

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tumor supresorski gen p53

p53 tumor suppresor gene

SEMINARSKI RAD

Kristijan Pažur
Preddiplomski studij molekularne biologije
Mentor: doc.dr.sc. Inga Marijanovi

Zagreb, 2011.

SADRŽAJ:

1.Uvod.....	3
2.Put aktivacije i izvršni mehanizmi gena p53.....	5
2.1.Aktivacija p53 puta.....	6
2.2.Molekularni mehanizam djelovanja p53 puta.....	8
2.2.1.Inhibicija stani nog ciklusa.....	8
2.2.2.Apoptoza	9
2.2.3.Angiogeneza.....	9
2.2.4Popravak DNA.....	10
3.Struktura p53 gena.....	11
4.Nastanak p53 gena i evolucijska povezanost sa p63 i p73.....	14
5.Gen p53 i fertilitet.....	16
6.Mutacije u p53 genu i nastanak tumora.....	17
7.Zaključak	18
8.Literatura.....	18
9.Sažetak.....	19
10.Summary	20

1. UVOD

Tumor (lat. *tumor* - oteklina) patološka je tvorba nastala kao posljedica prekomjernog umnažanja abnormalnih stanica. Rast novotvorine nadmašuje rast normalnih tkiva, biološki je nesvrhovit, nepravilan i neorganiziran te ne prestaje uklanjanjem uzroka te promjene. U osnovi, novotvorine nastaju kad se izgubi normalna fiziološka regulacija kontrolnih mehanizama rasta stanice. Novonastale stanice se od polaznih stanica razlikuju i strukturno i funkcionalno, ali se u većini slučajeva može prepoznati od koje vrste stanica ili tkiva je nastao tumor.

Novotvorine mogu biti zloćudne (maligne) i dobroćudne (benigne). Razlika između njih je u agresivnosti rasta, te u tome što maligni daju metastaze i šire se u okolinu, infiltriraju i se u okolno tkivo, dok benigni tumori ne daju metastaze na druge organe i ne infiltriraju se u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno. Zloćudni oblik naziva se i rak (lat. *cancer – rak, rana*). Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da invadira i razara okolno tkivo i da stvara udaljene metastaze u organizmu te kao posljedica nastupa smrt (Pecorino 2008).

Uzrok najvećeg broja tumora nije poznat. Ipak, za određene faktore se danas pouzdano zna da su uzročnici stvaranja tumora, a to su pušenje, UV zračenje te određeni virusi. Sam proces nastanka tumora događa se već na molekularnoj razini, tj. poremećaji kontrolnih bjelancevina imaju svoju podlogu u oštećenjima gena koji te proteine i stvaraju. Oštećenje gena može nastati na dva načina:

1. kao posljedica vanjskih kancerogenih faktora (kemijski, fizikalni, mehanički, virusni agensi)
2. kao posljedica spontanih mutacija u organizmu.

Nastanak tumora se ne događa u jednom točno određenom trenutku ili u kratkom vremenskom razdoblju. To je proces koji se sastoji od niza promjena na genotipskoj i na fenotipskoj razini. Taj niz promjena koji vodi od zdravog stanja stanice do pojave tumora najčešće traje mjesecima i godinama. Za to vrijeme se nagomilavaju razne mutacije gena odgovorne za reprodukciju i regulaciju rasta same stanice. Skupine odgovornih gena za regulaciju rasta su:

- 1) onkogeni

- 2) tumorski supresorski geni
- 3) geni za provjeravanje i popravak DNA

Tumorska masa je dinamična i vrlo heterogena populacija stanica zbog neprestanog dijeljenja, nestabilnosti genoma tumorskih stanica i selekcijskog pritiska okoliša.

Onkogeni su geni koji snažno aktiviraju diobu stanica. Na primjer jedan od onkogeni proizvodi povećanu količinu faktora rasta koji stimulira neograničen rast stanica.

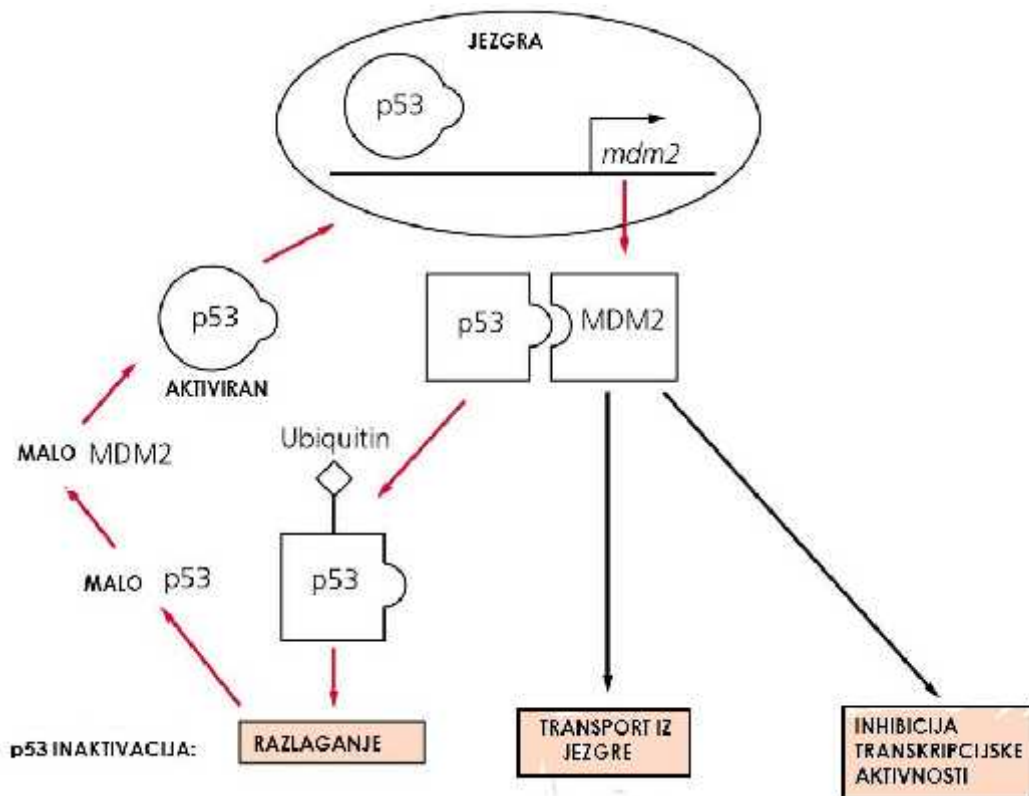
Geni za provjeravanje i popravak DNA su važna linija obrane u borbi protiv nastanka tumora. Ako se mutacije u DNA ne poprave prije replikacije one mogu pridonijeti nastanku tumora. Popravak različitih tipova oštećenja odvija se različitim mehanizmima (NER,BER,MMR...).

