

# Mehanizmi inaktivacije tumor supresorskog gena TP53 u razvitku tumora

---

Martić, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:107760>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Nikolina Martić**

7178/BT

**Mehanizmi inaktivacije tumor supresorskog gena *TP53* u razvitku tumora**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biologija

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. *Reno Hrašćan*

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Mehanizmi inaktivacije tumor supresorskog gena *TP53* u razvitku tumora

*Nikolina Martić, 58207939*

**Sažetak:** Tumori su nakupine promijenjenih stanica koje nekontrolirano rastu i dijele se, a uklanjanjem uzroka njihove pojave njihovo dijeljenje ne prestaje. U kancerogenezi, skupina gena koja ima bitno značenje su tumor supresorski geni. Jedan od njih je gen *TP53* koji kodira za nuklearni fosfoprotein p53 i ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi i staničnom starenju. U normalnim uvjetima *TP53* inhibira proliferaciju stanica i nekontrolirano dijeljenje, no pojavom mutacija dolazi do inhibicije njegovog supresorskog djelovanja te to pridonosi pojavi tumora. U ovom radu, naglasak je stavljan na somatske i germinativne mutacije koje utječu na ekspresiju p53, polimorfizme p53 te interakcije s drugim koefektorima poput MDM2 i KAP1 te mikroRNA molekula. Također, naveden je pregled humanih tumora koji sadrže mutacije tumor supresorskog gena *TP53* redom prema učestalosti pojave u populaciji.

**Ključne riječi:** tumor supresorski geni, gen *TP53*, mutacije, kancerogeneza, humani tumori

**Rad sadrži:** 26 stranica, 4 slike, 47 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u:** Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** dr.sc. *Reno Hrašćan*, izv.prof.

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. *Reno Hrašćan*, izv.prof., doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić*

**Datum obrane:** 15. srpnja 2019.

**BASIC DOCUMENTATION CARD****Bachelor thesis****University of Zagreb****Faculty of Food Technology and Biotechnology****University undergraduate study Biotechnology****Department of Biochemical Engineering****Laboratory for Biology and Microbial Genetics****Scientific area: Biotechnical Sciences****Scientific field: Biotechnology****Mechanisms of tumor suppressor gene *TP53* inactivation in tumor development*****Nikolina Martić, 58207939***

**Abstract:** Tumors are masses of tissue that grow abnormally and by removing the cause of their occurrence, their growth does not stop. In cancerogenesis, a group of genes that are of crucial importance are tumor suppressor genes. One of them is the *TP53* gene that codes for nuclear phosphoprotein p53 and plays a role in regulating cell cycle, apoptosis and cellular aging. Under normal conditions, *TP53* inhibits cell proliferation and uncontrollable growth, but when mutations occur, it results in inhibition of its suppressor activity and this contributes to the tumor development. In this paper, emphasis is placed on somatic and germinative mutations affecting expression of p53, polymorphisms of p53 and interaction with other coefficients such as MDM2 and KAP1 and microRNA molecules. Also, a review of human tumors containing tumor suppressor *TP53* tumor mutations is reported according to the frequency of occurrence in the population.

**Keywords:** tumor suppressor genes, *TP53* gene, mutations, cancerogenesis, human cancers

**Thesis contains:** 26 pages, 4 pictures, 47 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in** the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** PhD. *Reno Hrašćan*, Associate professor

**Technical support and assistance:** PhD. *Reno Hrašćan*, Associate professor, PhD. *Tomislav Vladušić*

**Defence date:** July 15th 2019

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Geni koji kontroliraju stanični ciklus.....	2
2.1.1. Onkogeni.....	2
2.1.2. Tumor supresorski geni .....	2
2.2. <i>TP53</i> .....	3
2.2.1. Položaj na kromosomu i struktura <i>TP53</i> .....	3
2.2.2. Alternativni transkripti gena <i>TP53</i> .....	4
2.3. Protein p53.....	4
2.3.1. p53 kao transkripcijski faktor.....	5
2.3.2. Regulacija aktivnosti p53.....	6
2.3.3. Aktivacija p53 puta i mehanizam djelovanja .....	7
2.3.3.1. Inhibicija staničnog ciklusa .....	8
2.3.3.2. Apoptoza.....	9
2.4. Mutacije <i>TP53</i> .....	9
2.4.1. Somatske mutacije .....	11
2.4.2. Germinativne mutacije.....	12
2.4.3. Polimorfizmi .....	12
2.4.4. Metilacija promotora <i>TP53</i> .....	13
2.4.5. Inaktivacija p53 pomoću MDM2-KAP1 interakcije .....	13
2.4.6. Inaktivacija p53 pomoću miRNA .....	14
2.5. Tumori i kancerogeneza.....	14
2.5.1. Vrste tumora.....	15
2.5.2. Pregled mutacija <i>TP53</i> u najčešćim humanim tumorima .....	16
2.5.2.1. Rak pluća .....	16
2.5.2.2. Rak dojke.....	16
2.5.2.3. Rak debelog crijeva.....	17
2.5.2.4. Rak prostate.....	17
2.5.2.5. Rak jetre .....	18
2.5.2.6. Rak mokraćnog mjehura .....	18

2.5.2.7. Hematopoetski tumori .....	18
2.5.2.8. Rak bubrega .....	19
2.5.2.9. Rak jajnika .....	19
2.5.2.10. Rak kože .....	20
2.5.2.11. Tumori glave i vrata .....	20
3. ZAKLJUČAK .....	21
4. POPIS LITERATURE .....	22

## 1. UVOD

Tumor, novotvorina ili neoplazija je nakupina promijenjenih stanica koje nekontrolirano rastu i dijele se te uklanjanjem uzroka njihove pojave njihovo dijeljenje ne prestaje. Nakupine takvih stanica mogu biti zloćudne (maligne) i tada se nazivaju rakom, ili dobroćudne (benigne). Ono po čemu se razlikuju je agresivnost rasta, odnosno sposobnost prodiranja u druga tkiva. Benigni tumori ne invadiraju u okolno tkivo, već rastu ekspanzivno potiskujući ga. Maligni tumori imaju sposobnost širenja u okolno tkivo ili udaljena tkiva pomoću krvotoka ili limfnog sustava tvoreći metastaze.

Uloga gena u procesu obrane od nastanka tumora je vrlo bitna. Jedan od najranije otkrivenih i najvažnijih tumor supresorskih gena je gen *TP53*. On često nosi naziv „čuvar genoma“ te je odgovoran za regulaciju staničnog ciklusa, programiranu staničnu smrt-apoptozu kao odgovor na stres i stanično starenje (senescenciju). Njegov produkt je nuklearni fosfoprotein p53 koji isto tako ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa.

Uzrok pojave velikog broja tumora i danas nije poznat, no poznate čimbenike možemo podijeliti u dvije skupine: vanjske kancerogene faktore (kemijski, fizikalni, mehanički i virusni agensi) ili mutacije. Mutacije tumor supresorskih gena, konkretno gena *TP53*, rezultiraju trima različitim ishodima. Primarni ishod je gubitak tumor supresorske funkcije, zatim takozvani „gain of function“ zbog toga što mutirani p53 počinje posjedovati nova svojstva, a treći učinak je dominantni negativni efekt kojim se inhibira djelovanje p53 divljeg tipa. Sva tri slučaja kao posljedicu imaju nemogućnosti suprimiranja prekomjerne proliferacije stanica. To rezultira umnažanjem stanica koje imaju oštećenu ili defektnu DNA te pojavom tumora.

Danas postoji široki spektar tumorskih oboljenja u kojima su detektirane promjene tumor supresorskog gena *TP53*, točnije preko 50% humanih tumora obuhvaća promjenu u tom genu. Najveća stopa mutacija *TP53* je nađena u tumorima pluća i debelog crijeva, slijede ih tumori mokraćnog mjehura, dojke, kože, jetre i prostate te limfomi, dok su u manjoj mjeri mutacije prisutne i u leukemijama, tumorima jajnika i bubrega.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Geni koji kontroliraju stanični ciklus**

Gene koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa možemo svrstati u dvije različite skupine: onkogene i tumor supresorske gene (antionkogeni) (Pećina-Šlaus i sur., 2005). Onkogeni u svom normalnom obliku nose naziv protoonkogeni, a kada počnu pokazivati tumorsku aktivnost dobivaju naziv onkogeni. Geni odgovorni za popravak DNA imaju ulogu popravljavanja slučajnih mutacija prije replikacije kako bi se izbjegla moguća pojava tumorskih stanica. Genetičke promjene kada protoonkogeni prijeđu u onkogene ili antionkogeni izgube aktivnost glavni su uzrok nastanka tumora. Danas je poznato stotinjak onkogeni te dvadesetak tumor supresorskih gena (Science Direct, 2010).

