



UPPSALA
UNIVERSITET

Human tumörbildning via nukleotidförändringar i *MDM2*- promotorn

Alexander Sokyazian

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Human tumörbildning via nukleotidförändringar i *MDM2*-promotorn

Alexander Sokyazian

Självständigt arbete i biologi 2016

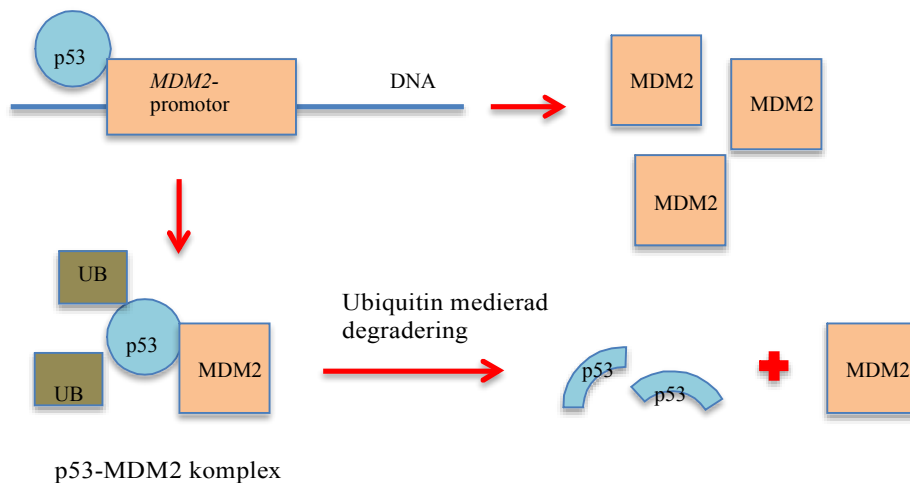
Sammandrag

I både mer eller mindre ekonomiskt utvecklade länder så är en av de ledande dödsorsakerna cancer. Populationstillväxt och en åldrande befolkning är några faktorer som kommer att öka cancerfallen i världen. För att förebygga cancer så spelar tumörsuppressorgen *p53* en viktig roll. I 50 % av alla humana tumörer finns somatiskt inaktiverande mutationer av *p53*-genen. Mus dubbel minut 2 homolog (*MDM2*) kontrollerar noggrant *p53*-nivån i icke-stressade celler. *MDM2* binder till *p53*-transaktiveringsdomänen och hämmar dess aktivitet, vilket fungerar som en negativ regulator. Bakomliggande orsaker för mottaglighet för cancer och fortskridandet av sjukdomen kan antas att ha göra med polymorfa genetiska varianter i *p53* reaktionsvägar. Genom att studera *MDM2* genen som kodar för en viktig negativ regulator av *p53*, har man därför påbörjat sökandet efter genetiska variationer i *p53* reaktionsvägen. Det hittades två styckena enbaspolymorfier (eng. Single Nucleotide Polymorphism, SNP). En av dessa var SNP 309 en T till G förändring vid 309:e nukleotiden, den andra som hittades är mer sällsynt det är SNP 344, en T till A förändring på 344:e nukleotiden. En terapeutisk strategi för behandling av cancer är att aktivera *p53* i tumörer för behållandet av vildtyp *p53*-uttryck. Forskare har med flera tillvägagångssätt försökt hindra *p53*-*MDM2* interaktion, till exempel med små peptider och *MDM2* inhibitorer. Nutliner är små molekylära hämmare av *MDM2*. Nutliner har utvecklats kliniskt i olika faser för selektivt hämma *MDM2*-*p53* interaktion. Nutlinfamiljens första kliniskt utvärderade molekyl är RG7112. RG7112 fungerar som en potent och selektiv antagonist av *p53*-*MDM2* interaktion. Andra generationens inhibitor RG7388 är mer potent och har bättre förmåga att sprida sig än förstagenerationens *MDM2*-molekylära hämmare (RG7112). RG7388 kommer leda till en aktivering av nedströms transkriptions-målgener och ge ett ökat uttryck av *p53* i både cytoplasman och i cellkärnan. I prekliniska studier har nutliner visats ge lovande effekter mot cancer. Patienter med tumörer som uttrycker vildtyp *p53* kan alternativt behandlas med nutliner antingen som monoterapi eller som kombinationsterapi. I jämförelse med vildtyp *p53*, så är mutant *p53* motståndskraftiga mot nutliner i tumörceller. Vilket medför en begränsning av den terapeutiska nyttan för *MDM2*-antagonister, till att bara gälla behandling av tumörer som är vildtyp för *p53*.

Inledning

I både mer eller mindre ekonomiskt utvecklade länder så är en av de ledande dödsorsakerna cancer. Tillväxt och en åldrande befolkning är några faktorer som kommer att påverka flera cancerfall i världen. Mindre utvecklade länder där ca 82 % av världens befolkning bor, kommer att vara speciellt utsatt. Mindre ekonomiskt utvecklade länder har ytterligare ökat cancerbördan genom förändrad livsstil. Några kända livsstilsbeteenden som ökar risken för att drabbas av cancer är fysisk inaktivitet, rökning och dålig kost. Den vanligaste diagnosen för cancer i världen är bröst och lungcancer samt den främsta anledningen till cancerdöd bland män och kvinnor. Vanligaste diagnostiserade cancerformen bland män och kvinnor i mer ekonomiskt utvecklade länder är prostatacancer och lungcancer. Trots den stora befolkningen i mindre ekonomiskt utvecklade länder, så står man bara för 57 % av cancerfallen och 65 % av cancerdödsfallen. Några av orsakerna till detta kan vara mindre tobakskonsumtion, samt konkurrerande dödsorsaker som smittor. På grund av åldrande population och ökande förekomster av kända riskfaktorer, så kommer cancerfallen fortsätta att förflyttas till mindre ekonomisk utvecklade länder (Torre *et al.* 2015).

För att förebygga cancer så spelar tumörsuppressorgen *p53* en viktig roll (Tabell 1). Genom cellulär stress kommer *p53* som är en transkriptionsfaktor att aktiveras och reglera flera nedströms mål som är inblandade i apoptos, DNA-reparation, cellcykelkontroll, och åldrande. Oftast i cancerceller så är *p53* inaktiverad vilket till slut leder till en okontrollerad celledelning. Mus dubbel minut 2 homolog (MDM2) kontrollerar noggrant *p53*-nivån i icke-stressade celler. MDM2 binder till *p53*-transaktiveringsdomänen och hämmar dess aktivitet, vilket fungerar som en negativ regulator (Figur 1).



Inget p53-MDM2 komplex, ingen p53 degradering.

Figur 1. I normala celler eller celler efter DNA-reparation är *p53* inte fosforylerad. Koncentrationen av *p53* proteiner är låg på grund av protein regulatorn MDM2. Vilket aktiverar igång en degradering av *p53* proteinet genom ubiquitin ligase. I celler med en DNA-skada så kommer *p53* att bli aktiverad med hjälp av fosforylering. Eftersom *p53* är fosforylerad så kan inte MDM2 binda dit och bilda ett *p53*-MDM2 komplex. Vilket ökar koncentrationen av *p53*. Efter DNA-reparation kommer *p53* återigen bli inaktiv genom defosforylering.

Tabell 1. Visar i texten använda förkortningar.

Förkortningar			
ChIP	Chromatin immunoprecipitation	Sp1	Transkriptionsfaktor
E3	Ubiquitin ligase	TAD	Transaktiverande domän
GADD45	Growth arrest and DNA damage protein	DR5	Death receptor 5
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
Saos2	Sarcoma osteogenic cell line	p53	Tumörsuppressorn p53
SNP	Enbaspolymorfi	STS	Soft-tissue sarcoma
MDM2	Mouse double minute 2 homolog		

Återställandet av funktionen för p53 som en tumörsuppressorn kan inträffa genom att förhindra en interaktion mellan p53-MDM2. *MDM2*-genen i sig själv är transkriptionella målet för p53, där en ökning av p53-nivåer kommer leda till en minskning av MDM2-nivåer, därför tjänar MDM2 att upprätthålla låga nivåer av p53 genom proteosomala nedbrytning (Bond 2005, Andreeff 2016). Att p53 tumörsuppressorn fungerar korrekt är en viktig förutsättning för att bekämpa cancer. Det är svårt att förutse de biologiska resultaten från p53-aktivering, eftersom en p53-aktivering är så flerdelad. Den sträcker sig från framkallande av tillväxtstopp till frambringande av celldöd, vilket limiterar den terapeutiska användningen av p53-baserade behandlingar. Transkriptionsfaktorn Sp1 och p53 delar båda på en gemensam regulator som är MDM2, vilket binder till Sp1 och p53 för en proteosomala nedbrytning (Li *et al.* 2014).