Geni odgovorni za prirodnu zaštitu od tumora zovu se tumor supresorski geni. Kada su mutirani do te mjere da im je poremećena funkcija, stanica posjeduje velik potencijal da se transformira u tumorsku stanicu. Tumor supresorski geni, odnosno proteini koje kodiraju djeluju na način da zaustavljaju stanični ciklus ili promoviraju apoptozu (Pecorino 2008).

2. PUT AKTIVACIJE I IZVRŠNI MEHANIZMI GENA p53

Gen p53 je bio prvi otkriveni tumor supresorski gen. Smatra se da je i jedan od najvažnijih zbog čega je dobio naziv "čuvar genoma". U većini slučajeva kod ljudi do tumorskih oboljenja dolazi zbog promjene u genu p53. Uz ulogu da štiti organizam od nastanka tumora također sudjeluje i u obrani stanice od reaktivnih kisikovih radikala (ROS) tako što aktivira gene za proizvodnju antioksidansa kao npr glutationa. Na taj način i neizravno pomaže u borbi protiv mutacija a u konačnici i tumora (Ruddon 2007).

U normalnim uvjetima u stanici količina p53 je niska. Njegova se koncentracija a time i aktivnost regulira na razini degradacije proteina a ne na razini ekspresije p53 gena. MDM2 protein je E3 ubikvitin ligaza i glavni je regulator p53 aktivnosti (Slika 1). Ubikvitin ligaze su enzimi koji dodaju mali protein ubikvitin na ciljani protein i tako ga označavaju i predodređuju za degradaciju pomoću proteasoma. Uz to MDM2 modificira aktivnost p53 na način da se veže i inhibira transaktivacijsku domenu na N terminalnom kraju i prenosi ga iz jezgre u citoplazmu gdje može biti razgrađen. MDM2 je negativni regulator koji potiče degradaciju p53; istovremeno p53 potiče nastajanje MDM2 enzima. Na taj se način uspostavlja negativna povratna sprega između p53 i njegovog regulatora. Malena količina p53 u stanici daje malu količinu MDM2 enzima što će pak rezultirati povećanjem aktivnosti p53 proteina. Povećana aktivnost p53 povećat će količinu MDM2 koji će potaknuti degradaciju p53 te smanjiti njegovu količinu čime se zatvara regulacijska petlja (Pecorino 2008).



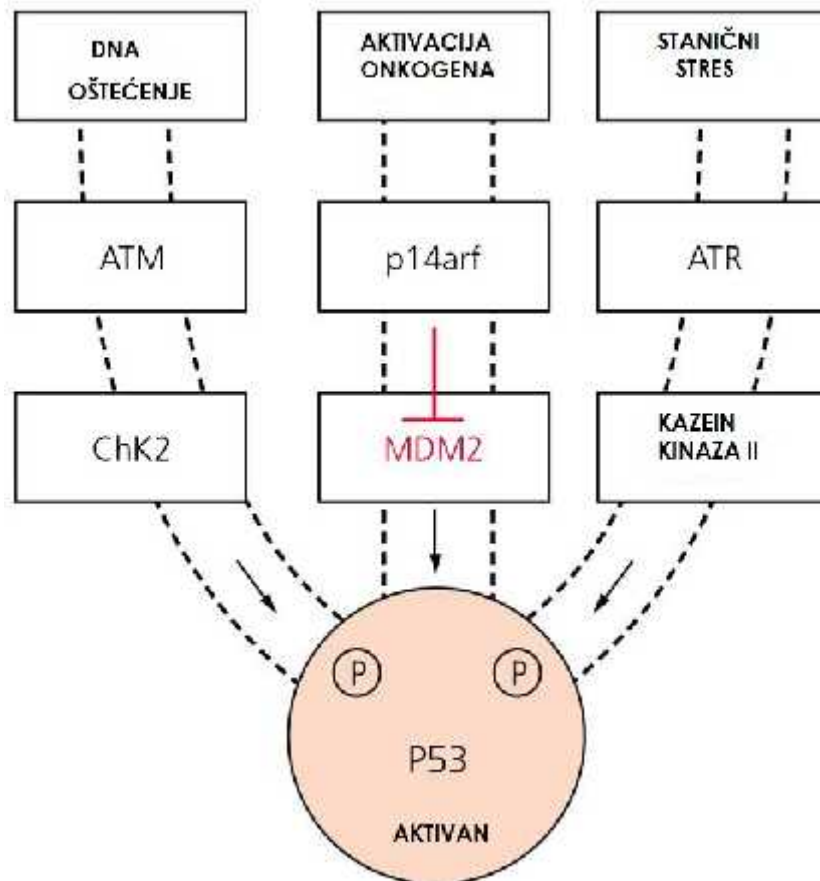
Slika 1. Regulacija aktivnosti p53 proteina pomoću MDM2 (Pecorino 2008).