#### **2.1.1. Onkogeni**

Onkogeni su geni koji zbog svojih mutacija uzrokuju nekontrolirani rast i diobu stanica što u konačnici dovodi do razvoja tumora. Oni inhibiraju neke korake stanične diferencijacije i stanično sazrijevanje na način da stanicu potiču na proliferaciju (Croce, 2008). To se događa zbog toga što proteini koje onkogeni kodiraju-onkoproteini ne sadrže elemente odgovorne za kontrolu staničnog ciklusa. Iz toga proizlazi da je aktivnost onkogeni trajna i ne ovisi o faktorima rasta i ostalim vanjskim uvjetima. Aktivacija onkogeni odvija se putem umnažanja gena, translokacijom gena i točkastim mutacijama, a dovoljna je promjena samo jednog alela (Pećina-Šlaus i sur., 2005).

#### **2.1.2. Tumor supresorski geni**

Tumor supresorski geni, poznati i pod nazivom antionkogeni ili emerogeni, geni su koji spriječavaju nastanak tj. preobrazbu normalnih stanica u zloćudne na više razina. Kada dođe do gubitka njihove funkcije to rezultira nastankom tumora.

Do njihovog otkrića došlo je prilikom hibridizacije zdravih i zloćudnih stanica. Tada je dobiven prvi dokaz da normalni genom ima sposobnost vratiti tumorsku stanicu u normalnu. Također, viđeno je da se u većini ispitanih uzoraka fuzioniranjem zdravih i zloćudnih stanica



potiskuje tumorski fenotip. Uvjet je bio da hibridi zadrže potpuni broj kromosoma zdrave stanice, a ponovna pojava tumorskih stanica u ovakvim eksperimentima uzrokovana je gubitkom jednog od kromosoma normalne stanice (Pećina-Šlaus i sur., 2005). Dakle, njihova osnovna funkcija je regulacija staničnog ciklusa, kontrola procesa proliferacije i diferencijacije te očuvanje ukupne stabilnosti genoma. Da bi došlo do inaktivacije tumor supresorskih gena, za razliku od onkogeni, dolazi do inaktivacije oba alela. Sve dok je jedan od alela homozigotan, tumor supresorski geni zadržavaju svoju funkciju. Tu činjenicu prvi je objasnio Alfred Knudson 1971.g. pod nazivom „two-hit“ hipoteze koja danas služi kao osnovica istraživanja mutacija tumor supresorskih gena. U slučaju kada su naslijeđene somatske stanice heterozigotne, dakle jedan od alela je inaktiviran, postoji vjerojatnost da dođe do inaktivacije i drugog alela. Iz toga proizlazi da osobe koje naslijede heterozigotne alele imaju veći potencijal za razvitak zloćudnih bolesti zbog alela sklonim promjenama (Pecorino, 2012).

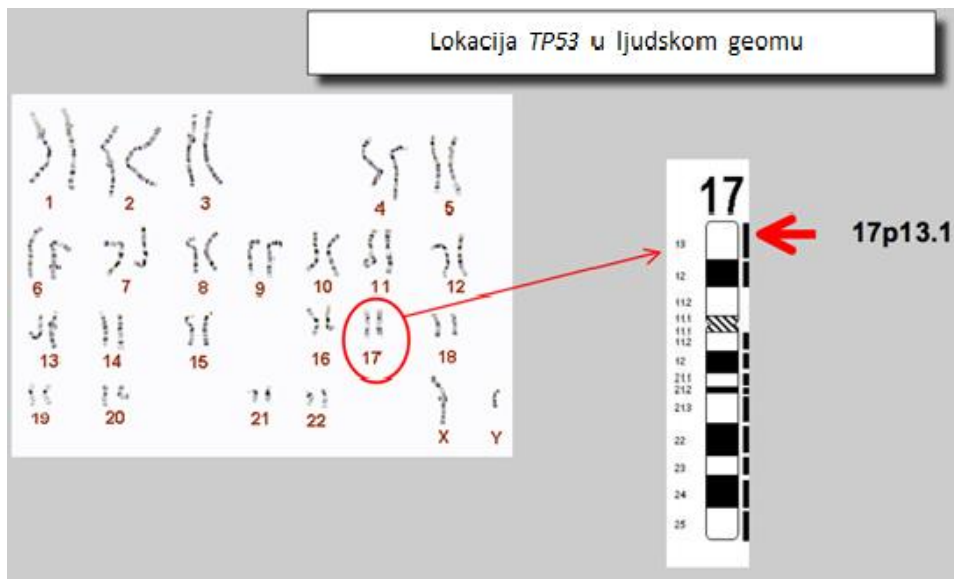
## **2.2. TP53**

Gen *TP53* (tumor protein p53) često nosi naziv „čuvar genoma“. On je prvi otkriveni tumor supresorski gen, a za otkriće 1979. godine zaslužni su Lionel Crawford, David P. Lane, Arnold Levine i Lloyd Old (Cooper, 2000). *TP53* ima ključnu ulogu u kancerogenezi. Odgovoran je za regulaciju staničnog ciklusa, programirane stanične smrti kao odgovor na stres i staničnog starenja (senescencije). Njegov produkt je nuklearni fosfoprotein p53 koji isto tako ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (Zorić i sur., 2010).

### **2.2.1. Položaj na kromosomu i struktura TP53**

Tumor supresorski gen *TP53* nalazi se na kromosomu 17, točnije na kraćem p kraku, na položaju 13.1 u rasponu od 7,668,401. do 7,687,549. parova baza.

*TP53* sadrži 11 eksona te obuhvaća DNA od 16 do 20 kb. Sadrži i dva promotora; prvi je smješten uzvodno od eksona 1, a drugi je smješten unutar eksona 4. Također, postoji i interni ekson unutar introna 9, koji se naziva ekson 9b (NLM, 2019). Korištenjem dvaju promotora i alternativnim izrezivanjem sintetiziraju se različite izoforme proteina (Zorić i sur., 2010).



**Slika 1.** Lokacija tumor supresorskog gena *TP53* u ljudskom genomu (preuzeto s [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_gene.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html))

### 2.2.2. Alternativni transkripti gena *TP53*

S obzirom na ranije navedeno postojanje 2 promotora i alternativno izrezivanje mRNA nakon transkripcije dolazi do nastanka različitih izoformi proteina. Prepisivanjem gena s P1 nastaju izoforme proteina koje sadrže transaktivacijsko područje, a prepisivanjem s P2 nastaju izoforme bez transaktivacijskog područja zbog nedostatka dijela N-domene. Takve izoforme su:  $\Delta 133p53$  s P2 i  $\Delta 40p53$  (p47) s P1. Zajedno se nazivaju  $\Delta Np53$  jer im nedostaje dio ili cijelo transaktivacijsko područje. Unatoč tome, veći dio alternativnog izrezivanje odvija se na C-kraju od eksona 10 do 13. Izrezivanjem introna 9 nastaju 3 različite forme proteina, a to su p53, p53 $\beta$  i p53 $\gamma$ . Zadnje dvije ne sadrže karboksi-terminalnu domenu (Zorić i sur., 2010).

### 2.3. Protein p53

Gen *TP53* kodira za protein p53. Protein je uključen u regulaciju staničnog ciklusa te dopušta prelazak stanici iz G1 u S fazu. Također, dopušta prelazak iz G2 faze u mitozu u G2/M kontrolnoj točki i prelazak staničnog ciklusa iz metafaze u anafazu u mitozu, kontrolom diobenog vretena.

To je protein od 53 kDa, a sastoji se od 393 aminokiseline. P53 sadrži tri područja karakteristična za transkripcijske faktore. To su: transaktivacijsko područje (TAD; engl. *transactivation domain*) na N-kraju od 1. do 67. aminokiseline, područje bogato prolinom (PRD; engl. *proline rich domain*) s motivom PXXP, P označava prolin, a X bilo koju drugu aminokiselinu od 67. do 98. aminokiseline. Zatim središnje i najveće DNA-vezno područje (DBD; engl. *DNA-binding domain*) od 98. do 303. aminokiseline. Ona sadrži jezgrin lokalizacijski signal (NLS; engl. *nuclear localization signal*) od 303. do 323. aminokiseline. Sljedeće je oligomerizacijsko područje (OD; engl. *oligomerization domain*) od 323. do 363. aminokiseline. Na svom C-kraju ima bazno područje (BD; engl. *basic domain*) do 393. aminokiseline (Pecorino, 2015.).