Ett transkriptionsprogram kommer att initieras när tumörsuppressorproteinet p53 aktiveras vid cellulär stress såsom DNA skador och onkogen aktivering, och leda till DNA reparation, cellcykelstopp, och i vissa fall apoptos (Jin & Levine 2001). För att förhindra tumörbildning, har p53 responsen i reaktionsvägarna visats sig vara ett avgörande steg. I 50 % av alla humana tumörer finns somatiskt inaktiverande mutationer av *p53* genen. Med hjälp av observationer har man kunnat visa betydelsen av p53 reaktionsvägar och hur den undertrycker tumörer. Bakomliggande orsaker för mottaglighet för cancer och fortskridandet av sjukdomen kan antas att ha göra med polymorfa genetiska varianter i p53 reaktionsvägar (Zauberman 1995, Ries 2000).

Syfte

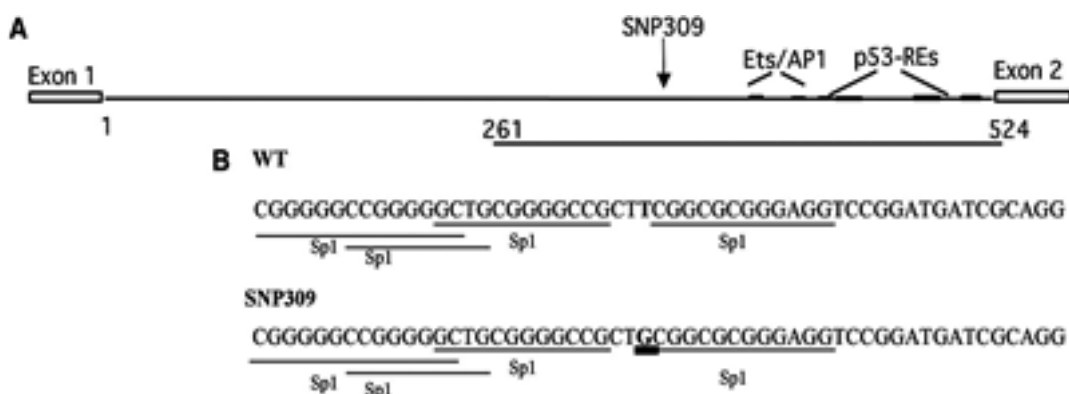
Syftet med den här studien är att skildra effekterna av nukleotid förändringar i *MDM2*-promotorn. Hur kan nukleotid förändringar i *MDM2*-promotorn resultera i minskad funktion för p53 att agera som en tumörsuppressorn? Konsekvensen av förändringen blir att vi ökar möjligheten för att bilda tumörer i människokroppen. Studien tar upp i olika experiment förhållandet mellan nukleotidförändringar och ökade nivåer av MDM2.

Sökandet av genetiska variationer

Genom att titta i Mouse double minute 2 homolog (*MDM2*) genen som kodar för en viktig negativ regulator av p53, har man därför påbörjat sökandet efter genetiska variationer i p53 reaktionsvägen. På grund av att MDM2 binder direkt och hämmar p53 kommer det leda till att vi får en reglering av p53-stabilitet och aktivitet som en transkriptionsaktivator. *MDM2* genen är även känd som E3 ubiquitin-protein ligas MDM2. I människan kodas proteinet MDM2 av *MDM2* genen. MDM2 proteinet fungerar både som en inhibitor av p53-transkription och som en E3 ubiquitin ligas som känner igen den N-terminala transaktiveringsdomänen (TAD) hos p53 tumörsuppressorn. Avgörandet för en väl reglerad p53 gensvar beror på hur stor uttrycksnivåerna i *MDM2* verkar. Sekvensförändringar i *MDM2*-promotorn förekommer naturligt och kan resultera i förändrat genuttryck av MDM2-protein, vilket därigenom påverkar p53 tumörsuppressorn och potentiellt öka cancer hos människor (Bond *et al.* 2004). Sökandet efter genetiska variationer i *MDM2*-promotorn, fokuserades till en väldefinierad region i intronen som utnyttjas av både p53 och Ras för att aktivera *MDM2* transkription (Zauberman 1995, Ries 2000).

Sekvensanalys av *MDM2*-promotorn

Bond *et al.* (2004) hittade vid relativt hög frekvens i både heterozygota tillståndet (T/G, 40 %) och homozygota tillståndet (G/G, 12 %) två styckena enbaspolymorfier (eng. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) i *MDM2*-promotorn. En av dessa var SNP 309 en T till G förändring vid 309:e nukleotiden i den första intronen (Figur 2). Den andra som hittades är mer sällsynt och har inte vidare studerats, finns bara i heterozygot tillstånd i 8 % av befolkningen. De är SNP 344, en T till A förändring på 344:e nukleotiden. Genom att analysera *MDM2*-promotorn för denna region kunde man avslöja flera förmodade bindningsställen för transkriptionsfaktorn Sp1. En T till G förändring av SNP 309 förlängde en av de förmodade Sp1 DNA-bindningsställena, vilket tyder på att närvaron av SNP 309 kan öka affiniteten hos Sp1 till denna region av *MDM2*-promotorn. Sp1 bindningsställena identifierades för att undersöka de funktionella konsekvenserna av SNP 309. Det visade sig att bindningsaffiniteten hos oligonukleotider innehållande SNP 309 var mycket högre än för vildtyp-sekvensen av renat Sp1 i ett koncentrationsintervall av 150 ng-450 ng (Bond *et al.* 2004).



Figur 2. Transkriptionsaktivatorns Sp1 affinitet förändras genom single nucleotide polymorphism i *MDM2* promotorn. (A) Visar transkriptionsfaktorns bindningsställe för p53 och Ets/AP-1. Bilden visar positionen för SNP 309, samt promotor av *MDM2*-genen i intronen. (B) Tänkbara mål för transkriptionsfaktorn Sp1 i SNP 309 och för vildtypsekvensen. (Bild tagen från Bond *et al.* 2004, med upphovsrättsinnehavarens tillåtelse).

Sp1 stimulering av SNP 309

Den sammanlagda bedömningen av data pekar på att Sp1 kan aktivera transkription genom att binda till *MDM2*-promotorn. Aktiviteten av Sp1 stimuleras ytterligare av att SNP 309 är närvarande genom att öka dess DNA-bindande affinitet till *MDM2*-promotorn. Om Sp1 stimulerades ytterligare med närvaro av SNP 309, så borde homozygota individer för SNP 309 (G/G) visa förhöjda nivåer av MDM2, jämfört med individer med vildtypsekvensen för SNP 309 (T/T). För att visa detta, använde Bond *et al.* (2004) 43 tumörhärledda cellinjer som sedan genotypades för SNP 309. Frekvensnivåerna av SNP 309 motsvarade den som fanns i normala frivilliga försökspersoner. Det fanns en korrelation mellan högt uttryck av MDM2-transkriptet och närvaron av SNP 309, jämfört med nivåerna i vildtypcellerna för SNP 309 (T/T). Analysen visade en signifikant högre proteinnivå i MDM2 homozygota cellinjer för SNP 309 (G/G). Det har i tidigare studier rapporterats att tre av de fyra cellinjerna (A875, CCF-STTG1 och T47D) homozygota för SNP 309 överuttrycker MDM2 när man jämför cellinjer framställda av liknande tumörtyper (Landers 1997, Lu 2002, Phelps 2003).