2.1. Aktivacija p53 puta

Aktivacija p53 puta može se postići i različitim stresnim uvjetima kao što su oštećenja DNA (zračenje, kemijskim agensima...), aktivacija onkogena, hipoksija ili niska koncentracija ribonukleotida (Slika 2.). Svi ti uvjeti mogu potaknuti nastanak tumora. Oni se detektiraju pomoću posebnih staničnih proteina, od kojih su mnogi kinaze, koji prenose signal fosforilacijom do p53 proteina. Glavna značajka aktivacije p53 puta je onemogućavanje p53-MDM2 interakcije. To dovodi do produljenja vremena poluraspada p53 te do nakupljanja p53 u stanici. Također dolazi i do konformacijske promjene u p53 te se on aktivira kao transkripcijski regulator u tim stanicama. Ključni događaj koji dovodi do aktivacije p53 je fosforilacija N-terminalne domene. N-terminalna domena sadrži velik broj fosforilacijskih mjesta te je ona glavni substrat za protein kinaze koje prenose signal. Postoje 3 glavna mehanizma signalizacije staničnog stresa.

Oštećenje DNA nastalo zračenjem se signalizira pomoću dvije proteinske kinaze. Prva kinaza ATM, aktivirana dvolančanim DNA lomovima, fosforilira i tako aktivira drugu kinazu Chk2.

Tada obje kinaze ATM i Chk2 fosforiliraju N terminalni kraj p53 proteina te tako onemogu uju vezanje MDM2 enzima.



Slika 2. Aktivacija p53 puta. p53 se fosforilira te se tako onemogu uje interakcija sa MDM2 (Pecorino 2008).

Drugi molekularni mehanizam koji signalizira stani ni stres i aktivira p53 put tako er se sastoji od dvije kinaze: ATR i kazein kinaze 2. One tako er fosforiliraju p53 i onemogu uju interakciju sa MDM2 (Pecorino 2008).

Aktivirani onkogeni kao npr Ras induciraju aktivnost proteina p14arf, tako er modulatora p53-MDM2 kompleksa. P14arf je jedan od translacijskih produkata INK4a/CDKN2A gena. P14arf se ne veže na p53-MDM2 kompleks i ne utje e na interakciju ve kontrolira razlaganje MDM2.

Sva 3 puta aktivacije blokiraju degradaciju p53 uzrokovanu interakcijom sa MDM2. Fosforilacija N-terminalnog kraja pomoću gore navedenih protein kinaza ometa interakciju s MDM2. Tada se na p53 vežu ostali proteini, kao što su Pin 1 i izazivaju konformacijske promjene u p53 te tako još snažnije sprječavaju vezanje sa MDM2. Fosforilacija također omogućuje vezanje transkripcijskih koaktivatora kao što su P300 i PCAF, koji onda acetiliraju karboksilni kraj p53, izlažu DNA vezuju u domenu p53, omogućuju i mu da aktivira ili utiša određeni gen. Deacetilirajući enzimi, kao što su Sirt1 i Sirt7, mogu deacetilirati p53, što dovodi do inhibicije djelovanja p53 (Pecorino 2008).

2.2. Molekularni mehanizam djelovanja p53 puta

Glavni mehanizam pomoću kojeg p53 djeluje kao tumor supresor je indukcija ekspresije gena odgovornih za inhibiciju staničnog ciklusa, gena koji potiču apoptozu, zaustavljaju angiogenezu ili su odgovorni za popravak DNA (Slika 3.) (Pecorino 2008).

2.2.1. Inhibicija staničnog ciklusa

Jedna od glavnih funkcija p53 je zaustavljanje staničnog ciklusa ako je u stanici prisutno oštećenje DNA. Takva stanica ima priliku popraviti oštećenje prije novog ciklusa replikacije te se na taj način sprečava da se oštećena DNA prenosi na stanice kćeri. Molekularni mehanizam odgovora na taj stanični odgovor uključuje transkripcijsku indukciju p21 gena. Njegov produkt, protein p21 se veže na ciklin-CDK kompleks pomoću ZRXL motiva. Prekomjerna ekspresija p21 zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi blokirajući ciklin E/CDK2 posredovanu fosforilaciju Rb i otpuštanje E2F koji inducira ekspresiju gena potrebnih za ulazak u S fazu staničnog ciklusa. p21 također veže PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) koji ima važnu ulogu u sintezi i popravku DNA na način da inhibira PCNA-ovu aktivnost u replikaciji ali ne i u popravku DNA. p53 također zaustavlja stanični ciklus u G2 fazi. On povećava ekspresiju Gadd45 (engl. *growth arrest and DNA –damage-inducible protein 45*) i 14-3-3 σ gena. Gadd45 se veže na CDC2 i onemogućava stvaranje ciklin B/CDC2 kompleksa te tako sprječava kinaznu aktivnost. Protein 14-3-3 σ prenosi ciklinB/CDC2 kompleks iz jezgre u citoplazmu te tako ga odvaja od ciljanih proteina i zaustavlja stanični ciklus u G2 fazi (Pecorino 2008).

2.2.2. Apoptoza

p53 direktno kontrolira ekspresiju nekoliko medijatora apoptoze koji su uključeni u unutarnji i vanjski put aktivacije. Oni geni koji kodiraju proteine koji promoviraju apoptozu se induciraju dok oni geni koji kodiraju proteine koji zaustavljaju apoptozu se utišavaju. Induciraju se mitohondijski pro-apoptotski proteini NOXA, PUMA i p53PIP1, koji uzrokuju otpuštanje citokroma c i aktiviraju Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor – 1*) koji tada aktivira prokaspazu 9 koja tvori proteinski kompleks apoptosom. Kao transkripcijski faktor, p53 inducira ekspresiju gena koji kodiraju za “receptore smrti” i pro-apoptotske proteine iz Bcl-2 obitelji kao što su Fas receptor, Bax i Bak. Ovi geni posjeduju p53 vezno mjesto u svojim promotorskim regijama. Fas receptor je transmembranski receptor koji prima vanstanični signal za pokretanje apoptoze. p53 također blokira ekspresiju anti-apoptotskih proteina Bcl-2, Bcl-x i IAP. Apoptoza se također može potaknuti ako se blokira signal za preživljavanje. p53 inducira nastanak IGF-BP3 (engl. *insulin-like growth factor-binding protein 3*) koji blokira signal izmeđ u IGF-1 i njegovog receptora. Ovi različiti načini aktivacije apoptoze osiguravaju dovoljan broj i jačinu signala za potpunu aktivaciju izvršnih kaspaza koje će prema unaprijed programiranom uzorku razgraditi stanicu (Rodier 2007, Pecorino 2008).

