-mutaties**

De halfwaardetijd van het p53-eiwit is dusdanig kort dat het onder normale condities op een zeer laag niveau tot expressie komt waardoor het niet aangetoond kan worden in de celkern. Echter, wanneer p53 gemuteerd is of gebonden door virale eiwitten dan neemt de halfwaardetijd aanzienlijk toe zodat detectie mogelijk wordt (9). Immunohistochemie maakt gebruik van dit gegeven door met specifieke antilichamen te kijken of p53 tot overexpressie komt in de celkern. Overexpressie van p53 is vaak maar zeker niet altijd gerelateerd aan een mutatie in het p53-gen (2, 11) wat een overschatting van het aantal mutaties tot gevolg heeft. Bij het gebruik van immunohistochemie is het van belang een aantal criteria nauwkeurig vast te stellen. Het verdient aanbeveling een tumor p53-positief te noemen als tenminste 20% van de tumorcellen p53-overexpressie vertonen (2). Tevens kunnen vals negatieve resultaten optreden omdat mutaties in het p53-gen die aanleiding geven tot de vorming van een sterk verkort eiwit of helemaal geen eiwitsynthese tot gevolg hebben op deze manier niet waargenomen zullen worden. Ook als het epitoom, dat herkend wordt door de antilichamen, veranderd is ten gevolge van de mutatie zal geen detectie optreden.

De mogelijke voorspellende waarde van p53-overexpressie voor oppervlakkige blaastumoren is in veel studies bekeken. Hieruit blijkt in de meeste gevallen een associatie tussen overexpressie van p53 in tumorweefsel en tumorprogressie te bestaan maar de vraag of overexpressie van p53 een onafhankelijke marker is voor progressie van oppervlakkige blaastumoren wordt niet eenduidig beantwoord (2, 8).

### **Moleculair biologische detectie van p53-mutaties**

Het p53-gen is gelegen op chromosoom 17p13 en bestaat uit 11 exonen, gebieden met informatie om het eiwit te vormen, waarvan de exonen 5 tot en met 8 informatie bevatten voor de functionele domeinen van het p53-eiwit. Aangezien meer dan 90% van alle p53-mutaties voorkomen in dit gebied (1) worden



**Figuur 2.** Het principe van SSCP (single strand conformation polymorphism). Na amplificatie van de exonen 5, 6, 7 of 8 met behulp van PCR (Polymerase Chain Reaction) worden de dubbelstrengs DNA fragmenten gedenuatureerd bij 95°C zodat enkelstrengs fragmenten ontstaan. Afhankelijk van de sequentie zal het enkelstrengs DNA een bepaalde conformatie hebben, die verandert als een mutatie in het DNA-fragment aanwezig is. De conformaties kunnen geanalyseerd worden met behulp van een gelsysteem of capillaire elektroforese.

alleen de exonen 5 tot en met 8 getest op aanwezigheid van mutaties. In een p53-mutatie-analyse worden de exonen 5 tot en met 8 van het p53-gen afzonderlijk vermenigvuldigd met behulp van de Polymerase Chain Reaction (PCR). Vervolgens wordt gekeken of er mutaties in het vermenigvuldigde DNA worden aangetroffen. Dit kan onder andere gedaan worden door de DNA-sequentie van de verschillende exonen afzonderlijk te bepalen. Aangezien dit erg arbeidsintensief en duur is, met name als er sprake is van veel patiënten, wordt meestal een voorselectie uitgevoerd. Deze voorselectie kan onder andere uitgevoerd worden met behulp van SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), dat de detectie van één enkele puntmutatie in het DNA mogelijk maakt (zie figuur 2). Het nadeel van deze methode is echter dat niet 100% maar 80-90% van de aanwezige mutaties gevonden worden (12). Met behulp van de PCR-SSCP kunnen mutatie-analyses uitgevoerd worden op DNA geïsoleerd uit tumorweefsel of blaaswassing aangezien de cellen aanwezig in een blaaswassing een afspiegeling vormen van de status van de tumor. Het gebruik van blaaswassing lijkt een beter alternatief dan het gebruik van urine omdat het aantal cellen in de blaaswassing hoger zal zijn en de conditie van de cellen beter (13). Het nadeel van het gebruik van blaaswassing ten opzichte van tumorweefsel is dat naast tumorcellen ook gezonde cellen zullen voorkomen die het beeld vertroebelen. Een kleine pilot met gemuteerd en wild type DNA heeft aangetoond dat 15-20% mutant ten opzichte van wild type DNA nog wordt waargenomen in de SSCP (Klein Gunnewiek en Hessels, ongepubliceerde data). Voor het direct sequencen van de PCR producten ligt dit getal op 20% (Van Solinge, ongepubliceerde data). Uit p53-mutatie-analyses is gebleken dat de aanwezigheid van p53-mutaties geassocieerd is met de graad van de tumor (14-17) wat sterk suggereert dat de aanwezigheid van p53-mutaties geassocieerd is met de progressie van de blaastumoren. In Nijmegen (13) is een studie uitgevoerd waarbij de prognostische waarde van de aanwezigheid van p53-mutaties