Sp1 reglering och ökade MDM2-nivåer

Att associationen av SNP 309 och Sp1 ökar nivåerna av MDM2, stöds med hjälp av dessa data. Endogent Sp1 hämmades, för att testa om Sp1 transkriptionsfaktorn verkligen var ansvarig för de ökade nivåerna av MDM2 i homozygota celler för SNP 309. Den resulterande effekten på endogena MDM2-nivåerna analyserades sedan med hjälp av två olika metoder som hämmade Sp1. Första metoden minskade Sp1-nivåerna genom transfektion av siRNA, specifikt för Sp1-RNA. För det andra metoden, behandlades cellerna med mithramycin A, ett antibiotikum som selektivt inhiberar Sp-transkriptionsfaktorn (Blume *et al.* 1991). Proteinnivåerna av Sp1 reducerades mer än två gånger av Sp1-siRNA i alla cellinjer som testades i jämförelse med transfekterade celler med antingen en icke-specifik siRNA eller siRNA riktade mot lamin A/B-transkript, även om proteinnivåerna för lamin A/B dramatiskt minskade. Sp1-siRNA hade inte någon effekt på en annan Sp familjemedlem (Sp3). Som väntat, i alla tre cellinjer som testades leder reduktionen av Sp1-nivåer till en minskning av proteinnivåer av cyklin D1, som är en av dess kända målgener (Grinstein *et al.* 2002).

Fosforylering av p53 i MDM2 SNP309 Homozygota celler

Naturligt förekommande SNP ger upphov till endogena uttryck av MDM2, vilket leder till en inhibering av apoptosen efter kemoterapeutisk läkemedelsbehandling i homozygota *MDM2* SNP 309-innehållande cellinjer (MANCA och A875). I både protein och RNA-nivåer ser man ökade uttryck av MDM2, vilket kommer att ge upphov till minskade nivåer av p53-proteiner vid en DNA-skada. I celler med *MDM2* SNP 309, kommer p53-proteinet att fosforyleras på Ser15. Fosforyleringen av p53-proteinet vid Ser15 kommer inte bara hjälpa till att stabilisera p53, utan även dess transkription. Med hjälp av antikroppar som specifikt känner igen Ser15 hos p53-proteinet kunde man undersöka kinassignaleringen av p53 i cellinjerna. Sex timmars kemoterapeutisk behandling är den tidpunkt som krävs för att få p53-proteinet aktiverad, och just därför en bra tid för att undersöka förmågan hos p53 som skall fosforyleras. De observerades efter DNA-skada betydande p53-fosforyleringar i cellinjer homozygota för *MDM2* SNP 309, samt hur p53-nivåerna ökade. Celler med stabiliserande p53-proteiner binder till DNA. Ett sätt för MDM2 att hämma p53 är att inhibera den DNA-bindande förmågan (Arva *et al.* 2005).

MDM2 och p53 polymorfism och utveckling av levercancer

Den femte vanligaste tumören i världen är hepatocellulär cancer (HCC, elakartad levercancer), vilket svarar för mer än 500 000 dödsfall varje år. Över hela världen är incidensen av HCC inte homogen, variationen beror på förekomsten av de bakomliggande orsakerna av leversjukdomen. Cirros (skrumplever) är den viktigaste riskfaktorn för att utveckla HCC. Globalt är de vanligaste anledningarna till cirros, långvariga infektioner med hepatit B-virus (HBV) och hepatit C-virus (HCV). Den viktigaste faktorn i etiologin för HCC i Asien är långvariga HBV-infektioner. Några virusfaktorer som har förknippats med HCC utveckling är HBV-genotyp, virusmängden och mutationer i promotorn. Utvecklingen av HCC kan även påverkas av ytterligare faktorer såsom kön, ålder och alkoholkonsumtion. Resultatet av HBV-infektioner tycks vara påverkad av genetiska faktorer. Att HCC-patienter med kronisk HCV-infektion förknippades med MDM2 SNP 309 rapporterades av Dharel *et al.* (2006). För hepatocarcinogenes spelar bristen av p53-funktionen en avgörande roll. Därför är p53-genen en bra kandidat för att modulera HCC-risken. De existerar även i p53-genen genetiska polymorfismer, samt 215 G>C polymorfism vid kodon 72 (Arg72Pro). Att Arg72 varianten framkallade apoptos effektivare än Pro72 varianten, vilket kan påverka cancerrisken beskrevs av Dumont *et al.* (2003), som senare bekräftades av Young *et al.* (2008).

Dharel *et al.* (2006) redovisade att HCC förknippades med MDM2 SNP 309 hos patienter med långvarig hepatit C infektion. Frekvensen av G/G genotypen i denna studie var 34 % (198/583), betydligt högre än för vita försökspersoner (12 %), och något högre än japanska (27 %) och kinesiska (25 %). Orsakerna till genotypfrekvensens olikheter kan bero på skillnader i studiepopulationerna. Förekomsten av G/G genotypen var högre i HCC patienter än hos icke HCC patienter, vilket korresponderar med resultaten från Dharel *et al.* (2006).

Inhibering av SNP 309 genom DNA-skada

En inaktivering av p53 kan ske genom överuttryck av MDM2-nivåerna (Lain & Lane 2003). För att testa p53-responsen, kan man aktivera DNA-skador i cellerna med det kemoterapeutiska läkemedlet etoposid (VP16). En aktivering av p53 kommer ge upphov till DNA-reparation, cellcykelstopp och apoptos. Bond *et al.* (2004) observerade 20 % - 35 % död av den totala cellpopulationen i celler som är av vildtyp för p53 och celler som är vildtyp för SNP 309 (T/T) (H460, ML-1, Tera-2). En intressant iakttagelse är att vildtyp-p53 celler som är homozygota för SNP 309 (G/G) (Manca, CCF-STTG1, och A875) uppvisade bara i genomsnitt 2 % - 3 % dödlighet av den totala cellpopulationen. Det analyserades även fyra cellinjer heterozygota för SNP 309 (T/G) och vildtyp för p53. Deras svar på etoposid visades vara i genomsnitt mellan 5 % - 7 % av den totala cellpopulationen. Tillsammans visar dessa data att SNP 309 homozygota cellinjer hämmas av DNA-skada (Bond *et al.* 2004).

MDM2 SNP 309 – En kombinerad utvärdering av cancerrisk

MDM2 är en negativ regulator av tumörsuppressorgen p53. MDM2 inhiberar p53-transkription genom att binda till p53-proteinet. Tumörsuppressorfunktionen hos p53 kan inaktiveras på grund av överuttryck av *MDM2*-genen. I *MDM2*-genen beskrev Bond *et al.* (2004) en enbaspolymorfism (SNP) kallad SNP 309, med en nukleotidförändring från T till G. Både p53 och RAS använder denna promotor för att aktivera MDM2-transkription. Bond *et al.* (2004) kunde visa hur transkriptionsfaktorn Sp1 ökade sin affinitet till *MDM2*-promotorn i G/G-genotypen av SNP 309 samt hur MDM2-RNA nivåerna ökade, vilket resulterar i en inhibering av p53 (Wilkening *et al.* 2007).

SNP 309 och cancerrisk

Det finns flera studier gjorda av forskare om SNP 309 och ökad cancerrisk. Ett tiotal av de studierna handlar om SNP och bröstcancer, den mest undersökta cancerformen. Forskare hittade inget samband mellan SNP 309 och bröstcancer från dessa studier, inklusive tre studier om ärftlig bröstcancer. Detsamma gällde för kolorektala (tjocktarmscancer) cancerstudier. Det gjordes sex kontrollstudier på lungcancer. Lind *et al.* (2006) kunde visa en signifikant association mellan SNP 309 (G/G) och lungcancer. Zhang *et al.* (2006) pekade på i sin studie att alla subtyper av lungcancer (476 skivepitelcancer, 361 adenocarcinom, och 269 ytterligare subtyper) kunde förknippas med SNP 309. I endast lungcancer och adenocarcinom upptäckte forskarna Park *et al.* (2006) och Jun *et al.* (2007) ett samband mellan homozygota (G/G) celler för SNP 309 och cancerrisk (Wilkening *et al.* 2007).