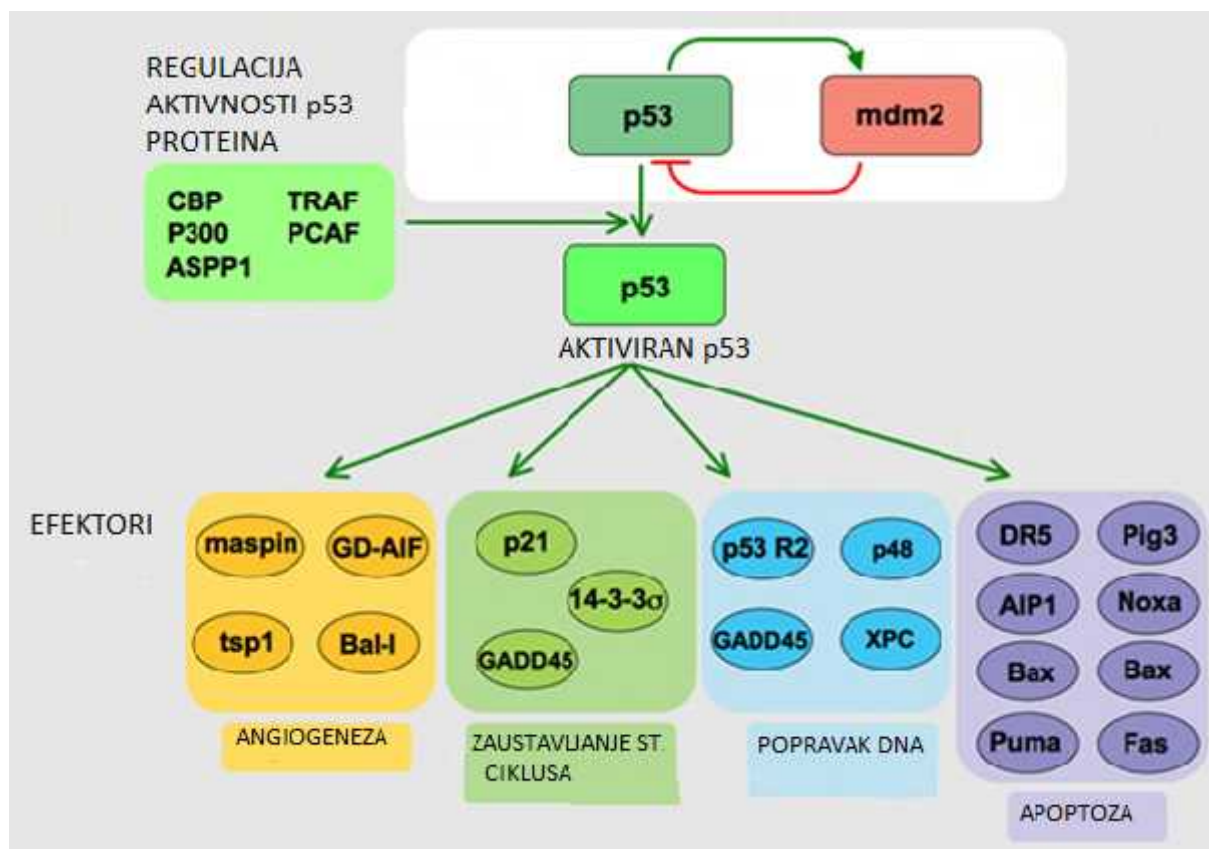
2.2.3. Angiogeneza

Rast tumora ovisan je o sposobnosti tumora da inducira rast krvnih žila i osigura dovoljnu količinu hranjivih tvari i kisika. Tumorska angiogeneza uključuje zamršen međ u odnos tumora i okolnih stanica, kao što su endotelne stanice pridružene tumoru, glatke mišićne stanice, Rouget-ove stanice, fibroblasti i makrofagi. Za vrijeme tumorske angiogeneze aktiviraju se endotelne stanice te dolazi do njihove proliferacije i interakcije sa ostalim stanicama koje pomažu u nastanku novih krvnih žila (Pecorino 2008).

p53 svojom aktivnošću sprječava angiogenezu na način da aktivira transkripciju inhibitora angiogeneze, trombosponina-1. On je glikoprotein staničnog matriksa sa više aktivnih domena koji je prirodni inhibitor angiogeneze i tumorigeneze. Ima mogućnost interakcije sa 10-ak staničnih adhezijskih receptora poput CD36, β 1 integrinima, CD47 i različitim proteazama poput elastaze, katepsina i trombina (Wu 2008).

2.2.4. Popravak DNA

p53 je uključen u popravak DNA kao transkripcijski regulator važnih gena potrebnih u tom procesu. U NER popravku (engl. *nucleotide excision repair*) p53 se veže na promotor XPC gena i tako potiče njegovu indukciju (Pecorino 2008).