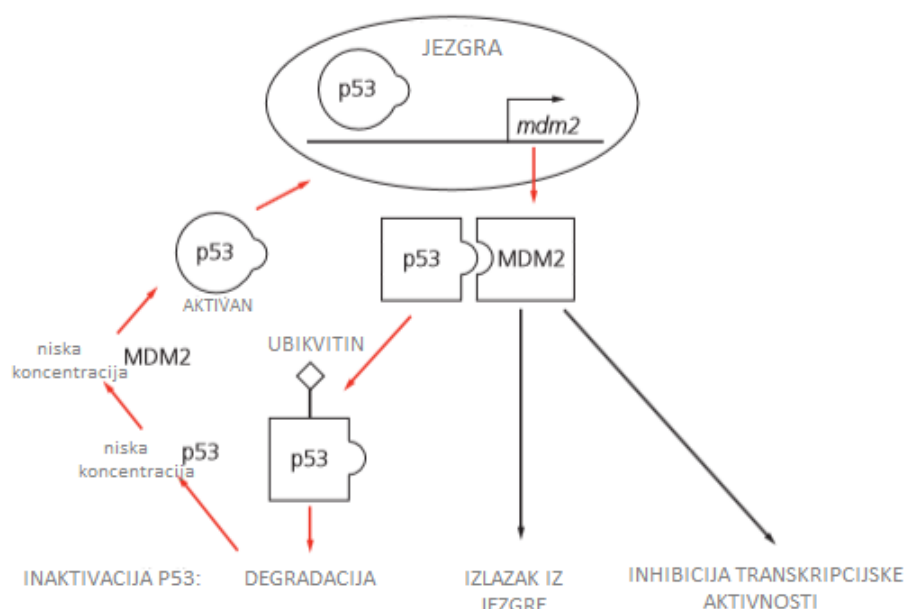
**Slika 2.** Struktura proteina p53  
(preuzeto iz Okorokov i Orlova, 2009)

### 2.3.1. p53 kao transkripcijski faktor

Protein p53 regulira ekspresiju gena za odgovor na stres i posreduje u različitim antiproliferativnim procesima. Dakle, ima ulogu transkripcijskog faktora te se veže blizu promotora određenih gena čime potiče ekspresiju gena. Na taj način on izravno regulira vjerojatno nekoliko stotina transkribiranih gena RNA polimeraze II (RNAP II) i posredno regulira tisuće drugih. Za to je zaslužna središnja strukturna regija koja sadrži DNA-veznu domenu i omogućuje specifično vezanje. 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 te služi kao mjesto prepoznavanja. Sekundarna struktura domene je vrlo stabilna i tvori dvije antiparalelne  $\beta$  naborane ploče koje koordiniraju dvije petlje. One su stabilizirane ionima  $Zn^{2+}$  i tvore motiv petlja- $\beta$  naborana ploča-zavojnica. To sve omogućuje interakcije s DNA i vezanje na promotorska područja (Pecorino, 2012).

### 2.3.2. Regulacija aktivnosti p53

U normalnim staničnim uvjetima p53 je vrlo nestabilan protein s kratkim vremenom poluživota koje iznosi 5 do 30 minuta (Giaccia i Kastan, 1998). Kao posljedica toga u stanici je prisutna mala količina p53. Za njegovu nestabilnost zaslužan je gen *MDM2* koji kodira za protein MDM2. MDM2 protein je E3 ubikvitin ligaza i kontrolira aktivnost p53. Njegovo djelovanje se sastoji od toga da dodaje mali protein ubikvitin na p53 i tako ga označava za degradaciju pomoću proteasoma. Također se veže i inhibira transaktivacijsku domenu na N terminalnom kraju i prenosi p53 iz jezgre u citoplazmu gdje će biti razgrađen. Ova dva gena, odnosno proteina su povezana mehanizmom negativne povratne sprege (Pecorino, 2012.). MDM2 potiče degradaciju p53, a istovremeno p53 potiče nastajanje MDM2. Mala koncentracija p53 u stanici daje malu količinu MDM2 enzima, a to rezultira povećanjem aktivnosti p53 proteina. Nadalje, veća aktivnost p53 uzrokuje povećanje koncentracije MDM2 koji će potaknuti degradaciju p53 i smanjiti njegovu količinu. Na taj način vidimo funkcioniranje regulacijskog kruga proteina p53.



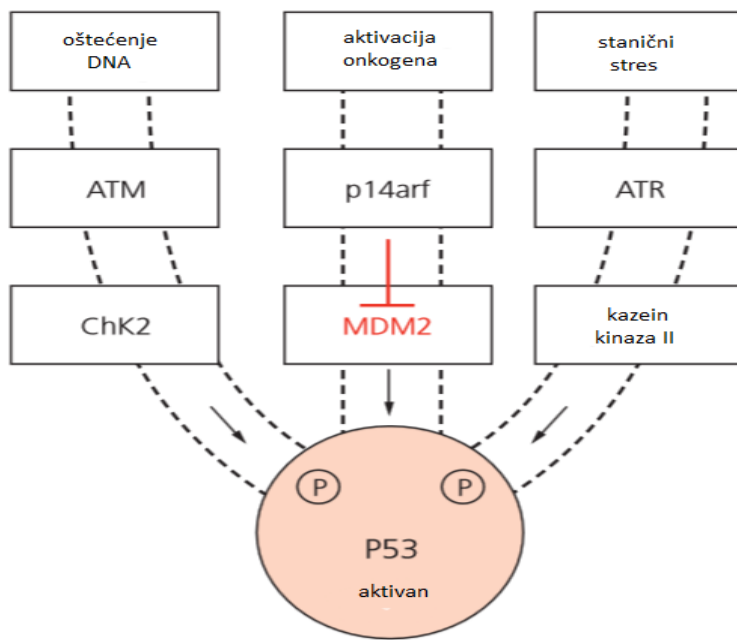
**Slika 3.** Shematski prikaz regulacije aktivnosti proteina p53 pomoću MDM2 (preuzeto iz Pecorino, 2012.)

### 2.3.3. Aktivacija p53 puta i mehanizam djelovanja

S obzirom na to da je p53 tumor supresorski protein i uloga mu je sprječavanje nekontroliranog rasta i dijeljenja stanica, u određenim uvjetima potrebno je povećanje njegove koncentracije i aktivnosti. Takvi uvjeti su stresni stanični uvjeti poput oštećenja DNA primjerice zračenjem ili kemijskim agensima, hipoksija, skraćivanja telomera ili aktivacije onkogene. Za detekciju tih uvjeta služe stanični proteini, poput kinaza, koje prenose signal fosforilacijom do p53 proteina. Ono što karakterizira ovakve situacije je onemogućavanje p53-MDM2 interakcije. To dovodi do produljenja vremena poluraspada p53 te do njegovog nakupljanja u stanici. Također, dolazi i do konformacijske promjene p53 te se aktivira kao transkripcijski faktor u tim stanicama. Nadalje, N-terminalna domena se fosforilira i glavni je supstrat za protein kinaze koje dalje prenose signal.

Ako uzmemo u obzir sve navedeno, postoje 3 različita puta za aktivaciju p53. Ukoliko dođe do oštećenja DNA, tj. stvaranja dvolančanih lomova aktivira se ATM kinaza koja fosforilira ChK2 kinazu. One zatim zajedno fosforiliraju N-terminalni kraj p53 proteina i onemogućuju vezanje MDM2. Drugi mehanizam se aktivira kao odgovor na stanični stres, a sastoji se također od kinaza. To su kinaze ATR i kazein kinaza II. One fosforiliraju p53 i onemogućuju interakciju s MDM2. Treći put aktivacije p53 odnosi se na reakciju na onkogene. Oni induciraju aktivnost proteina p14arf. On se ne veže direktno na kompleks p53-MDM2 nego kontrolira njegovo razlaganje (Pecorino, 2012).

Svi putevi rezultiraju nemogućnošću interakcije p53 s MDM2. Nakon toga se na p53 vežu proteini koji izazivaju dodatne konformacijske promjene koje još više pojačavaju njegovu aktivnost. Fosforilacija omogućuje vezanje transkripcijskih koaktivatora kao što su P300 i PCAF. Oni acetiliraju karboksilni kraj p53 i izlažu DNA veznu domenu p53, omogućujući mu da aktivira ili inhibira određeni gen (Liu i sur., 1999).