Debutålder för cancer och SNP 309

Patienter med Li-Fraumeni syndrom har visat sig få tidigare debut för tumörbildning genom SNP 309. De flesta Li-Fraumeni patienter har en *p53* mutation i könscellerna. Inte i någon av de kontrollstudierna visade något samband med tidigare debut för bröstcancer och SNP 309. Det finns likväl två rapporter som antyder på att statusen för receptorerna i östrogen eller progesteron kan förändra SNP 309 mottagligheten och resultera i tidigare debut för bröstcancer. Undersökningar gjorda på akut lymfatisk leukemi och en tidig debut av kolorektalcancer visade sig ha ett samband med G-allelen av SNP 309. Att kvinnliga celler skulle vara mer benägna för en anti-apoptotisk effekt av G-allelen, kunde antas efter vetenskapliga studierna på kolorektalcancer av Bond *et al.* (2006) och Alhopuro *et al.* (2005) samt den funktionella studien av Harris *et al.* (2005) på 113 lymfocytcellinjer (Wilkening *et al.* 2007).

Analys av p53 aktivitet

I minst tre olika mekanismer kan man se hur p53 inhiberas av MDM2. Att MDM2 fungerar som en E3 ubiquitin ligase med inriktning på p53 proteasomal nedbrytning, är en väl studerat process (Honda 1997, Haupt 1997, Kubbutat 1997). Allt eftersom halveringstiden för p53 ökar kommer p53-nivåerna att stiga, vid vissa cellulära påfrestningar såsom DNA-skada. Bristande oförmågan hos MDM2 att kunna börja nedbrytningsprocessen av p53 efter en DNA-skada, har att göra med ökningen av halveringstiden för p53. MDM2-nivåerna reduceras liksom dess affinitet för p53-bindning omedelbart efter DNA-skada (Michael & Oren 2003).

Ökade nivåer av MDM2 och dess inverkan på p53

Nivåerna av vildtyp p53 i celler före och efter stress (DNA-skada) kontrollerades av Bond *et al.* (2004) för att ta reda på vilken effekt förhöjda nivåer av MDM2 i G/G celler har på p53-nivåerna. p53-nivåerna stabiliserades betydande i de två testade G/G cellinjerna, genom reduktion av MDM2 med hjälp av siRNA. Data pekar på att nedbrytningen av p53 i G/G-celler sker genom att MDM2 binder till p53, men att förhöjda nivåer av MDM2 i icke-stressade G/G-celler inte ytterligare minskar halterna av vildtyp p53. Som sagt tidigare kan ökandet av MDM2-nivåerna genom stress även minska p53-nivåerna (Bond *et al.* 2004). En möjlig förklaring kan vara att MDM2-nivåerna inte är begränsade i icke-stressade celler och på så vis inte har någon ytterligare effekt på p53-nivåer. Hittills kan man säga att experimenten stödjer en modell där p53-nivåerna minskar av att celler homozygota för SNP 309 uttrycker högre nivåer av MDM2. Individer som har en p53-mutation i en allel kommer att utveckla tumörer i mycket större frekvensen än andra människor (Li-Fraumeni Syndrom) (Li 1990, Garber 1992).

Att tumörbildning påverkas positivt genom ökade nivåer av MDM2 går att hitta starka bevis på i litteraturen. Ett exempel är när Jones *et al.* (1998) använde *MDM2*-genen som en transgen för att producera överuttryck av MDM2 i möss. Möss som inte var transgena visade fyra gånger mindre MDM2-nivåer än möss som var transgena i olika vävnader. Alla transgena möss utvecklade spontana tumörer under sin livstid (Jones *et al.* 1998). Ett annat exempel är när Lundgren *et al.* (1997) visade hur det bildades tumörer i murina bröstepitelceller genom målinriktade överuttryck av MDM2.

Li-Fraumeni individer – Tumörutveckling

Utvecklingen av tumörer hos Li-Fraumeni individer sker oftast hos unga personer och dessa kan under hela sin livstid utveckla flera tumörer. Bond *et al.* (2004) antog att individer med Li-Fraumeni syndrom skulle ytterligare få p53-nivåerna försvagade genom ökade nivåer av MDM2, därmed påverka ytterligare tumörbildning. För att testa detta började man att analysera DNA-skada responsen i fibroblaster samt nivåerna av MDM2. MDM2-nivåerna var signifikant högre i SNP 309 (G/G) fibroblaster, jämfört med dem som fanns i SNP 309 (T/T) fibroblaster. SNP 309 homozygota (G/G) celler visade ingen signifikant skillnad i DNA-innehåll jämfört med T/T fibroblaster. Närvaron av SNP 309 kan både påverka mätvärdena av MDM2 och p53 i Li-Fraumeni individer efter etoposid-behandling (Bond *et al.* 2004). En minskning av p53-nivåer i Li-Fraumeni individer i närvaro av SNP 309 skulle kunna påverka tumörutvecklingen. För att ta reda på denna möjlighet gjorde forskargruppen en studie på 88 familjemedlemmar med Li-Fraumeni syndrom och med en nedärvd mutation i en allel av p53. Man fann att det inte fanns någon skillnad i frekvensnivån av SNP 309 mellan Li-Fraumeni individer och 50 friska personer (Hwang *et al.* 2003).

Genomsnitt 9 år tidigare tumördebut – Li-Fraumeni syndrom

Av 88 Li-Fraumeni individer diagnostiserades 66 personer med cancer. Debutåldern för alla tumörtyper började betydligt tidigare hos heterozygota eller homozygota individer som bär på SNP 309. Medianåldern för tumördebut hos personer med SNP 309 var 18 år, medan medianåldern hos vildtyp individer var 27 år. Mer bestämt, bland vildtyp individer var medianåldern för uppkomsten av Soft Tissue Sarcoma (STS) 14 år, medan medianåldern var två år hos SNP 309 individer. När det gäller bröstcancer var medianåldern 39 år bland vildtyp individer och 29 år för SNP 309 individer. I genomsnitt fick personer som bär på SNP 309 tumörer 9 år tidigare än de som inte bär på SNP 309. Utvecklandet av tumörer vid låg ålder med närvaron av SNP 309 som ytterligare minskar p53-nivåerna hos Li-Fraumeni personer bekräftas med dessa data. Ett utmärkande egenskap av Li-Fraumeni syndrom är att under en livstid bilda flertal tumörer. Med Fisher's test kunde man visa en korrelation mellan

förekomsten av flertal tumörer och närvaron av SNP 309 för individer med STS. Data pekar på en sammankoppling med närvaron av SNP 309 och förekomsten av oberoende efterföljande cancer. Två viktiga kännetecken för Li-Fraumeni syndrom är nämligen tidig debutålder för tumörer och förekomsten av flertal tumörer under en livstid där p53 spelar en viktig roll. p53 hämmas genom närvaron av SNP 309 i promotorn av *MDM2*-genen som leder till att vi får ett överuttryck av MDM2-protein (Bond *et al.* 2004).

Enbaspolymorfism - SNP 285G>C

Knappskog *et al.* (2011) hittade hos den vita befolkningen en enbaspolymorfism (SNP 285G>C), 24 baspar uppströms från SNP 309 i *MDM2*-promotorn. SNP 285C allel varianten bildar en tydlig SNP 285C/SNP 309G haplotyp som står för ca 12 % av de SNP 309G alleler. Affiniteten för transkriptionsfaktorn Sp1 till *MDM2*-promotorn kommer att reduceras på grund av att SNP 285C motverkar effekten av SNP 309G, vilket är förknippat med en minskad risk för att drabbas av cancer. Det finns ett intresse att forska efter ytterligare varianter i *MDM2*-promotorn. Studier gjorda på SNP 309 och SNP285 pekar på promotoraktivitet i *MDM2*. När allel varianterna av både SNP 309 och SNP285 är närvarande kommer det att ge uttryck åt minskade MDM2-nivåer. Forskare har funnit genom epidemiologiska studier i bröstcancer, äggstockscancer och livmoderhalscancer hur SNP285 neutraliserar effekten av SNP309. Det är i kombination med släktskap och inte med en SNP285 variant som SNP309 orsakar en ökad cancerrisk (Knappskog 2011a,b).