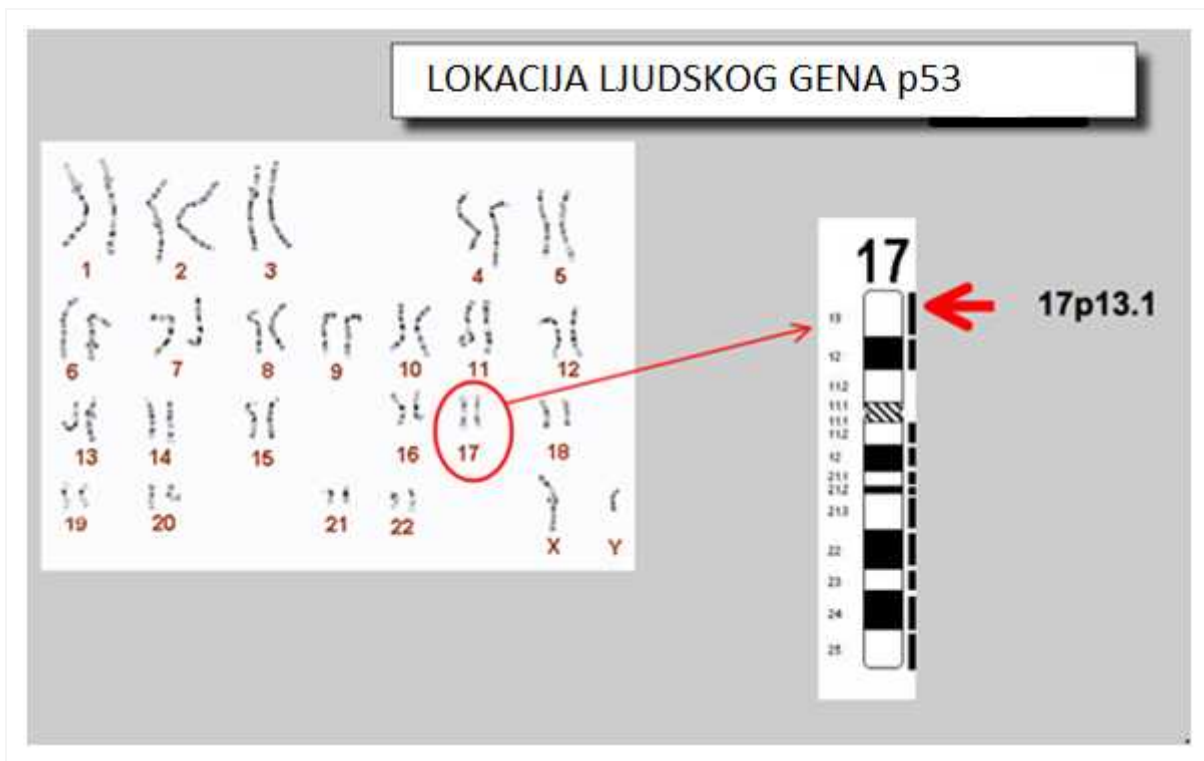


Slika 3. Izvršni mehanizmi p53 puta uključuju inhibiciju stani nog ciklusa, popravak DNA aktiviranje apoptoze i zaustavljanje angiogeneze.

(http://www.p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)

3. STRUKTURA PROTEINA p53

Ljudski p53 je nuklearni fosfoprotein od 53 kDa, kodiran sa 20 Kb gena koji sadži 11 exon a i 10 introna a nalaze se na kra em kraju kromosoma 17 (Slika 4.). Ovaj gen pripada visoko konzerviranoj obitelji gena koja sadži još najmanje dva lana, p63 i p73. Divlji tip p53 proteina sadži 393 aminokiseline i sastoji se od nekoliko strukturnih i funkcionalnih podru ja: na N-terminalnom kraju nalazi se transaktivacijsko podru je ili TAD domena (engl. *transcription activation domain*) (aminokiseline 1 - 67), regija bogata prolinom (aminokiseline 67 – 98), centralna domena (aminokiseline 98 - 303), regija koja sadži jezgrin lokalizacijski signal (aminokiseline 303 – 323), oligomerizacijska domena (aminokiseline 323 – 363) i C-terminalna bazi na domena (aminokiseline 363 – 393) (Slika 5). Struktura proteina p53 je visoko o uvana kod viših eukariota.



Slika 4. Ljudski gen p53 nalazi se na kra em kraju kromosoma 17
(http://www.p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html)

U otopini p53 tvori tetramere za koje se smatra da su prevladavaju i oblik *in vivo* i *in vitro*. Za razliku od proteina ija struktura je povezana sa jednom specijaliziranom funkcijom, p53

se razvio na na in da obavlja razli ite funkcije. To mu omogu uje jedinstvena i fleksibilna kvartarna struktura (Okorokov 2009).

N-terminalna regija sastoji se od dvije grani ne TAD domene, TAD I i TAD II i susjedne prolinom bogate regije. Amino terminalna domena je potrebna za transaktivaciju i interakciju s razli itim faktorima, uklju uju i i acetiltransferaze i MDM2.

Prolinom bogata regija s više kopija PXXP niza (aminokiseline 67 – 98, gdje je X bilo koja aminokiselina), imaju važnu ulogu u apoptozi i stabilnosti p53 te regulaciji pomo u MDM2. p53 postaje osjetljiv na degradaciju MDM2-om ako je to podru je deletirano.

p53 je transkripcijski faktor te se on veže blizu promotora odre enih gena. Središnja regija ovog proteina tvori DNA veznu domenu koja omogu uje vezanje na specifi na mjesta u DNA molekuli. Slijed sadrži dvije kopije od 10 parova baza 5'Pu Pu Pu C (A/T) (T/A) G Py Py Py 3', koje su odvojene sa do 13 parova baza. Odre eni geni mogu sadržavati i više od jednog mjesta prepoznavanja. Središnja domena ima prili no stabilnu sekundarnu strukturu koja je povoljna za kristalografske analize. Središnja domena slaže se u konformaciji dviju antiparalelnih naboranih plo a koje koordiniraju dvije petlje te omogu uju interakciju sa DNA. Petlje su stabilizirane pomo u Zn^{2+} iona i tvore petlja – naborana plo a – zavojnica motiv. Mutacije u središnjoj domeni imaju zna ajan u inak na aktivnost p53 proteina, one dovode do gubitka funkcije kao transkripcijskog faktora.