**Slika 3.** Shematski prikaz aktivacije p53 puta  
(preuzeto iz Pecorino, 2012.)

### 2.3.3.1. Inhibicija staničnog ciklusa

Stanični ciklus je niz događaja koji se ponavlja u stanicama koje se dijele, a sastoji se od interfaze i mitoze. Tijekom interfaze stanice rastu i dupliciraju broj kromosoma za proces mitoze. U toj fazi kromosomi nisu kondenzirani. Interfaza se sastoji od 3 podfaze, a to su G1, S i G2 faza. G1 faza je faza u kojoj stanica neprestano raste, te se odvija između mitoze i replikacije DNA. Replikacija DNA se događa tijekom S faze, a u G2 fazi se nastavlja rast stanice i sinteza proteina koji će biti potrebni u mitozu. Mitoza se odvija kroz 4 faze; profazu, metafazu, anafazu i telofazu. Genetički materijal prethodno dupliran se raspodjeljuje u stanice kćeri, a zatim slijedi citokineza, odnosno dioba citoplazme (Alberts i sur., 2002).

Jedna od funkcija p53 je i inhibicija staničnog ciklusa kada je prisutno oštećenje DNA. To se odvija u kontrolnoj točki G1/S staničnog ciklusa kako bi stanica imala mogućnost popraviti oštećenje prije iduće replikacije s ciljem da se greška ne prenosi dalje. Taj put uključuje transkripcijsku indukciju gena *p21*. Kako bi do toga došlo, dolazi do aktivacije inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima (CDK). Inače, ciklini kontroliraju ulazak i izlazak u mitozu, te CDK skupa s njima omogućuju odvijanje faza staničnog ciklusa. Dakle, p53 inducira

transkripciju gena *p21* koji kao produkt daje p21 koji je CDK inhibitor. To rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa u G1 fazi i omogućenjem popravka DNA. P21 također veže PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) koji ima ulogu u sintezi i popravku DNA. P21 inhibira PCNA aktivnost u replikaciji, no ne u popravku DNA. Ukoliko popravak nije potpun ili uspješan, stanici slijedi programirana stanična smrt odnosno apoptoza (Damjanov i sur., 2014).

U mitozu tijekom metafaze ukoliko dođe do nepravilnog prihvaćanja mikrotubula diobenog vretena za kinetohore, protein BubR1 fosforilira p53 i stanice se usmjeravaju u apoptozu. Na taj način održava se precizna segregacije kromosoma i sprječava stvaranje multiploidnih stanica potomstva (Ha i sur., 2007).

### **2.3.3.2. Apoptoza**

Apoptoza se često definira kao programirana stanična smrt te je dosta složen proces. Pojam je prvi put upotrijebljen 1972. od strane Kerr, Wylliea i Currieja. Apoptoza se javlja normalno tijekom razvoja i starenja i kao homeostatski mehanizam za održavanje stanične populacije u tkivima. Također se pojavljuje kao obrambeni mehanizam kao što je imunološka reakcija ili kada su stanice oštećene zbog bolesti ili štetnih agensa (Elmore, 2007).

Odvija se preko dva glavna puta koja su posebno regulirana na vanjski i unutarnji način. P53 direktno regulira ekspresiju posrednika apoptoze na način da gene koji potiču apoptozu inducira, a one koji ju zaustavljaju utišava. Dolazi do indukcije mitohondijskih pro-apoptotskih proteina NOXA, PUMA, BAX i BID, koji uzrokuju otpuštanje citokroma c i aktiviraju Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) koji zatim aktivira prokaspazu 9 koja tvori proteinski kompleks apoptosom. Oni čine unutarnji put apoptoze. S druge strane u vanjskom putu, p53 inducira ekspresiju gena koji kodiraju za "receptore smrti" i pro-apoptotske proteine iz Bcl-2 obitelji kao što su Fas/CD95 i DR5 (Fridman i Loewe, 2003)

## **2.4. Mutacije TP53**

*TP53* je tumor supresorski gen čiji gubitak aktivnosti dovodi do nastanka tumora. Danas postoji veliki broj raličitih tumorskih oboljenja čiji je uzrok mutacija gena *TP53*. Zbog

mutacije dolazi do gubitka tumor supresorske aktivnosti i nemogućnosti suprimiranja prekomjerne proliferacije stanica. To rezultira umnažanjem stanica koje imaju oštećenu ili defektnu DNA. Takve stanice se onda nazivaju neoplazije (Damjanov i sur, 2014.).

U stanicama aktivnost *TP53* može izostati ukoliko je gen mutiran, deletiran ili zbog djelovanja inhibitora kao što su produkt gena MDM2 ili protein E6 papiloma virusa (Najman, 2002). Pojava učestalih mutacije je vjerojatno uzrok toga što selekcijski pritisak preferira mutirane stanice u odnosu na divlji tip. Preko 75% mutacija su „missense“ mutacije koje rezultiraju promjenom jedne aminokiseline te dolazi do stvaranja promijenjenih proteina p53. Po tome se mutacije *TP53* razlikuju od mutacija ostalih tumor supresorskih gena jer one uglavnom rezultiraju „frameshift“ ili „nonsense“ mutacijama što dovodi do inaktivacije proteina (Pecorino, 2015). Ostale mutacije koje se javljaju su „frameshift“ insercije i delecije (9%), „nonsense“ mutacije (7%), istovjetne ili tihe mutacije (5%) i ostale (Petitjean i sur, 2006).

Inače se javljaju tri strukturna i funkcionalna utjecaja mutacija na genu *TP53*. Prvenstveni utjecaj je gubitak tumor supresorske funkcije mutacijama u oba alela (engl. *loss of function*). Sljedeći učinak je takozvani „gain of function“. Naime, mutirani oblik *TP53* može posjedovati svojstva koja divlji tip *TP53* ne posjeduje poput povećane proliferacije, veće gustoće rasta, antiapoptotička aktivnost ili rezistencija na terapijske učinke (van Oijen i sur, 2010). Treći učinak je dominantni negativni efekt (Magali i sur., 2010), a ostvaruje se heterooligomerizacijom stabilnijeg mutantnog p53 sa divljim tipom p53. Na taj način se inhibira djelovanje p53 divljeg tipa (Najman, 2002).

P53 mutanti kod kojih se mutacije javljaju u transaktivacijskoj domeni uglavnom zadržavaju djelomičnu transkripcijsku aktivnost i sposobnost da induciraju staničnu smrt. S druge strane, iako neki mutanti s mutacijama u oligomerizacijskoj domeni zadržavaju djelomičnu aktivnost, većini im nedostaje bilo kakva transaktivacijska funkcija. Mutanti s mutacijama DNA-vezne domene su općenito varijante koje gube tumor supresorsku funkciju. Međutim, takvi oblici p53 tipično imaju dominantni negativni učinak na bilo koji preostali divlji tip proteina i mogu također imati „gain of function“ efekte (Sabapathy i Lane, 2018).



### 2.4.1. Somatske mutacije

Somatske mutacije najčešći su oblik mutacija gena *TP53*, a prisutne u većini tumorskih oboljenja te su češće u uznapredovalim stadijima tumora i agresivnijim oblicima. Danas je poznato da prisustvuju u 12 vrsta tumora (Robles i sur, 2017). Studije su pokazale da se većina mutacija, čak 86%, javlja između eksona 5-8 u DNA-veznoj domeni. 87,9% ovih mutacija su „missense“ (Olivier i sur, 2010). Prisutnost navedenih mutacija u DNA-veznom području uglavnom predviđa lošiji ishod oboljelih.

Generalna podjela mutacija koje se javljaju u DNA-veznom području je na kontaktne (kodoni 273 i 248), one koje uzrokuju konformacijske promjene p53 (175, 245, 249 i 282) i one koje uzrokuju poprimanje onkogenih funkcija (248, 273 i 175). Također, postoji podjela na disruptivne i nedisruptivne mutacije ovisno o utjecaju na transkripciju. One mutacije koje uzrokuju stvaranje STOP kodona ili one koje uzrokuju promjene naboja aminokiselinskih ostataka smatraju se disruptivnima jer rezultiraju potpunim ili djelomičnim gubitkom transkripcijske aktivnosti *TP53*. S druge strane, mutacije koje omogućuju stvaranje novih proteina su nedisruptivne i karakterizira ih ranije spomenuti „gain of function“, odnosno poprimanje novih svojstava u odnosu na divlju tip *TP53*. Takve mutacije se javljaju na takozvanim hotspot kodonima, a to su kodoni 175H, 273H, and 273C (Robles i sur, 2017.)