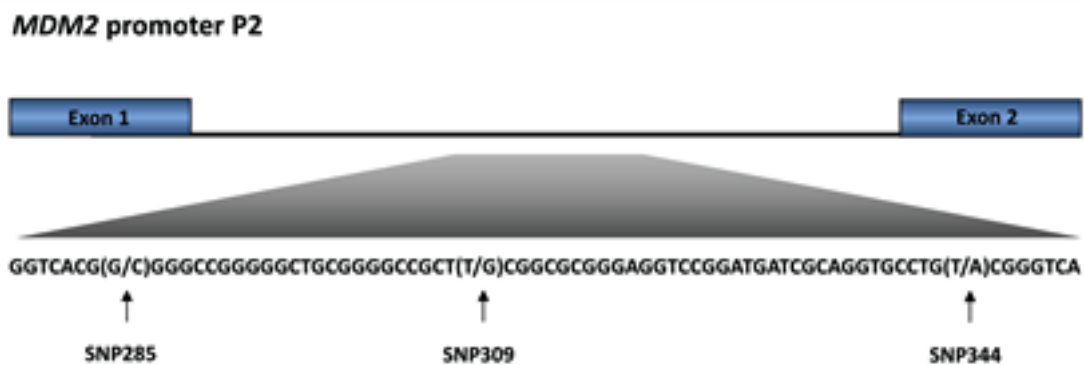
SNP309 och SNP285 - Med risk för lungcancer

I USA är lungcancer den vanligaste orsaken till cancerrelaterad död. Variationen i etnicitet är viktiga hänseenden när det gäller förekomsten och dödligheten i lungcancer. Risken för att utveckla och dö av lungcancer är mycket högre hos afro-amerikanska män, i motsats till europeiska-amerikanska män. Det finns många anledningar som kan bidra till dessa skillnader t.ex. genetiska variationer. I tidigare studier har man associerat en ökad risk för lungcancer med närvaro av SNP309 hos norska och koreanska befolkningar, samt en minskad risk hos kaukasier och kineser. I andra förarbeten har forskare inte kunnat hitta något specifikt samband med SNP309 närvarande och lungcancer hos afro-amerikaner, vita amerikaner och kineser. Det förblir alltjämt oklart, trots flertal gjorda studier på SNP309. SNP285 skulle kunna vara en del av den epidemiologiska heterogeniteten beträffande SNP309. Ryan *et al.* (2012) undersökte i en kohort av 720 kontroller och 556 fall, huruvida SNP285 försvårade effekten av SNP309 i lungcancer. Både vita och afro-amerikaner ingick i kohorten. Resultatanalyserna från forskargruppen visade en ökad risk för lungcancer med en SNP309 fördelning. En kombination mellan SNP309 och SNP285 visade ingen signifikant effekt. SNP285 kunde inte heller förknippas med någon risk för lungcancer (Ryan *et al.* 2012).

SNP 344T>A – Ursprungsfördelning och haplotyp status

SNP 344 ligger 35 baspar nedströms från SNP 309 (Figur 3). Första ursprungsidentifieringen av SNP 344T>A ägde rum när Bond *et al.* (2004) undersökte 50 friska personer. Efterföljande undersökningar gjordes av Knappskog *et al.* (2012) bland annat för att ta reda på hur potentiella effekter av SNP 344 påverkar cancerrisken hos populationer. Forskargruppen koncentrerade sig på inverkan på risken för äggstockscancer, bröstcancer, livmodercancer och prostatacancer. SNP 344 fördelningen jämfördes hos 2954 norska friska kontroller med äggstocks, bröst, endometrial och prostatacancerpatienter. 181 personer av 2954 friska norska kontroller observerades med SNP 344A-varianten. 180 individer var heterozygota (SNP 344T>A) och endast en individ var homozygot (SNP 344A>A) (Tabell 2). Forskarna observerade bland personer med SNP 309 (T/T) eller SNP 309 (T/G) även alternativformen SNP 344A. Det pekar på att SNP 309T-allelen innehåller SNP 344A, vilket bildar en SNP 309T/344A haplotyp ($p < 1 \times 10^{-10}$). I SNP 309G-allelen går det att hitta SNP 285C. Det här

indikerar att SNP 344A endast existerar i haplotypen SNP 285G/309T/344A. När det gäller afroamerikaner så visade det sig att 17 av 50 individer hade SNP 344A-varianten, 16 heterozygota och en homozygot. Förekomsten av SNP 344A var signifikant högre ($p < 0,001$) bland afroamerikaner än vita. När forskargruppen jämförde förekomsten av SNP344A bland cancerpatienter och friskpatienter fann man ingen signifikant skillnad. SNP 285G>C som endast påvisats bland vita befolkningen med SNP 344A, liknande SNP 309G tycks också vara närvarande bland afrikaner. Bland etniska grupper så varierar också fördelningen av variant allelerna SNP 309G och SNP 344A. Vi har även en variation i fördelningen av SNP 309G-allelen med 10 % hos afrikaner, 40 % hos vita och 50 % hos asiater. SNP 344A-allelen förekommer 18 % hos afrikaner men bara 3 % hos vita befolkningen. Med alla dessa skillnader i fördelning kan det vara motiverat att undersöka fler cancerformer där effekterna av SNP 344A klarläggs (Knappskog *et al.* 2012).



Figur 3. I *MDM2*-genen mellan exon 1 och 2 ligger promotorn, som innehåller SNP 285, SNP 309 och SNP 344. (Bild tagen från Knappskog *et al.* 2012, med upphovsrättsinnehavarens tillåtelse).

Tabell 2. Cancerpatienters och friska kontrollers fördelning av SNP 344 genotyp. Tabell reviderad från Knappskog *et al.* (2012).

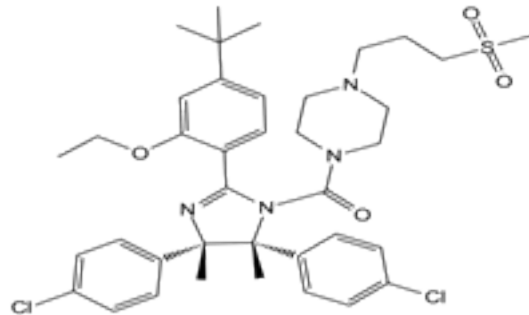
Kohort	Genotyp T/T	Genotyp T/A	Genotyp A/A	Total (n)
	(%)	(%)	(%)	
Äggstockscancer	(95,0)	(4,9)	(0,1)	1927
Bröstcancer	(94,8)	(5,0)	(0,2)	1271
Endometrialcancer	(94,4)	(5,4)	(0,2)	895
Prostatacancer	(92,7)	(7,2)	(0,1)	641
Friska kontroller	(93,9)	(6,1)	(0,0)	2954

Nutliner - Första generationens inhibitor RG7112

[(4S, 5R)-2-(4-tert-butyl-2-ethoxyphenyl)-4,5-bis(4-chlorophenyl)-4,5-dimethylimidazol-1-yl]-[4-(3-methylsulfonylpropyl)piperazin-1-yl]methanone

En terapeutisk strategi för behandling av cancer är att aktivera p53 i tumörer för behållandet av vildtyp p53-uttryck. Forskare har med flera tillvägagångssätt försökt hindra p53-MDM2 interaktion, till exempel med små peptider (Wasylyk *et al.* 1999), och MDM2 inhibitorer (Yang *et al.* 2005). Nutliner är småmolekylära hämmare av MDM2 (Ambrosini *et al.* 2006). Nutliner har utvecklats kliniskt i olika faser för selektivt hämma MDM2-p53 interaktion. Interaktionen mellan p53-MDM2 i normala celler fungerar som en ”feedback loop”. Transkriptionsaktiviteten hos p53 kommer att hämmas genom att MDM2 reglerar p53 negativt. Effekterna av behandling mot cancer med nutliner vilket resulterar i celledöd hos cancerceller, kan anses bero på deras potential att binda MDM2 och på så vis förhindra en interaktion med p53 (Lancu-Rubin *et al.* 2014). Framkallandet av cellcykelstopp och apoptos, har tydligt visat hur slagkraftiga antitumöraktiviteten är hos nutliner in vitro mot ett antal tumörer som uttrycker vildtyp-p53 (Kojima *et al.* 2005).