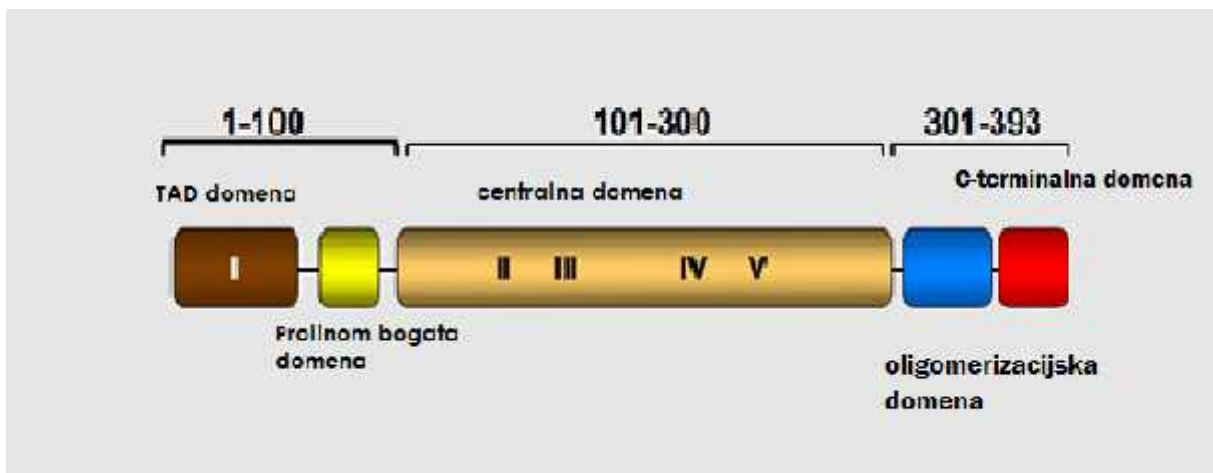
Aminokiselinski ostaci od 17 do 23 i od 37 do 57 u interakciji sa MDM2 i RPA70 proteinom tvore zavojnicu dok bez proteina ne posjeduju dobro definiranu strukturu, odnosno ponašaju se kao „molekularni kameleon“. Ta domena mijenja svoju strukturu ovisno o okolini u kojoj se nalazi.

Oligomerizacijsku domenu tvore aminokiselinski ostaci od 323 do 363. Kada je p53 analiziran kao monomer ova regija se sastojala od zavojnice i plo e povezane sa oštrom petljom. Taj se motiv povezuje sa još 3 motiva na na in da antiparalelne zavojnice zajedno drže hidrofobnim interakcijama. Uklanjanjem važnih hidrofobnih grupa sa zavojnice mijenja se stupanj oligomerizacije sa tetramera na dimere.

C-terminalna bazi na domena posjeduje helikalnu strukturu kada je na nju vezan Ca^{2+} ion. Ona tako er kao i N-terminalna regija mijenja konformaciju ovisno o okruženju u kojem se nalazi. Za razliku od uobi ajenih transkripcijskih faktora p53 odnosno njegov C-terminalni

kraj ima sposobnost vezanja nespecifi nih sljedova DNA kao npr. mjesta krivo sparenih baza, mjesta jednostrukih i dvostrukih DNA lomova te Holliday-ove strukture.

Tako er C-terminalna domena je odgovorna za za efikasnost proteina p53 kao transkripcijskog faktora. Zahvaljuju i posttranslacijskoj doradi i interakciji sa drugim proteinima primije ena je razli ita stabilnost DNA-p53 kompleksa, što je navelo znanstvenike na misao da postoji interakcija izme u središnje domene i C-terminalne domene p53 proteina. Na koji na in to no i koje aktivne skupine sudjeluju u tim interakcijama mora se još istražiti (Okorokov 2009).



Slika 5. Ljudski p53 protein, podijeljen na 5 funkcionalnih i strukturnih domena (http://www.p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)

4. NASTANAK GENA p53 I EVOLUCIJSKA POVEZANOST SA p63 I p73

Evolucija porodice gena p53 trajala je preko milijardu godina. Prve pokazatelje o postanku pretka današnje porodice gena vidimo u danas živu im potomcima jednostani njih hoanoflagelata, dok najprimitivniji organizmi sa pouzdanom funkcijom p53 porodicom gena jesu žarnjaci (*Nematostella vectensis*), vinske mušice (*Drosophila*) i obil i (*Caenorhabditis*). Kod žarnjaka prisutan je hibrid p63/p73 gena koji uzrokuje apoptozu gameta ija je DNA ošte ena UV svjetlom. Žarnjaci su me u prvim višestani nim životinjama koje imaju razli ite tipove stanica i imaju odvojenu proizvodnju gameta od somatskih stanica te razvijen p63/p73 hibridni gen koji kontrolira ispravnost genoma zametne linije. Tako er kod odraslih mušica genski produkt p63/p73 hibridnog gena (zvan dmp53) služi kao induktor apoptoze u gametama ija je DNA ošte ena UV svjetlom. Protein p63/p73 je transkripcijski faktor koji se veže na DNA sljedove sli ne sljedovima na koje se veže ljudski p53, p63 i p73 protein te aktivira „reaper“ i „sickle“ gene koji iniciraju apoptozu. Tijekom razvoja mušica, dok se stanice aktivno dijele, nedostatak dmp53-a uzrokuje genomsku nestabilnost te razvoj nepravilnih embrija (Belyi 2010).