bij patiënten met oppervlakkig TCC behorend tot de hoge risico groep op grond van de Quanticyt bepaling, geëvalueerd: de aanwezigheid van p53-mutaties heeft een positief voorspellende waarde (p53-mutatie met progressie) van 86% en een negatief voorspellende waarde (p53 wild type zonder progressie) van 63%. De p53-mutaties werden voorafgaand aan de progressie aangetroffen.

## Conclusies

p53 is een goede kandidaat om als prognostische marker voor oppervlakkige blaastumoren te dienen aangezien verlies van één p53-gen en mutaties in het overgebleven p53-gen vaker worden aangetroffen bij patiënten met spierinvasieve tumoren dan bij patiënten met oppervlakkige blaastumoren, wat sterk suggereert dat p53 betrokken is bij het ziekteverloop. Uit een eerste studie waarin is gekeken naar de prognostische waarde van p53 is gebleken dat aanwezigheid van p53-mutaties bij patiënten die behoren tot de risicogroep op grond van de Quanticyt bepaling een positief voorspellende waarde heeft van 86% (13). In deze studie zijn 26 patiënten getest. Het is daarom belangrijk een grotere groep patiënten te bestuderen om zo exact te kunnen vaststellen wat de voorspellende waarde van p53-mutaties is voor het ziekteverloop van TCC, wat het gebruik van de p53-mutatie-analyse als diagnostische test kan rechtvaardigen. Dit zal uitgevoerd worden in drie ziekenhuizen (t.w. Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Eemland Ziekenhuis Amersfoort en Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis Nijmegen) waar in een prospectieve studie TCC patiënten met CIS en/of meerdere pT1 recidieven en/of graad 2b/3 en/of behoren tot de hoge risico groep gebaseerd op de Quanticyt bepaling getest zullen worden op aanwezigheid van p53-mutaties.

## Literatuur

1. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
2. Cordon-Cardo C, Sheinfeld J. Molecular and immunopathology studies of oncogenes and tumor-suppressor genes in bladder cancer. *World J Urol* 1997; 15: 112-119.
3. Raghavan D, Shipley WU, Garnick MB, Russell PJ. Biology and management of bladder cancer [see comments]. *N Engl J Med* 1990; 322: 1129-1138.
4. Husgafvel K, Pursiainen K, Kannio A. Cigarette smoking and p53 mutations in lung cancer and bladder cancer. *Environ Health Perspect* 1996; 104 suppl. 3: 553-556.
5. Kiemeny LALM, Witjes JA, Verbeek ALM, Heijbroek RP, Debruyne FM. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 806-812.
6. Poel HG van der, Witjes JA, Schalken JA, Debruyne FMJ. In *Superficial bladder cancer*, pp 169-178. Eds Pagano F, Fair WR. Isis Medical Media Ltd 1997: Oxford, UK.
7. Dalbagni G, Presti V, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 1993; 342: 469-471.
8. Nouri AME, Darakhshan F, Cannell H, Paris AMI, Oliver RTD. The relevance of p53 mutation in urological malignancies: possible clinical implications for bladder cancer. *Br J Urol* 1996; 78: 337-344.
9. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasias. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287: 77-102.
10. Hruban RH, Riet P van der, Erozan YS, Sidranski D.