Također, zanimljivo je da pretjerana ekspresija gena *MDM2* i time povećana produkcija proteina MDM2 koji smanjuje koncentraciju proteina p53 može uzrokovati stvaranje p53-inaktiviranog fenotipa (Pecorino, 2015).

Kada se govori o najčešćim mutacijama *TP53* gena, to je promjena jedne aminokiseline. Da bi se to dogodilo potrebna je promjena jedne dušične baze, a najveći broj mutacija uključuje prelazak para baza C:G u T:A (Olivier i sur, 2010.). Razlog tomu je to što je stopa mutacije za C:G deset puta veća u odnosu na druge parove baza. Naime, 3-5% citozina u ljudskom genomu se metilira na 5' kraju pomoću DNA-metiltransferaze. Takav metilirani citozin je manje stabilan u odnosu na nemetilirani i spontano poliježe deaminaciji čime prelazi u timin (Olivier i sur, 2010.).

### 2.4.2. Germinativne mutacije

Germinativne mutacije, odnosno mutacije u zametnoj liniji, uzrok su pojave Li-Fraumeni sindroma, koji je rijetko autosomalno dominantno nasljedno oboljenje koje nosi predispozicije za nastanak tumora (Malkin, 2011). Pacijenti s tim poremećajem imaju veći rizik od obolijevanja od tumora prije 50. godine života u odnosu na generalnu populaciju. Tu je bitno spomenuti da mogu oboljeti imaju prisutan alel divljeg tipa gena *TP53* te da je vidljivo da je za formaciju tumora dovoljna mutacije jednog alela (Pecorino, 2015). One se također javljaju najčešće na području DNA-vezne domene, točnije u eksonima 5-8, a „hotspot“ kodoni su 175, 245, 248, 273 i 282. Istraživanja su pokazala da je vjerojatnost ovakve promjene gena otprilike 1:5000. (Malkin, 2011).

Vrsta i učestalost pojedinih mutacija je slična kao kod somatskih, gdje su najčešće „missense“ mutacije sa 77%, a slijede ih mutacije prelaska C:G u T:A sa 54%. (Olivier, 2010). Na području transaktivacijske domene genetičkim analizama članova obitelji s poviješću LFS-a uočena je prisutnost mutacija koje dovode do preranog STOP kodona u *TP53* (Sabapathy i Lane, 2018). Također, proučavanjem odnosa genotip-fenotip, zaključeno je da je najznačajnija pojava gubitak funkcije jer su pronađene delecije velikih sekvenci *TP53* u agresivnim oblicima Li-Fraumeni sindroma (Olivier, 2010).

### 2.4.3. Polimorfizmi

Danas je identificirano 80ak različitih polimorfizama gena *TP53* pri čemu je većina od 80% locirana u intronima izvan mjesta cijepanja (engl. *splicing*) ili u nekodirajućim dijelovima eksona. Od ukupno 18 eksonskih polimorfizama s promijenjenim jednim nukleotidom (engl. SNP- *single nucleotide polymorphism*), 5 je tihih, a 7 ih je locirano iza STOP kodona na eksonu 11. Od preostalih 6, samo 4 alteriraju proteinsku strukturu p53 i imaju mali utjecaj na transaktivacijsku aktivnost (Olivier, 2010).

V217M je jedini neutišani polimorfizam DNA-vezne domene te pokazuje povećanu transaktivacijsku aktivnost, što bi moglo pridonijeti antitumorskom djelovanju. Polimorfizam G360A je lociran pored oligomerizacijske domene i pokazuje smanjenu transaktivacijsku aktivnost. To može rezultirati potencijalnim rizikom od nastanka tumora. Unatoč tim pretpostavkama, njihovo utjecaj još nije klinički ili epidemiološki ispitan (Olivier i sur, 2010).

G360A je polimorfizam uočen jedino kod afričke populacije s učestalošću od otprilike 5% (Olivier i sur, 2010). On utječe na fosforilaciju serina 46 koji je povezan s pojačavanjem apoptoze posredstvom p53. Fosforilaciju može vršiti više različitih kinaza (HIPK2, DYRK2, ATM, PKC $\delta$ , AMPK $\alpha$ , p38 MAPK) te su znak za vrlo bitnu modifikaciju regulacije i funkcije proteina p53 (Smeenk i sur, 2011).

Idući bitan polimorfizam je P72R za koji se predlaže činjenica da je njegova učestalost povezana s prilagodbom na zimske temperature (Olivier i sur, 2010). R72 je aktivniji u odnosu na P72 pokazujući transaktivacijsku aktivnost u ekspresiji faktora koji inhibira leukemiju. Također, P72R ima poveznicu s PIN3 polimorfizmom u intronu 3 koji sadrži duplikaciju 16 parova baza, GC bogatih regija, a veže se uz rizik od nekoliko različitih tumora. Ovaj polimorfizam uzrokuje i smanjenu ekspresiju *TP53* mRNA.

#### **2.4.4. Metilacija promotora *TP53***

Varijacije u metilaciji DNA česta su pojava u tumorskim stanicama i direktno utječu na kancerogenezu. Konkretno, metilacija citozina pridonosi stvaranju točkastih mutacija tumor supresorskih gena u somatskim i germinativnim stanicama. Ova pojava je promatrana kroz različite tipove tumora te je zaključeno da dolazi do transkripcijske inaktivacije i time prigušivanja tumor supresorskog gena. (Kang i sur, 2001).

#### **2.4.5. Inaktivacija p53 pomoću MDM2-KAP1 interakcije**

KAP1 je nuklearni korepresor koji inače nema nikakav utjecaj na protein p53. No, posredstvom, odnosno interakcijom, s proteinom MDM2 korepresijski stimuliraju stvaranje kompleksa p53–HDAC1 (engl. *class I histone deacetylases*) te smanjuju acetilaciju p53. Nakon toga slijedi označavanje proteina p53 ubikvitinom, inhibicija transkripcije i naposljetku apoptoza (Wang i sur, 2005).

#### **2.4.6. Inaktivacija p53 pomoću miRNA**

Mikro-RNA su male, nekodirajuće RNA molekule koje imaju ulogu u regulaciji ekspresije gene na post-translacijskoj razini. Inače p53 regulira transkripcijsku ekspresiju i sazrijevanje miRNA što kasnije doprinosi u tumor supresorskim svojstvima p53. MiRNA mogu utjecati na protein p53 na dva načina; negativnom regulacijom gdje direktnom represijom utječu na koncentraciju p53 ili reprimiraju negativne regulatore p53 čime zapravo vrše pozitivnu regulaciju. Poznate vrste miRNA koje vrše inaktivaciju p53 su miR-504 i miR-125b. Njihovom prekomjernom ekspresijom i direktnim vezanjem na 3' kraj smanjuje se koncentracija i aktivnost p53 te apoptoza (Feng i sur, 2011).

#### **2.5. Tumori i kancerogeneza**

Tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje kada se stanice dijele više no što bi trebale ili ne umiru kada bi trebale (NCI, 2019). Tumor nastaje od jedne stanice, odnosno ima monoklonsko podrijetlo. Kada se normalna stanica transformira u tumorsku, ona prolazi procese staničnog ciklus te diobama nastaju milijarde promijenjenih stanica od kojih je građen tumor. Takve stanice rastu i dijele se u većoj mjeri od normalnih stanica te uklanjanjem uzroka njihove pojave njihovo dijeljenje ne prestaje. Uzrok velikog broja tumora i danas nije poznat. No, za određene uvjete može se reći i dokazati da uzrokuju rak, a to su primjerice UV zračenje, pušenje ili određeni virusi. Također, geni igraju određenu ulogu u nastanku tumora. Oštećenja gena mogu nastati na dva načina: mutacijama ili vanjskim faktorima u koje ubrajamo kemijske, fizikalne, mehaničke i virusne agense. Takve tvari nazivano kancerogenima. Na taj način stanični tumor supresorski geni gube svoju aktivnost, onemogućen je popravak oštećenja i induciranje smrti (Foote i sur., 2009).