Kod obli a *Caenorhabditis elegans* p63/p73 hibridni gen (zvan CEP-1) tako er ima važnu ulogu u razvoju i u o uvanju stabilnosti gametske linije. CEP-1 aktivira apoptozu u gametama pri uvjetima hipoksije, DNA ošte enja ili gladi. Negativno je reguliran pomo u serin/treonin protein kinaze AKT-1 i tirozin kinaze ABL-1 (negativni regulator MDM2 nije prisutan). Tako je p63/p73 hibridni gen integriran sa metaboli kim putem glukoze, reproduktivnom aktivnoš u, dostupnoš u kisika i stabilnoš u genoma. Tu po prvi puta možemo uo iti interakciju izme u dostupnosti hrane u okolišu, kontrole reprodukcijskog ciklusa te odgovora na razli ite stresne signale koje mogu narušiti stabilnost genoma. Ta se integracija odvija zbog me udjelovanja p63/p73 odgovora na stres i IGF-1 (engl. *insulin-like growth factor*) puta djelovanja.

Pojavom kralješnjaka razvila se potpuno nova konstitucija tijela. Za razliku od mušica i obli a ije su odrasle jedinke u postmitotskom stanju, sa iznimkom proizvodnje gameta, kralješnjaci su razvili somatske mati ne stanice koje obnavljaju tkiva i organe tijekom života. Razvitkom mati nih stanica dolazi do duplikacije p63/p73 hibridnog prageni i nastaje p53 gen koji uva integritet somatskih mati nih stanica, zaustavljaju i diobu ošte ene DNA te tako sprje ava mogu nost nastanka tumorskih stanica. To je samo nastavak kontrole koji je gen p63/73 imao

nad razvojem gameta kod žarnjaka, oblika i mušica. p53 i njegova tumor supresorska aktivnost pojavila se kod najranijih kralješnjaka kada su se neke somatske stanice počele dijeliti.

Pojavom riba koštunjača, vodozemaca, gmazova, sisavaca i ptica p63 i p73 geni su se razdvojili te su bili podvrgnuti selekcijskom pritisku kako bi preuzeli određene uloge u razvoju organizma. p63 sudjeluje u nastajanju epitela, prostate, mliječnih žlijezda i udova a p73 sudjeluje u kontroli razvoja neurona i imunoloških stanica. U isto vrijeme p63 i p73 su zadržali svoju ulogu u očuvanju integriteta i regulaciji nastanka gameta. Nedugo nakon njihovog razdvajanja dogodila se insercija u intronske sljedove gena p63 što mu je drastično promijenilo veličinu. Veličina p63 kod riba koštunjača je otprilike 25 kb, dok kod ljudi iznosi 265 kb. To povećanje gena povećalo je frekvenciju rekombinacije što dovodi do povećanja broja haplotipova u populaciji (Belyi 2010, Zorić 2010).

5. GEN p53 I FERTILITET

U reprodukciji sisavaca gen p53 ima važnu ulogu. Gubitak istoga kod miševa, a posebno ženki, izaziva značajan gubitak fertilnosti (Hu 2009).

p53 regulira reprodukciju kontrolirajući i implantaciju zametka. To mu omogućuje njegova sposobnost da kontrolira rad drugih gena, u ovom slučaju gena LIF (engl. *leukemia inhibitory factor*). LIF je multifunkcionalni citokin koji ima veliku važnost u implantaciji blastule. Implantacija je važan stupanj u razvoju sisavaca u kojem blastula stupa u interakciju sa tkivom maternice, što dovodi do nastanka posteljice preko koje se vrši izmjena hranjivih tvari, kisika i hormona koji su važni za razvoj embrija. Kod mnogih vrsta sisavaca, uključujući i miša i ovjeka, naglo povećanje ekspresije LIF gena u maternici, koji je reguliran p53 genom i koncentracijom estrogena, podudara se sa implantacijom. LIF ima visoku ekspresiju u žlijezdama endometrija te se LIF protein nalazi u lumen maternice. Tamo se veže na receptore koji se nalaze na stanicama epitela i tako priprema maternicu za implantaciju blastule. Miševi s defektnim LIF genom imaju onemogućenu reprodukciju, zbog nemogućnosti implantacije blastule. Taj problem moguće je bilo riješiti unošenjem LIF-a 4.-tog dana od oplodnje kod miša. Također i mutanti miša s defektnim genom p53 su imali smanjenu stopu reprodukcije (Hu 2009).

6. MUTACIJE U GENU p53 I NASTANAK TUMORA

Gen p53 je jedan od najčešće inaktiviranih gena u tumorskoj stanici. Nekontrolirano poticanje proliferacije stanica dovodi do replikacijskog stresa, dvostrukih lomova DNA, genomske nestabilnosti, aktiviranje kontrolne točke oštećene DNA, a u konačnici do p53-ovisne apoptoze. p53-ovisna apoptoza suzbija širenje predkancerogene lezije (p53 tumor supresorska funkcija) i pruža selektivni pritisak za inaktivaciju p53 gena. Funkcija p53 tumor supresorskog gena može biti izgubljena različitim mehanizmima: oštećenjima koja sprječavaju aktivaciju p53, mutacijama unutar gena p53 ili mutacijama nizvodnog posrednika p53 funkcije. Stotine mutacije (kojih je identificirano više od 18000, više od 70% su missense mutacije u DNA veznoj domeni) u p53 genu nalazimo u većini tumora kod ljudi. Približno polovica svih ljudskih tumora ima mutaciju ili gubitak u genu p53 koja dovodi do inaktivacije njegove funkcije. Na primjer, frekvencija p53 mutacija je 70% kod raka pluća, 60% kod raka debelog crijeva, glave i vrata, jajnika i mokraćnog mjehura i 45% kod raka želuca. U mnogim drugim ljudskim tumorima u kojem sam p53 je funkcionalno aktivan, njegova funkcija mu je oslabljena zbog mutacije u proteinima koji djeluju ili uzvodno ili nizvodno od p53, kao što su MDM2, Chk2 ili E6 protein HPV-a. Inaktiviranje ključnih koaktivatora gena p53 kao što je ARF gen također oslabljuju tumor supresorsku funkciju gena p53. Geni kao što su p16INK4 i p14ARF također su često mutirani u ljudskim tumorima. Iako divlji tip gena p53 djeluje kao tumor supresor, neki mutanti p53 (mt53) mogu se smatrati onkogenima (Pitot 2002).