- Brief report: molecular biology and the earlier detection of carcinoma of the bladder- the case Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; 330: 1276-1278.
11. Vet JAM, Bringuier PP, Schaafsma HE, Witjes JA, Debruyne FMJ, Schalken JA. Comparison of p53 protein overexpression with p53 mutation in bladder cancer: clinical and biological aspects. *Lab Invest* 1995; 73: 837-843.
  12. Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* 1997; 43: 1114-1128.
  13. Vet JAM, Witjes JA, Marras SAE, Hessels D, Poel HG van der, Debruyne FMJ, Schalken JA. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1055-1061.
  14. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-709.
  15. Oyasu R, Nan L, Szumel RC, Kawamata H, Hirohasji S. p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Mod Pathol* 1995; 8: 170-176.
  16. Goto K, Konomoto T, Hayashi K, Kinukawa N, Naito S, Kumazawa J, Tsuneyoshi M. p53 mutations in multiple carcinomas: a molecular analysis of the development of multiple carcinomas. *Mod Pathol* 1997; 10: 428-437.
  17. Schlechte HH, Schnorr D, Löning T, Rudolph BD, Pohrt UM, Loening S. Mutation of the tumorsuppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers - investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol* 1997; 157: 1049-1053.

*Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 182-186

## De rol van apoptotische endotheelcellen in de pathogenese van diabetische microangiopathie

A.B. MULDER, I. VERMES, P.T.J. MARX, R. OVERBEEKE en C. HAANEN

Gestoorde functie van endotheelcellen blijkt een belangrijke rol te spelen in de pathogenese van diabetische microangiopathie. In dit overzicht beschrijven we experimenten met gekweekte endotheelcellen, waarin twee processen; apoptose (geprogrammeerde celdood) en expressie van "vascular endothelial growth factor" (VEGF), werden onderzocht.

Endotheelcellen, geïsoleerd uit venen van humane navelstrengen, werden gestimuleerd met verschillende mediators, waaronder glucose en niet-enzymatisch geglycosyleerd BSA. Voor bepaling van de apoptose werd gebruik gemaakt van de TUNEL methode. Expressie van VEGF mRNA werd bepaald met behulp van een semi-kwantitatieve competitieve reverse transcriptase polymerase chain reaction.

De resultaten tonen aan dat er slechts een geringe inductie van apoptose optrad (maximaal 12%), terwijl er een concentratie-afhankelijke inductie van VEGF mRNA werd waargenomen.

In aanvullend experimenten willen we de mogelijke relatie tussen expressie van VEGF en optreden van apoptose nader bestuderen. Daar losgelaten endotheelcellen mogelijk een rol spelen bij de diabetische microangiopathie, zullen we tevens de losgeraakte endotheelcellen onderzoeken.

*Trefwoorden: diabetische microangiopathie; endotheelcellen; apoptose; vascular endothelial growth factor (VEGF); celadhesiefactoren.*

---

*Afdeling Klinische Chemie, Medisch Spectrum Twente, Enschede*

Correspondentie: Dr. A.B. Mulder, Medisch Spectrum Twente, Afdeling Klinische Chemie, Postbus 50.000, 7500 KA Enschede. Ingekomen: 04.05.98

In de laatste 25 jaren is veel inzicht in het verband tussen hormonale en metabole veranderingen bij diabetes mellitus verkregen en de behandeling van diabetes mellitus is vooral gericht geweest op het voorkomen van ernstige metabole ontregeling. Maar ondanks de moderne, zeer uitgebreide diagnostische en therapeutische mogelijkheden heeft de patiënt met suikerziekte nog steeds een verhoogde ziektekans en een kortere levensverwachting. In de laatste jaren is de medische belangstelling van karakter veranderd en heeft zich sterk gericht op het optreden van late complicaties van diabetes mellitus. Dit zijn met name de microangiopathie, met als uitingsvormen de nefropathie en de retinopathie, en de macroangiopathie, zoals de atherosclerotische hart- en vaatziekten.

Deckert e.a. hebben laten zien dat van patiënten, die voor hun 31e levensjaar diabetes ontwikkelden, 40 jaar na het stellen van de diagnose nog slechts 40% in leven waren (1). De belangrijkste doodsoorzaken waren myocardinfarct en nierinsufficiëntie. Bij 20% van de nog levenden bestond een gestoorde nierfunctie, terwijl ook 20% een myocardinfarct had doorgemaakt. Ongeveer 10% van de patiënten was getroffen door een cerebrovasculair accident en 12% had een amputatie ondergaan wegens optreden van gangreen.

Oogafwijkingen komen bij diabetes patiënten in een hoge frequentie voor. De belangrijkste en meest specifieke diabetische oogafwijkingen zijn microvasculaire complicaties van het netvlies. Diabetische retinopathie is zelfs in de Westerse wereld de belangrijkste oorzaak van slechtziendheid en blindheid bij mensen tussen de 20 en 75 jaar (2). Diabetische retinopathie komt voor bij 40% van alle patiënten met diabetes mellitus.

Histologisch-morfologisch gezien worden de begin-