Nutlinfamiljens första kliniskt utvärderade molekyler är RG7112 (Figur 4). Flera kliniska fas I studier på antitumöraktivitet har utvärderats, resultatet visade ett dosberoende tumörinhibition och regression vid icke-toxiska koncentrationer när man gav oral tillförsel av RG7112 till möss med etablerade humana tumörxenotransplantat. RG7112 fungerar som en potent och selektiv antagonist av p53-MDM2 interaktion. Ytan på MDM2-proteinet där den binder till p53 kommer att blockeras av RG7112 genom att imitera aminosyragrupperna (Phe19, Trp23, och Leu26) vilket effektivt förhindrar MDM2-p53 interaktion. Vi kommer att få en blockering av cellcykelfaserna G1 och G2 samt framkallande av apoptos när man behandlar humana cancerceller av vildtyp p53 med RG7112, där det sedan leder till en stabilisering och ackumulering av p53. RG7112 har visats sig vara lättmottaglig för prekliniska leukemimodeller, där effekten blir en snabb framkallande av apoptos (Tovar *et al.* 2013).



Figur 4. Kemiska strukturen för molekylen RG7112,

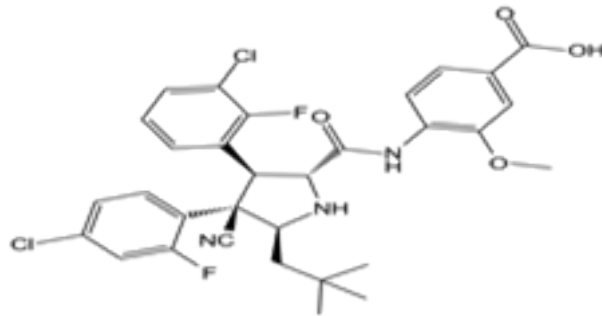
Nutliner i cancerceller som har behållit vildtyp p53, kan aktivera p53 vilket leder till cellcykelstopp och apoptos, men inte i celler där p53 är inaktiverad genom mutation. p53-mutanten är praktiskt taget okänslig för några aktiveringsmedel, på grund av att den är muterad i 50 % av alla humana tumörer. Detta gör det möjligt att i normala prolifererande vävnader utveckla och förbättra ett skyddande strategi, som inte inverkar på känsligheten hos tumörer med mutant p53. Genom att använda nutliner som p53-aktiveringsmedel i normala prolifererande celler, men inte i cancerceller med mutant p53 kunde Carvajal *et al.* (2005) visa framkallandet av G1-S och G2-M kontrollpunkter.

RG7388 andra generationens inhibitor av p53-MDM2

4-[[[(2R, 3S, 4R, 5S)-3-(3-chloro-2-fluorophenyl)-4-(4-chloro-2-fluorophenyl)-4-cyano-5-(2,2-dimethylpropyl)pyrrolidine-2-carbonyl]amino]-3-methoxybenzoic acid

I cancerceller är oftast p53 inaktiverad och leder till okontrollerad tillväxt.

Antagonisten och inhibitorn RG7388 motverkar p53-MDM2 interaktion och kan på så vis minska nivåerna av MDM2 samt återställa funktion av p53 som en tumörsuppressoren vilket leder till celcykelstopp eller apoptos i celler (Ding 2013, Andreeff 2016).



Figur 5. Kemiska strukturen för molekylen RG7388

Ett tillvägagångsätt som har ansetts vara attraktivt för cancerbehandling är när p53-MDM2 interaktionen hämmas, som sedan resulterar i ett återställande av p53-aktivitet. Utvecklandet av små molekylära inhibitorer har försvårats på grund av den hydrofoba protein-protein interaktionen. Den första p53-MDM2 inhibitorn som utvecklades kliniskt var RG7112, som sedan följdes upp av andra generationens inhibitor RG7388 (Ding *et al.* 2013). Närvaron av RG7388 kommer leda till en aktivering av nedströms transkriptions-målgener och ett ökat uttryck av p53. Nedbrytningen av p53 kommer att stoppas genom att hämma MDM2 för att binda till p53, vilket resulterar i ökade nivåer av p53 i både cytoplasman och i cellkärnan. Framkallandet av apoptotiska stressreaktioner sker med hjälp av efterföljande aktivering av nedströms transkriptions-målgener såsom p21. Föregående generations MDM2 hämmare har visats vara mindre potenta och har mindre förmåga att sprida sig än andra generationens MDM2-molekylära hämmare (RG7388). Genuttrycket av p53-transkriptionella mål i RG7388-behandlad och obehandlad neuroblastomceller analyserades av Lakoma *et al.* (2015) genom användning av två p53 vildtyp cellinjer av neuroblastom (NGP och SH-SY5Y). Både inre (p21 och GADD45) och yttre reaktionsvägarna (PUMA och BAX) samt cellarrest involverades när man fann att RG7388 signifikant uppreglerade mRNA uttryck av p53. I SH-SY5Y-cellinjen kunde forskargruppen visa hur RG7388 påverkade p21-nivåerna med en 26-faldig ökning, en 4-faldig ökning av GADD45, en 7-faldig ökning av PUMA, en 3-faldig ökning av BAX, och en 4-faldig ökning av DR5. Efter analys svaren kunde forskargruppen uppskatta proteinuttryck av p53, liksom nedströms mål p53 i neuroblastomcellinjer. p53-nivåerna i neuroblastomcellinjer ökade i samma takt som koncentrationerna av RG7388 ökade (Lakoma *et al.* 2015).

Diskussion

Sammanställningen av experimentdata som presenteras här stöder frågeställningen att SNP i tumörsuppressorn p53-reaktionsväg kan ligga till grund hur mottagliga individer blir för att utveckla cancer. Att bindningsaffiniteten ökar hos den transkriptionella aktivatorn Sp1 genom SNP 309 i promotorn av *MDM2*-genen vilket leder till höga nivåer av MDM2-RNA och protein, kunde påvisas från analyserna av cellodlingarna. MDM2 är en viktig negativ regulator av p53. Bond *et al.* (2004) visade att SNP 309 gav i genomsnitt 9 år tidigare debut av tumörer i både sporadiska och ärftliga cancer. Sammantaget kan man säga att affiniteten för transkriptionsaktivatorn Sp1 till promotorn för *MDM2*-genen ökar genom SNP 309, vilket leder till ökad transkription. Inhiberingen av p53 sker direkt efter ökade nivåer av MDM2, som sedan leder till en degradering av p53 i cellen. SNP 309 skildrande överuttryck av MDM2-nivåer kan avsevärt minskas genom att inhibera Sp1 med endera siRNA eller mithramycin A. Presentationen av olika experimenten visar på att om vi behandlar cancerpatienter homozygota för SNP 309 med mithramycin A, skulle det leda till en inhibering av transkriptionsfaktorn Sp1 som i sin tur hämmar MDM2-nivåerna och ökar chanserna för p53 att inleda en apoptotisk respons i samband med kemoterapeutiska läkemedel (Bond 2004, Wang 2014).

I minst två processer sköter MDM2-proteiner p53-regleringen. Transkriptionsaktiviteten av p53-proteinet hämmas genom interaktionen mellan MDM2 och p53, vilket leder till en blockering av transaktiveringsdomänen. MDM2 och ubiquitinligas hjälps åt för nedbrytningen av p53-proteiner. p53-reaktionsväg i cancerceller kommer att försämrats på grund av MDM2-förmedlad hämning, vilket resulterar i ökade nivåer av MDM2-proteiner (Arva *et al.* 2005).