Bolesnici s Li-Fraumeni-ovim sindromom, koji su naslijedili mutaciju u jednom od dva alela p53, imaju vrlo visoku vjerojatnost da obole od raka tijekom svog života. Naknadni gubitak divljeg tipa p53 alela dovodi do tumora mozga, dojke, vezivnog tkiva, krvnih stanica i nadbubrežnih žlijezda. Inaktivacija p53 također dovodi do razvoja tumora koji su funkcionalno nevezani uz p53. Na primjer, miševi bez divljeg tipa p53 gena su osjetljivi na spontanu tumorigenezu. U tumorima bez p53 mutacije, p53 produkt je često inaktiviran genskim produktom onkogenom ili neispravnim uzvodnim signalom. Inaktivacija p53 je ključni događaj u karcinogenezi. Prisutnost mutiranog proteina p53, može dati selektivnu prednost razvoju tumorskih stanica. To je pokazano tako što je stanici s defektnim p53 genom dodan određeni mutirani p53 protein što je rezultiralo povećanjem tumorigenetskog potencijala *in vitro* i *in vivo* (Pitot 2002).

7. ZAKLJUČAK

1979. godine Lionel Crawford, David P. Lane, Arnold Levine i Lloyd Old su otkrili gen p53 koji je i nakon 30 godina proučavanja ostao jedna od najatraktivnijih i najzanimljivijih tema istraživanja u biologiji. Njegova uloga, kao jednog od najvažnijih tumor supresor gena dala je poticaj za istraživanja, kako bi se našli novi načini liječenja i prevencije danas jednog od najraširenijih i najtežih oblika bolesti. Potencijal gena p53 u dijagnozi, terapiji i liječenju tumora je od iznimnog značaja. No postoji još puno nepoznanica koje treba razjasniti i istražiti te se nadamo nastavku istraživanja koje će nam dati neke ključne odgovore u borbi protiv tumora u bliskoj budućnosti.

8. LITERATURA

1. Andrei I. Okorokov, Elena V. Orlova (2009). „Structural biology of p53 tumour suppressor.“
2. Arijana Zorić, Anđela Horvat, Neda Slade (2010). „Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi.“
3. Francis Rodier, Judith Campisi, Dipa Bhaumik (2007). „Two faces of p53:aging and tumor suppression.“
4. Han-Chung Wu, Pi-Chun Li (2008). „Proteins expressed on tumor endothelial cells as potential targets for anti-angiogenic therapy.“
5. Henry C. Pitot (2002). „Fundamentals of oncology.“
6. Lauren Pecorino (2008). „Molecular biology of cancer, mechanisms, targets and therapeutic.“
7. Raymond W. Ruddon (2007). „Cancer biology.“
8. Vladimir A. Belyi, Prashanth Ak, Elke Markert, Haijian Wang, Wenwei Hu, Anna Puzio-Kuter, Arnold J. Levine (2010). „The origins and evolution of the p53 family genes.“
9. Wenwei Hu (2009). „The role of gene family in reproduction.“

<http://www.p53.free.fr>

9.SAŽETAK

Gen p53 otkriven je 1979. godine i prvi je otkriveni tumor supresorski gen. Njegova glavna uloga u organizmu je sprječavanje nastanka tumora i to na način da na određene podražaje kao što su oštećenje DNA, hipoksija ili aktivacija onkogene može zaustaviti staničnu diobu, aktivirati enzime za popravak DNA ili izazvati apoptozu. Koncentracija p53 u stanici regulirana je proteinom MDM2 koji ga modificira (dodaje ubikvitin) i tako predodređuje za degradaciju proteosomima. p53 je fosfoprotein od 53 kDa, a njegov gen kod ljudi se nalazi na kratkom kraku kromosoma 17. Ovaj gen pripada visoko konzerviranoj obitelji gena koja sadrži još najmanje dva člana, p63 i p73. Divlji tip p53 proteina sadrži 393 aminokiselina i sastoji od nekoliko strukturnih i funkcionalnih područja: na N-terminalnom kraju nalazi se transaktivacijsko područje ili TAD domena, regija bogata prolinom, centralna domena, regija koja sadrži jezgri lokalizacijski signal, oligomerizacijska domena i C-terminalna bazilna domena. p53 ima i važnu ulogu u reprodukciji jer kontrolira implantaciju zametka. Mutacije u genu p53 odgovorne su za većinu tumora kod ljudi kao što su tumori mozga, pluća, dojke, debelog crijeva te maligne bolesti krvotvornog sustava (limfomi i leukemije). Danas se zna da je p53 jedan od najvažnijih tumor supresorskih gena i da su njegove mutacije odgovorne za preko 50% svih novonastalih tumora.

10. SUMMARY

p53 gene was discovered in 1979. as a first tumor suppressor gene. The main role of the p53 gene is to prevent tumors by responding to certain stimuli, such as DNA damage, hypoxia or oncogene activation in a way to stop cell division, to activate DNA repair enzymes or to induce apoptosis. Concentration in the cell is regulated by the MDM2 protein that modifies p53 (adds ubiquitin) flagging it for the degradation by proteosomes. p53 is a phosphoprotein of 53 kDa and the gene in humans is located on a short arm of chromosome 17. This gene belongs to a highly preserved gene family containing at least two more members, p63 and p73. Wild-type p53 protein contains 393 amino acids and contains several structural and functional areas: the N terminal end or TAD domain, a region rich in proline, central domain (DNA binding), a region that contains nuclear localization signal, oligomerization domain and C-terminal basic domain. p53 has an important role in reproduction because it controls the implantation of the embryo. Mutations in the p53 gene are responsible for most cancers in humans, such as brain tumors, lung, breast, colon, and malignant diseases of the hematopoietic system (lymphoma and leukemia). Today it is known that p53 is one of the most important tumor-suppressor genes and its mutations are responsible for over 50% of all newly established tumors.