Proces stvaranja takvih „besmrtnih“ stanica s neograničenim proliferacijskim sposobnostima naziva se kancerogeneza. Osim toga stanice imaju i sposobnost angiogeneze. One induciraju rast krvnih žila kako bi si osigurale dovoljnu količinu hranjivih tvari i kisika. Angiogeneza predstavlja zamršen međuodnos tumora i okolnih stanica, primjerice endotelne stanice pridružene tumoru, glatke mišićne stanice, Rouget-ove stanice, fibroblasti i makrofagi. Za vrijeme angiogeneze dolazi do aktiviranja endotelnih stanica te njihove proliferacije i interakcije sa ostalim stanicama koje pomažu u nastanku novih krvnih žila

(Pecorino, 2012). Danas postoji 5 različitih modela kancerogeneze. Prvi model se fokusira na mutacije i faktore radijacije, viruse i kemijske agense. Drugi model proučava utjecaj genetičke nestabilnosti, a treći se bavi ne-genotoksičnim mehanizmima, odnosno epigenetikom. Četvrti model obuhvaća prethodna tri i temelji se na darvinističkoj selekciji stanica. Peti model bavi se tkivnom organizacijom (Vineis i sur., 2010).

Promjene normalnih stanica u tumorske provodi se u sljedeća tri koraka: inicijacija, promocija i progresija. Tijekom inicijacije kancerogeneze dolazi do trajne genetičke promjene u stanici čime dobiva sva navedena svojstva proliferacije i neograničenog dijeljenja. Većina početnih mutacija zahvaća protoonkogene i tumor supresorske gene. Promocija faza obuhvaća djelovanje više različitih tumorskih promotora koji aktiviraju određene molekule intracelularnih signalnih puteva odgovornih za veći rast stanica. U ovom stupnju promjene su reverzibilne, za razliku od inicijacijskog stupnja, pa je potrebno dulje izlaganje takvim promotorima da bi se postiglo trajno oštećenje. Treći stupanj-progresija događa se kada prokancerogene stanice nakupljaju dodatne nasumične mutacije kojima stvaraju predispoziciju za razvoj malignih tumora (Baba i Catoi, 2007).

### **2.5.1. Vrste tumora**

Nakupine promijenjenih stanica mogu biti zloćudne (maligne) i tada se nazivaju rakom, ili dobroćudne (benigne). Njihova najveća razlika je agresivnost rasta, odnosno sposobnost prodiranja u druga tkiva. Benigni tumori ne invadiraju u okolno tkivo već rastu ekspanzivno potiskujući ga. Maligni tumori imaju sposobnost širenja u okolno tkivo ili udaljena tkiva pomoću krvotoka ili limfnog sustava tvoreći metastaze (Cooper, 2000). Maligne tumore dijelimo na neinvazivne i invazivne. Neinvazivni karcinom ili karcinom in situ čine stanice koje imaju morfološke i druge osobine malignosti, no ne probijaju bazalnu membranu i moguće je njihovo spontano povlačenje. Invazivne maligne tumore čine sve promjene stanica koje imaju sva morfološka i funkcionalna svojstva malignih neoplazmi.

Maligni tumori se mogu podijeliti i s obzirom na tkivo iz kojega nastaju, a to su karcinomi, sarkomi, leukemije i limfomi i embrionalni tumori. Karcinom je tumor epitelnog pokrovnog ili žljezdanog podrijetla. Sarkomi su tumori potpornog mezenhinskog tkiva poput kosti ili hrskavice. Leukemije i limfomi su tumori mezodermalnog podrijetla i zahvaćaju

limforetikularno i hematopoetsko tkivo. Embrionalni tumori nastaju tijekom razvoja embrionalnih stanica (NCI, 2019).

Danas je, također, prihvaćena i najčešće upotrijebljivana TNM klasifikacija zloćudnih tumora. Ona u obzir uzima stanje prije liječenja te služi kako bi se odredila strategija liječenja oboljele osobe. T označava veličinu i agresivnost tumora u odnosu na okolno tkivo, N opisuje stanje i zahvaćenost okolnih limfnih čvorova, a M opisuje prisutnost udaljenih metastaza (NCI, 2019).

## **2.5.2. Pregled mutacija *TP53* u najčešćim humanim tumorima**

### **2.5.2.1. Rak pluća**

U tumorima pluća čest je gubitak heterozigotnosti *TP53*. Mutacije su povezane s lošijom prognozom preživljavanja i povećanom staničnom otpornošću na terapiju. Najveća stopa mutacija gena javlja se u mikrocelularnom raku pluća (SCLC), dok je stopa mutacija nešto niža za rak pluća ne-malih stanica (NSCLC), ali imaju značaj u ponovnom vraćanju te vrste tumora zbog očuvanja tih mutacija metastaziranjem (Mogi i Kuwano, 2011). Bitno je spomenuti i prelazak dušične baze G u T, što je često posljedica kozumiranja duhana (Najman, 2001).

### **2.5.2.2. Rak dojke**

U proučavanjima raka dojke uočeno je da je najčešća genska abnormalnost gubitak heterozigotnosti. Gubitak heterozigotnosti je, kao što je ranije u radu navedeno, gubitak normalne funkcije jednog alela gena kod kojeg je drugi inaktivan. U nekim slučajevima, tu pojavi prati i mutacija u preostalom alelu. Ovakve promjene prisutne su kod osoba s Li-Fraumeni sindromom te nose određene predispozicije za rak dojke. Istraživanja su pokazala da su uobičajena pojava i kodirajuće somatske mutacije. U ovakvim slučajevima tek otprilike 20% tumora dojke eksprimira mutacije u p53. Zaključeno je da ekspresija ovisi o stadiju tumora, te da uznapredovali stadij tumora pokazuje veću frekvenciju mutacija (Gasco i sur.,2002).

Kod ove vrste tumora bitno je spomenuti i povezanost p53 i cirkadijalnog ritma. Cirkadijalni ritmovi su dnevne oscilacije bioloških procesa koje pokreću endogeni molekularni satovi. Trenutni dokazi upućuju na to da postoji međuregulatorna petlja između p53 i Per2 koji je dan od takvih molekularnih satova. P53 djeluje kao transkripcijski faktor koji regulira cirkadijalni sat izravnom kontrolom Per2 ekspresije djelujući kao izravni konkurent BMAL1/CLOCK vezanja za Per2 promotor i na taj način smanjuje njegovu transkripcijsku aktivnost, a time i njegovu koncentraciju i aktivnost, što pridonosi malignosti (Lin i Farkas, 2018).

### **2.5.2.3. Rak debelog crijeva**

Ispitivanjem bolesnika s rakom debelog crijeva i kolorektalnim karcinomom koji su pretrpjeli širenje metastazi, stopa mutacije *TP53* iznosila je 80%. S druge strane, mutacije *TP53* nisu uobičajene u benignim adenomatoznim polipima debelog crijeva, a njihova frekvencija iznosi oko 15-30%. Ova činjenica znači da mutacije *TP53* igraju ulogu u kasnom stadiju tumorogeneze, kao što je korak napredovanja adenoma u invazivne adenokarcinome ili metastaze u udaljene organe. Smatra se da je gubitak transkripcijske aktivnosti pojava koja uzrokuje gubitak funkcije p53 i potiče razvoj tumora, a odgovorna je „missense“ mutacija na mjestu R273H (Nakayama i Oshima, 2019).

### **2.5.2.4. Rak prostate**

Mutacije gena *TP53* su u tumorima prostate prisutni sa stopom od otprilike 30%. Mutacije u ovom tipu tumora ne pokazuju korelaciju sa stadijem tumora, a najčešće se javljaju na eksonima 7 i 8 (Ecke i sur.,2010).

U ovoj vrsti tumora se također javlja interakcija p53 s cirkadijalnim ritmom na način kao i kod raka dojke. Zbog manje koncentracije i aktivnosti PER2 dolazi do neoplastičnog rasta i manjka odgovora na oštećenje DNA (Markt i sur., 2015)

### **2.5.2.5. Rak jetre**

Pri pojavi raka jetre postoji snažna molekularna veza s izloženosti kancerogenim agensima. Glavni rizični čimbenici uključuju kronične infekcije virusom hepatitisa B (HBV) ili C (HCV) i izloženost aflatoksinu B1 (AFB1) ili konzumacija alkohola. Višestruke genetske i epigenetske promjene su uključene u molekularnu patogenezu raka jetre. Primjerice somatske mutacije u *TP53* koje AFB1 često inducira, a to je prelazak G: C u T: A na trećoj bazi u kodonu 249. Kronična infekcija virusima HBV i HCV, kao i poremećaju poput hemokromatoze, stvaraju reaktivne radikale kisika ili dušika koji mogu oštetiti DNA i dovesti do mutacije *TP53*. Određeni mutantni proteini p53 mogu dobiti onkogene funkcije. Mutantni HBx proteini i dalje zadržavaju sposobnost vezanja na p53, ali umanjuju popravak DNA i p53-posredovanu apoptozu (Hussain i sur., 2007).