Frågeställningen om att förhöjda nivåer av MDM2 i SNP 309 celler (G/G) leder till oförmåga för p53 att agera som en tumörsuppressorn vid DNA-skada, stöds genom dessa experiment. Forskarteamet kunde även visa att p53-nivåerna inte minskade ytterligare genom ökade nivåer av MDM2 i icke-stressade G/G-celler. En möjlig förklaring kan vara att MDM2-nivåerna inte är begränsade i icke-stressade G/G-celler och på så vis inte ha någon ytterligare effekt på p53-nivåer. Endast genom DNA-skada skulle göra MDM2 begränsad och leda till minskning av p53. Li-Fraumeni individer som har en mutation i en p53-allel kunde genom påverkan av SNP 309 påvisa tumörbildning. I genomsnitt sänktes tumörbildningen med 9 år hos Li-Fraumeni individer med närvaron av SNP 309. Närvaron av SNP 309 kunde även under en livstid hos dessa individer öka förekomsten av flera tumörer. En möjlig förklaring kan vara att Li-Fraumeni individer bara har en vildtyp p53-allel som leder till att mutationshastigheten ökar, sämre DNA reparationer och en förminskad förmåga att inleda apoptos i cellen. p53-genen fungerar som en tumörsuppressorn som begränsar hastigheten för utvecklandet för mutationer i flertalet cancertyper. 50 % av alla cancertyper så är p53 muterad. Muterad p53 leder till felaktig centrosomreplikering och kromosomavvikelser. Möjligheten för att få cancer i början av livet ökar genom en p53 mutation i könscellerna. Funktionen för p53 är inte bara att stoppa cellcykeln eller inducera apoptos vid DNA-skada, p53 kan även påverka hastigheten på celldelningen av celler. Alla tre förhållandena kan genom hämning av p53, påverka cellen för hur förekomsten av åldersspecifik cancer påskyndas hos individer (Bond *et al.* 2004).

Knappskog *et al* (2012) kunde visa hur affiniteten för transkriptionsfaktorn Sp1 förbättrades i närvaro av SNP 309G, samt hur haplotypen i kombination med SNP 285C/309G minskade Sp1 bindning. Effekterna av de olika polymorfismerna på *MDM2*-promotorn kommer att medföra i hur väl en individ är mottaglig för cancer (Knappskog *et al.* 2011). SNP 285C befinner sig på SNP 309G-allelen och SNP 344A befinner sig på SNP 309T-allelen. Det gick inte att finna några skillnader i fördelningen av SNP 344 hos friska individer samt cancerpatienter som lider av äggstockscancer, bröstcancer, livmoderhalscancer och prostatacancer (Knappskog *et al.* 2012).

Inhiberingen av MDM2-p53 interaktion med RG7112 som är medlem i nutlinfamiljen har visats i prekliniska studier ge lovande effekter mot cancer (Lancu-Rubin *et al.* 2014). Mutationer i DNA-bindande domän gör transkriptionsfaktorn p53 inaktiv. Förmågan att aktivera p53 har gått förlorat i hälften av alla humana tumörer (Carvajal *et al.* 2005). Patienter med tumörer som uttrycker vildtyp p53, kan alternativt behandlas med nutliner antingen som monoterapi eller som kombinationsterapi (Kojima 2005, Stuhmer 2005, Tovar 2005). Mutant p53 är i motsatt förhållande, motståndskraftiga mot nutlin-3a i tumörceller (Carvajal *et al.* 2005). Vilket medför en begränsning av den terapeutiska nyttan för MDM2-antagonister, till att bara gälla behandling av tumörer som är vildtyp för p53 (Ambrosini *et al.* 2006).

Tack

Jag vill tacka några personer som med sin återkoppling hjälpt mig med skrivandet av denna uppsats. Först och främst vill jag tacka min handledare Lage Cerenius som hjälpt mig under hela perioden. Ett stort tack även till Patrick Nylund Åslund, Klara Granlöf, Andreas Juleshaug, Mattias Bergsman, och Robert Kullman som har bidragit med konstruktiv kritik.

Referenser

- Alhopuro P, Ylisaukko-oja S, Koskinen W, Bono P, Arola J, Järvinen H, Mecklin J-P, Atula T, Kontio R, Mäkitie A, Suominen S, Leivo I, Vahteristo P, Aaltonen L-M, Aaltonen L. 2005. The MDM2 promoter polymorphism SNP309T->G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Medical Genetics* **42**: 694-698.
- Ambrosini G, Sambol E B, Carvajal D, Vassilev L T, Singer S, Schwartz G K. 2006. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* **26**: 3473-3481.
- Andreeff M, Kelly KR, Yee K, Assouline S, Strair R, Popplewell L, Bowen D, Martinelli G, Drummond MW, Vyas P, Kirschbaum M, Iyer SP, Ruvolo V, Gonzalez GM, Huang X, Chen G, Graves B, Blotner S, Bridge P, Jukofsky L, Middleton S, Reckner M, Zhi J, Nickols G, Kojima K. 2016. Result of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clinical Cancer Research* **22**: 868-876.
- Arva N, Gopen T, Talbott K, Campbell L, Chicas A, White D, Bond G, Levine A, Bargonetti J. 2005. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in *mdm2* SNP 309 homozygous cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 26776-26787.

- Blume S.W, Snyder R.C, Ray R, Thomas S, Koller C.A, Miller D.M. 1991. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* **88**: 1613-1621.
- Bond G, Hu W, Bond E, Robins H, Lutziker S, Arva N, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang S, Strong L, Lozano G, Levine A. 2004. A Single Nucleotide Polymorphism in the *MDM2* Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* **119**: 591-602.
- Bond G, Hu W, Levine AJ. 2005. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Current Cancer Drug Targets* **5**: 3-8.
- Bond G, Menin C, Bertorelle R, Alhopuro P, Aaltonen L, Levine A. 2006. MDM2 SNP 309 accelerates colorectal tumour formation in women. *Journal of Medical Genetics* **43**: 950-952.
- Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu B, Heimbrook D, Vassilev L. 2005. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Research* **65**: 1918-1924.
- Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao R, Kawabe T, Omata M. 2006. MDM2 promoter SNP 309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Clinical Cancer Research* **12**: 4867.
- Ding Q, Zhang Z, Liu J, Jiang N, Zhang J, Ross T, Chu X, Barkovitz D, Podlaski F, Janson C, Tovar C, Filipovic Z, Higgins B, Glenn K, Packman K, Vassilev L, Graves B. 2013. Discovery of RG7388, a Potent and Selective p53-MDM2 inhibitor in Clinical Development. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**: 5979-5983.
- Dumont P, Leu J, Pietra III A, George D, Murphy M. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics* **33**: 357-365.
- Garber J.E, Friend S.H, Strong L.C, Patenaude A.F, Juengst E.T, Reilly P.R, Correa P, Fraumeni J.F Jr, Frebourg T. 1992. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactive the p53. *Journal of The National Cancer Institute* **84**: 1156-1160.
- Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer H.D. 2002. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* **21**: 1485-1492.
- Harris S, Gil G, Robins H, Hu W, Hirshfield K, Bond E, Bond G, Levine A. 2005. Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis. *Proceedings of National Academy of Sciences of The United States of America* **102**: 16297-16302.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letter* **420**: 25-27.