### **2.5.2.6. Rak mokraćnog mjehura**

Mutacije *TP53* čest su događaj u raku mjehura i imaju uglavnom prognostički značaj. Najčešća promjena je gubitak heterozigotnosti u 17p kraku. Delecije *TP53* identificirano su u 23 slučaja od ukupno 76 proučavanih. Značajna povezanost je uočena između statusa p53 i stadija i stupnja tumora te je zaključeno da su mutacije češće u tumorima visokog stupnja. Posebice delecija 17p je značajno korelirala sa stadijem tumora, a alelni gubici su bili češći u uznapredovaloj bolesti. Budući da su promjene p53 povezane i s kliničko-patološkim značajkama loše prognoze, sve se češće predlaže uključivanje i fenotipa p53 i statusa mutacije *TP53* u prediktivni panel tumorskih markera za rak mokraćnog mjehura (Erill i sur., 2004).

### **2.5.2.7. Hematopoetski tumori**

Multipli mijelom je zloćudna neoplazma koja zahvaća koštanu srž i razara dijelove kostura u kojima se odvija hematopoeza, poput kosti lubanje, kralježnice, zdjelice i krajeve dugih kostiju udova. Mutacije koje se u ovom tumoru javljaju su delecije na kromosomu 17p, delecije gena *TP53* ili njegovog većeg dijela. Ovakve pojave rezultiraju niskom stopom



preživljenja pacijenata tretiranih kemoterapijom, ali i povratkom bolesti. (Drach i sur., 1998.) Delecije na kromosomu 17p također se javljaju i u stanicama kronične limfocitne leukemije (Chang i sur., 2010). Uzrok je rezistencije na liječenje kemoterapijom lošeg ishoda bolesti. (Campo i sur., 2018). Kronična mijeloidna leukemija je bolest pluripotentnih matičnih stanica, a istraživanjima je dokazano je kako su polimorfizmi na intronu 6 i 7 česti kod ove bolesti, te da je u tom slučaju slab odgovor na liječenje (Sailaja i sur., 2012).

Uzrok razvoja tumora limfnog sustava su uglavnom smanjenja ili gubitci funkcije gena *TP53*. Nemogućnost fosforilacije Ser15 i Ser20 dovodi do inhibicije apoptoze, što postaje ključni razlog nastanka limfoma. Više od 90% mutacija p53 u hematološkim zloćudnim bolestima su točkaste mutacije, od kojih je 79,9% „missense“ mutacije. Također, kod mutanata je onemogućena transkripcijska aktivnost; p53 mutanti u stanicama humanog limfoma mogu se još uvijek translocirati u mitohondrije, ali ne mogu inducirati apoptozu ili s druge strane, neki imaju proapoptotičnu funkciju, ali im nedostaje sposobnost da se translociraju u mitohondrije. Točkaste mutacije najčešće se javljaju u DNA-veznoj domeni, najčešće kod kodona 248, 273 i 175. 5 mutacija na ova 3 kodona (R175H, R248Q, R273H i R273C) pojavljuje se na CpG mjestima (Xu-Monette i sur.,2012).

#### **2.5.2.8. Rak bubrega**

Analiza ekspresije p53 u primarnim i metastatskim uzorcima pokazala je povećanu učestalost mutacija od 51,8% u metastatskim uzorcima u odnosu na 22% u primarnim uzorcima. To sugerira da ekspresija p53 može biti relativno kasni događaj u pojavi tumora i vjerojatno je povezana s metastatskim sposobnostima (Noon i sur., 2010).

#### **2.5.2.9. Rak jajnika**

Smatra se da je oko 10% tumora jajnika uzrokovano naslijeđenom mutacijom. To su uglavnom delecije i gubitak heterozigotnosti. Čak 62,5% mutacija uključuje gubitak heterozigotnosti. Nadalje, polimorfizam *TP53* može također biti potencijalni uzrok razvoja tumora jajnika, kao i agregacija p53 uzrokovana „missense“ mutacijom koja rezultira

strukturnom promjenom p53 i njegovim vezanjem s divljim tipom ili analogima p63 i p73. U najagresivnijem obliku tumora HGSOE stopa mutacija *TP53* iznosi 97% (Zhang i sur.,2016).

#### **2.5.2.10. Rak kože**

Oko 50% svih rakova kože kod normalnih osoba pokazuje mutacije p53. Ta se učestalost povećava na 90% kod raka kože bolesnika s nedostatkom popravka DNA, taj poremećaj je poznato kao xeroderma pigmentosum (XP) (Giglia-Mari i Sarasin, 2003). Pronađene mutacije su uglavnom C u T prijelazi s stopom mutacije od 66% (Benjamin i Ananthaswamy, 2006). Sličnu frekvenciju mutacija, ali s nižom stopom transverzija G u T, imaju tumori kože inducirani 7,12-di-metilbenz[a]antracenom.

#### **2.5.2.11. Tumori glave i vrata**

U tumorima glave i vrata primijećena je promjena aktivnosti, odnosno gubitak aktivnosti tumor supresorskog gena *TP53*. Uzrok tome su mutacije ili infekcija HPV-om. HPV protein E6 označava p53 za proteasomalnu razgradnju te dovodi do smanjenja njegove aktivnosti. Istraživanjima je, također, utvrđeno da prisutnost bilo koje mutacije *TP53* ima nepovoljan učinak na preživljavanje pacijenata oboljelih od tumora glave i vrata. Najčešće mutacije su „missense“ mutacije koje utječu na vezanje DNA. Takve mutacije koje su rezultirale poremećenim vezanjem DNA dovele su do ravnomjerno lošije prognoze zbog ubrzane progresije tumora i smanjenjem terapijskog odgovora tumorskih stanica na liječenje (Zhou i sur., 2016).

### 3. ZAKLJUČAK

Tumor supresorski gen *TP53* jedan je od najproučavanijih i najistraživanijih gena. Prisutnost mutantnog p53 predisponira razvoju tumora, potiče preživljavanje stanica raka te je povezanost s neučinkovitim terapijskim odgovorima i nepovoljnim prognozama velika. Sadašnje istraživačke terapijske strategije uglavnom su usmjerene na vraćanje aktivnosti divljeg tipa mutantnog p53, a proučavanjem uloge *TP53* u normalnim staničnim uvjetima i usporedbom s funkcijama mutiranog oblika p53, nastoji se razviti novi terapijski i personalizirani pristup liječenju različitih vrsta tumora.

Najvažnija buduća istraživanja i otkrića na koje se znanost fokusira su da se ciljalju mutanti p53 sa svim razumijevanjem dominantnog negativnog učinka i poprimanja novih svojstava, zatim objašnjenje kristalne strukture p53, koja daje objašnjenje za pojavu hotspot mutacija. Nadalje, identifikaciju mutacija osjetljivih na temperaturu i sekundarnih mjesta supresorskih mutacija, što ukazuje na to da se mutantni p53 može ponovno smotati u konformaciju divljeg tipa. No, pri razvoju takvih lijekova potrebna je posebna pažnja na to da oni nemaju ili imaju samo ograničen učinak na p53 divljeg tipa kako se ne bi utjecalo na razvoj i progresiju tumora. U konačnici, mutanti p53 nose veliki potencijal za veliki broj istraživanja kako bi se koristili kao biomarkeri za ciljanu antitumorsku terapiju.