- Hwang S.J, Lozano G, Amos C.I, Strong L.C. 2003. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. *The American Journal of Human Genetics* **72**: 975-983.
- Jones S.N, Hancock A.R, Vogel H, Donehower L.A, Bradley A. 1998. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **95**: 15608-15612.
- Jun J, Park H, Lee K, Choi E, Jang Sung, Kim J, Cha I, Kim S, Kam S, Kim H, Kang M, Jung H, Park Y. Combined effects of *p73* and *MDM2* polymorphisms on the risk of lung cancer. *Molecular Carcinogenesis* **46**: 100-105.
- Knappskog S, Björnslett M, Myklebust L, Huijts P, Vreeswijk M, Edvardsen H, Guo Y, Zhang X, Yang M, Ylisaukko-oja S, Alhopuro P, Arola J, Tollenaar R, Aspersen C, Seynaeve C, Staalesen V, Chrisanthar R, Lökkevik E, Salvesen H, Evans D, Newman W, Lin D, Aaltonen L, Børresen-Dale A, Tell G, Stoltenberg C, Romundstad P, Hveem K, Lillehaug J, Vatten L, Devilee P, Dörum A, Lønning P. 2011a. The *MDM2* promoter SNP 285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduce risk for breast and ovarian cancer in caucasians. *Cancer Cell* **19**: 273-282.
- Knappskog S, Gansmo L, Romundstad P, Björnslett M, Trovik J, Sommerfelt-Pettersen J, Lökkevik E, Tollenaar R, Seynaeve C, Devilee P, Salvesen H, Dörum A, Hveem K, Vatten L, Lønning P. 2012. *MDM2* promoter SNP344T>A (rs1196333) status does not affect cancer risk. *PLOS*. doi.org/10.1371/journal.pone.0036263.
- Knappskog S, Trovik J, Marcickiewicz J, Tingulastad S, Staff A, Romundstad P, Hveem K, Vatten L, Salvesen H, Lønning P. 2011a. SNP 285C modulates oestrogen receptor/Sp1 binding to the *MDM2* promoter and reduces the risk of endometrial but not prostatic cancer. *European Journal of Cancer* **48**: 1988-1996.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio I, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev L, Andreeff M. 2005. *MDM2* antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood Journal* **106**: 3150-3159.
- Kubbbutat M.H, Jones S.N, Vousden K.H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303.
- Lain S, Lane D. 2003. Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *European Journal of Cancer* **39**: 1053-1060.
- Lakoma A, Barbieri E, Agarwal S, Jackson J, Chen Z, Kim Y, McVay M, Shohet J M & Kim E S. 2015. The *MDM2* small-molecule inhibitor RG7388 leads to potent tumor inhibition in p53 wild-type neuroblastoma. *Cell Death Discovery*, doi 10.1038/cddiscovery.2015.26.
- Lancu-Rubin C, Mosoyan G, Glenn K, Gordon R, Nichols G, Hoffman R. 2014. Activation of p53 by the *MDM2* inhibitor RG7112 impairs thrombopoiesis. *Experimental Hematology* **42**: 137-145.

- Landers J.E, Cassel S.L, George D.L. 1997. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Research* **57**: 3562-3568.
- Li F.P, Strong L.C, Fraumeni J.F Jr, Nelson C.E, Kim D.H, Kassel J, Gryka M.A, Bischoff F.Z, Tainsky M.A. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**: 1233-1238.
- Li H, Zhang Y, Ströse A, Tedesco D, Gurova K, Selivanova G. 2014. Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **21**: 1493-1502.
- Lind H, Zienolddiny S, Ekström O, Skaug V, Haugen A. 2006. Association of a functional polymorphism in the promoter of the *MDM2* gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer* **119**: 718-721.
- Lu W, Lin J, Chen J. 2002. Expression of p14ARF overcomes tumor resistance to p53. *Cancer Research* **62**: 1305-1310.
- Lundgren K, Montes de Oca Luna R, McNeill Y.B, Emerick E.P, Spencer B, Barfield C.R, Lozano G, Rosenberg M.P, Finlay C.A. 1997. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes & Development* **11**: 714-725.
- Park H, Choi E, Kim E, Jang S, Han S, Lee K, Kang M, Park Y. 2006. *MDM2* 309T>G polymorphism and risk of lung cancer in a Korean population. *Elsevier* **54**: 19-24.
- Phelps M, Darley M, Primrose J.N, Blaydes J.P. 2003. p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells. *Cancer Research* **63**: 2616-2623.
- Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, McMahon M, Oren M, McCormick F. 2000. Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* **103**: 321-330.
- Ryan B, Calhoun K, Pine S, Bowman E, Robles A, Ambs S, Harris C. 2012. MDM2 SNP285 does not antagonize the effect of SNP309 in lung cancer. *International Journal of Cancer* **131**: 2710-2716.
- Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, Herrmann P, Gollasch H, Gerecke C, Theurich S, Cigliano L, Manz R, Daniel P, Bommert K, Vassilev L, Bargou R. 2005. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* **106**: 3609-3617.
- Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* **65**: 87-108.
- Tovar C, Graves B, Packman K, Filipovic Z, Higgins B, Xia M, Tardell C, Garrido R, Lee E, Kolinsky K, To K-H, Linn M, Podlaski F, Wovkulich P, Vu B, Vassilev L. 2013. MDM2

small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumor in preclinical cancer models. *Cancer Research* **73**: 2587.

Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao X, Vu B, Qing W, Packman K, Myklebost O, Heimbrook D, Vassilev L. 2005. Small-molecule MDM2 antagonist reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **103**: 1888-1893.

Wang W, Du M, Gu D, Zhu L, Chu H, Tong N, Zhang Z, Xu Z, Wang M. 2014. MDM2 SNP309 polymorphism is associated with colorectal cancer risk. *Nature*, doi 10.1038/srep04851.

Wasylyk C, Salvi R, Argentini M, Dureuil C, Delumeau I, Abecassis J, Debussche L, Wasylyk B. 1999. p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53. *Oncogene* **18**: 1921-1934.

Wilkening S, Bermejo J, Hemminki K. 2007. MDM2 SNP 309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* **28**: 2262-2267.

Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV, Safiran Y, Oberoi P, Kenten J, Phillips A, Weissman A. 2005. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* **7**: 547-559.

Young Y, Hye C, Sang A, Ja K, Yong P, Dae K, Jun P, Sung M, Do K, Chae C, Kwang-Hyub H. 2008. *MDM2* and *p53* polymorphism are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis* **29**: 1192-1196.

Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y, Oren M. 1995. A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human *mdm2* gene. *Nucleic Acids Research* **23**: 2584-2592.

Zhang X, Miao X, Guo Y, Tan W, Zhou Y, Sun T, Wang Y, Lin D. 2005. Genetic polymorphism in cell cycle regulatory genes *MDM2* and *TP53* are associated with susceptibility to lung cancer. *Molecular Carcinogenesis* **27**: 110-117.

Etisk bilaga

Human tumörbildning via nukleotidförändringar i *MDM2*-promotorn

Alexander Sokyazian

Självständigt arbete i biologi 2016

Forskningsetik

Studien har tittat på hur nukleotid förändringar i *MDM2*-promotorn minskar funktionen för p53 att agera som en tumörsuppressorgen. Konsekvensen av förändringen blir att vi ökar möjligheten för att bilda tumörer i människokroppen. Studien visar exempelvis i olika experiment förhållandet mellan Single nucleotide polymorphism (SNP 309) och ökade nivåer av MDM2-protein. MDM2 binder till p53 tumörsuppressorgen och inleder en nedbrytningsprocess av p53. Cancerpatienter homozygota för SNP 309 behandlades med mithramycin A, vilket påbörjade en inhibering av transkriptionsfaktorn Sp1 som i sin tur hämmar MDM2-nivåerna och ökar chanserna för p53 att inleda en apoptotisk respons (Bond et al. 2004).

Alla mina källor som jag har använt, har varit vetenskapligt granskade och hämtade från web of science. Min strävan har alltid varit att förmedla en så opartisk rapport som möjligt. Jag har inte fabricerat eller förfalskat data, studierna på resultaten har varit ärligt rapporterade. Alla bilder i uppsatsen har använts med upphovsrättsinnehavarens tillstånd. Man ska alltid så långt som möjligt minimera skadorna samt riskerna och maximera fördelarna när man forskar på människor. De är även viktigt att respektera människans integritet.

Ur ett forskningsetiskt perspektiv har man genom tillämpad forskning i denna studie inte tagit upp hur friska personer, cancerpatienter, eller djur behandlades före, under och efter undersökningarna. Smärtan för människor och djur måste balanseras mot ändamålet oavsett vilket strävan det än gäller. Att bedriva cancerforskning är ett viktigt steg för att mildra smärtan för människor och djur, kan man göra det med strikt kontrollerade djurförsök så är det motiverat. Resultaten från de olika experimenten och metoderna beskriver hur man gjort, men en redogörelse för det etiska perspektivet saknas. Det mesta av experimenten gjordes på härledda cancerceller från sjuka personer och djur. För att inte djuren ska lida i onödan kan man kontrollera storleken på tumörer hos försöksdjuren, på så vis avhjälpa ihållande smärtan. För att minska användandet av djurförsök har forskare nu börjat ta fram nya dataprogram för simulering av olika organ i människokroppen, där resultaten kommer att optimera behandlingen av patienterna i framtiden och spara lidande och liv.

Referenser

Bond G, Hu W, Bond E, Robins H, Lutziker S, Arva N, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang S, Strong L, Lozano G, Levine A. 2004. A Single Nucleotide Polymorphism in the *MDM2* Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* **119**: 591-602.