#### 4. POPIS LITERATURE

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
2. Baba A. I., Catoi C (2007) *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9557/>> Pristupljeno 18. lipnja 2019.
3. Benjamin, C. L., Ananthaswamy, H. N. (2007) p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicology and applied pharmacology* **224**(3): 241–248 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2080850/>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
4. Campo E., Cymbalista F., Ghia P., Jäger U., Pospisilova S., Rosenquist R., Schuh A., Stilgenbauer S. (2018) TP53 Aberrations In Chronic Lymphocytic Leukemia: An Overview Of The Clinical Implications Of Improved Diagnostics. *Haematologica* **103**: 1956-1968 <<http://www.haematologica.org/content/103/12/1956>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
5. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Development and Causes of Cancer*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>> Pristupljeno 16. lipnja
6. Croce, C.M., (2008) Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med* **358**: 502-11. <<https://pdfs.semanticscholar.org/87c3/0938ae3b6994a22c3ed3172dc3805a54db1f.pdf>> Pristupljeno 14. lipnja 2019.
7. Damjanov, I., Seiwert, S., Jukić, S., Nola, M. (2014) *Patologija*, 4. izd., Medicinska naklada, Zagreb
8. Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Krömer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H. (1998) Presence of a p53 Gene Deletion in Patients With Multiple Myeloma Predicts for Short Survival After Conventional-Dose Chemotherapy. *Blood* **92**(3) <<http://www.bloodjournal.org/content/92/3/802?sso-checked=true>>. Pristupljeno 16. lipnja 2019.
9. Ecke T., Schlechte H. H., Schiemenz K., Sachs M. D., Lenk S. V., Rudolph B. D., Loening S. A. (2010) TP53 Gene Mutations in Prostate Cancer Progression. *Anticancer*

- Research* **30**(5): 1579-1586 <<http://ar.iijournals.org/content/30/5/1579.full>>  
Pristupljeno 20. lipnja 2019.
10. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**(4), 495–516 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
  11. Feng, Z., Zhang, C., Wu, R., Hu, W. (2011) Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol* **3**(1), 44-50 <<http://jmcb.oxfordjournals.org/content/3/1/44.full>>. Pristupljeno 15. lipnja 2015.
  12. Fondation Synergie Lyon Cancer, <<http://www.synergielyoncancer.com/glossary/cancerogenesis>> Pristupljeno 15. lipnja 2019.
  13. Foote M.A. (2009) Oncology Basics Part 1: What Is Cancer? *AMWA JOURNAL*, **20**(2): 52-58
  14. Fridman, J.S., Lowe, S.W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030–9040 <<http://www.nature.com/onc/journal/v22/n56/full/1207116a.html>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
  15. Gasco M., Shami S., Crook T (2002) The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **4**(2):70–76 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138723/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
  16. Giaccia A. J., Kastan M. B. (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Dev.* **12**: 2973-2983 <<http://genesdev.cshlp.org/content/12/19/2973.full.html>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
  17. Giglia-Mari G., Sarasin A. (2003) TP53 mutations in human skin cancers. *Human Mutation Special Issue: Focus on p53 and Cancer* **21**(3): 173-330 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/humu.10179>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
  18. Ha, G.H., Baek, K.H., Kim, H.S., Jeong, S.J., Kim, C.M., McKeon, F., Lee, C.W. (2007) p53 Activation in Response to Mitotic Spindle Damage Requires Signaling via BubR1-Mediated Phosphorylation. *American Association for Cancer Research* **67**(15): 7155-7164 <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/15/7155.full>> Pristupljeno 19. lipnja 2019.
  19. Hussain S. P., Schwank J., Staib F., Wang X. W., Harris C. C. (2007) TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver

- cancer. *Oncogene* **26**: 2166–2176 <<https://www.nature.com/articles/1210279>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
20. Kang J. H., Kim S. J., Noh D. Y., Park I. A., Choe K. J., Yoo O. J. Kang H. (2001) Methylation in the p53 Promoter Is a Supplementary Route to Breast Carcinogenesis: Correlation between CpG Methylation in the p53 Promoter and the Mutation of the p53 Gene in the Progression from Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Ductal Carcinoma. *Laboratory Investigation* **81**: 573–579 <<https://www.nature.com/articles/3780266>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
21. Lin H. H., Farkas, M. E. (2018). Altered Circadian Rhythms and Breast Cancer: From the Human to the Molecular Level. *Frontiers in endocrinology* **9**: 219 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5945923/>> Pristupljeno 23. lipnja 2019.
22. Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., & Berger, S. L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* **19**(2), 1202–1209 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116049/>> Pristupljeno 17. lipnja 2019.
23. Malkin D. (2011) Li-Fraumeni syndrome. *Genes Cancer* **2**(4): 475–484 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135649/>>
24. Markt, S. C., Valdimarsdottir, U. A., Shui, I. M., Sigurdardottir, L. G., Rider, J. R., Tamimi, R. M., ... Mucci, L. A. (2015). Circadian clock genes and risk of fatal prostate cancer. *Cancer causes & control*, **26**(1), 25–33 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4282953/>> Pristupljeno 23. lipnja 2019.
25. Mogi, A., Kuwano, H. (2011) TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* 583929 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035360/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
26. Muller P. A. J., Vousden K. H. (2014) Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* **25**(3): 304–317. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970583/>> Pristupljeno 13. lipnja 2019.
27. Najman, S. (2002) Mutacije gena TP53 u karcinogenezi. *Acta Fac. Med. Naiss* **19**(1), 19-22

28. Nakayama M., Oshima M. (2019) Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol.* **11**(4): 267–276 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6487790/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
29. NIH, National Cancer Institute, <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor>> Pristupljeno 15. lipnja 2019.
30. Noon, A. P., Vlatković, N., Polański, R., Maguire, M., Shawki, H., Parsons, K., & Boyd, M. T. (2010) p53 and MDM2 in renal cell carcinoma: biomarkers for disease progression and future therapeutic targets?. *Cancer* **116**(4): 780–790 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536467/>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
31. Okorokov A. L., Orlova E. V. (2009) Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Structural Biology* **19**: 197-202 Pristupljeno 16. lipnja 2019.
32. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol* **2**, a001008
33. Pecorino L. (2012) Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets and therapeutics. 3rd edition. University of Greenwich, Oxford University Press, <<http://www.hiccph.com/wp-content/uploads/2016/06/Molecular-Biology-of-Cancer-Mechanisms-Third-Edition-Lauren-Pecorino.pdf>>. Pristupljeno 13. lipnja 2019.
34. Pećina-Šlaus N., Bulić-Jakuš F., Radić K. (2005) Tumor supresorski geni. *Medicinar*, **46**; 44-47
35. Perri F., Pisconti S., Della Vittoria Scarpati G. (2016) P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Annals of Translational Medicine* **4**(24): 522 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5233470/>> Pristupljeno 15. lipnja 2019.
36. Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., Olivier, M. (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**, 2157–2165 <<http://www.nature.com/onc/journal/v26/n15/full/1210302a.html>> Pristupljeno 16. lipnja 2019.
37. Robles A. I., Jen J., Harris C. C. (2017) Clinical Outcomes of TP53 Mutations in Cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **6**(9): a026294 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008065/>> Pristupljeno 15. lipnja

38. Sabapathy K., Lane D. P. (2018) Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nature Reviews Clinical Oncology* **15**: 13–30 <<https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.151>> Pristupljeno 23. lipnja 2019.
39. Science Direct, <<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/oncogenes>> Pristupljeno 13. lipnja 2019.
40. Smeenk L., van Heeringen S. J., Koeppl M., Gilbert B., Janssen-Megens E., Stunnenberg H. J., Lohrum M. (2011) Role of p53 Serine 46 in p53 Target Gene Regulation. *PLoS One* **6**(3): e17574 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048874/>> Pristupljeno 18. lipnja 2019.
41. van Oijen M.G.C.T., Slootweg G.J. (2010) Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene p53, *Clinical Cancer Research* **6**: 2138–2145 <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/6/6/2138.long>> Pristupljeno 14. lipnja 2019
42. Vineis P., Schatzkin A., Potter J. D. (2010) Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* **31**(10): 1703–1709 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025741/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
43. Wang, C., Ivanov, A., Lihong Chen, L., Fredericks, W.J., Seto, E., Rauscher, F.J., Chen, J. (2005) MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *The Embo Journal* **24**(18), 3279–3290 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/sj.emboj.7600791/full>> Pristupljeno 17. lipnja 2019.
44. Xu-Monette Z. Y., Medeiros L. J., Li Y., Orlowski R. Z., Andreeff M., Bueso-Ramos C. E., Greiner T. C., McDonnell T. J., Young K. H. (2012) Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* **19**;119(16):3668–83 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22275381>> Pristupljeno 21. lipnja 2019.
45. Zhang, Y., Cao, L., Nguyen, D., Lu, H. (2016) TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Translational cancer research* **5**(6): 650–663 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320227/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.
46. Zhou, G., Liu, Z., Myers, J. N. (2016) TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *Journal of cellular biochemistry* **117**(12): 2682–2692.



<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5493146/>> Pristupljeno 20. lipnja 2019.

47. Zorić, A., Horvat, A., Slade, N. (2010) Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina fl uminensis* **46**(2) 135-143 <[file:///C:/Users/korisnik-1/Downloads/Zoric The p53 family of genes in development and tumors%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/korisnik-1/Downloads/Zoric%20The%20p53%20family%20of%20genes%20in%20development%20and%20tumors.pdf)> Pristupljeno 13. lipnja 2019.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mogeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Nikolina Horčić

ime i prezime studenta