

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina Magdálková**

Funkce p53 proteinu v mitochondriích

The function of p53 protein in mitochondria

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Mgr. Lukáš Stibůrek, Ph.D.

Praha, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23.8.2017

Kateřina Magdálková

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli, RNDr. Mgr. Lukáši Stibůrkovi, Ph.D., a také své rodině za podporu při studiu i psaní bakalářské práce.

## Abstrakt

P53 je známý především jako tumor supresorový faktor, který reguluje expresi množství genů účastnících se regulace buněčného cyklu, oprav DNA a buněčné smrti. Řadu procesů však reguluje i mimo jádro buňky svými na transkripci nezávislými aktivitami. Určité množství proteinu p53 se nalézá i v mitochondriích, kde přispívá k udržování integrity mitochondriálního genomu. Za apoptotických podmínek pak dochází k rapidní translokaci velkého množství proteinu p53 na vnější mitochondriální membránu, kde se účastní pro-apoptické signalizace.

Klíčová slova: p53, mitochondrie, mtDNA, apoptóza

## Abstract

Protein p53 is known as a tumor supressor. In nucleus, p53 regulates the expression of its target genes, which are involved in cell cycle control, DNA repair and cell death. Protein p53 also has transcription-independent activities outside the nucleus. Certain amount of this protein can be found in mitochondria, where it is involved in mitochondrial genom integrity maintaining. Under stress conditions, p53 rapidly translocates to outer mitochondrial membrane, and takes a part in apoptotic signalling pathway.

Keywords: p53, mitochondria, mtDNA, apoptosis

# Obsah

Obsah .....	5
Seznam použitých zkratek .....	7
1 Úvod.....	9
2 Protein p53 a mitochondrie .....	10
2.1 Mitochondrie.....	10
2.2 Protein p53 .....	11
2.2.1 Gen <i>TP53</i> .....	11
2.2.2 Struktura.....	11
3 Translokace .....	12
3.1 Translokace indukovaná stresem.....	12
3.2 Translokace za nestresových podmínek .....	13
4 Mitochondriální DNA.....	14
4.1 Nukleoid.....	14
4.2 Transkripce.....	15
4.3 Replikace .....	15
4.4 Opravy mitochondriální DNA .....	16
4.5 p53 a mitochondriální genom .....	16
4.6 Regulace transkripce p53 cílových genů.....	16
4.6.1 <i>TFAM</i> .....	16
4.6.2 <i>RRM2B</i> .....	17
4.7 Interakce s proteiny v mitochondriální matrix .....	17
4.7.1 Polymeráza $\gamma$ .....	17
4.7.2 <i>TFAM</i> .....	18
4.7.3 <i>HmtSSB</i> .....	19

4.8	Přímá interakce p53 s mtDNA.....	19
5	Mitochondrie v p53 indukované apoptóze .....	21
5.1	Apoptóza.....	21
5.1.1	Kaspázová kaskáda .....	21
5.1.2	Cesty apoptózy.....	21
5.2	p53 závislá apoptóza.....	21
5.2.1	Transkripčně nezávislá indukce apoptózy .....	22
5.2.2	Translokace na vnější mitochondriální membránu a její permeabilizace....	22
5.2.3	Proteiny Bcl2 rodiny .....	23
5.3	Interakce Bcl2 proteinů s p53 .....	24
5.3.1	BclXL.....	24
5.3.2	Bcl2.....	25
5.3.3	Interakce v případě mutací v DNA vazebné doméně p53.....	25
5.3.4	Bax.....	26
5.3.5	Bak.....	26
5.4	Interakce s prokaspázou 3.....	27
6	Závěr.....	28
	Seznam použité literatury .....	29

## Seznam použitých zkratek

APE	Apurinní endonukleáza
ATAD3	Attachment domain 3
BER	Base excision repair
BH	Bcl Homology
DBD	DNA binding domain, DNA vazebná doména
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
GST	Glutathione S-transferase
HAUSP	Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
HIPK	Homeodomain-interacting protein kinase
HMG	High Mobility Group
HSP	Heavy strand promotor
Hsp60/Hsp10	Heat shock protein 60/10
CHCHD	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-like protein
LSP	Light strand promotor
MDM2	E3 ubiquitin ligáza
ML	Myeloid leukemia
mtDNA	Mitochondrial DNA
MTS	Mitochondria-targeting sequence
mtSSB	Mitochondrial single strand binding protein
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide

NLS	Nuclear localization signal
OGG1	8-Oxoguanine glycosylase
OMM	Outer mitochondrial membrane
POLG	Polymerase Gamma gene
POLMRT	Mitochondrial RNA polymerase
POLRMT	RNA polymeráza mitochondriální
RECQL	RecQ like helicase
RKO	Buněčná linie kolorektálního karcinomu
RRM2B	Ribonukleotid reduktáza M2 B
SSB	Single strand binding
TAD	Trans-activating domain
TEFM	Transcription Exchange factor mitochondrial
TFAM	Transcription factor A mitochondrial
TIM	Translocase of the inner membrane
TOM	Translocase of the outer membrane
TWINKLE	Jaderně kódovaná mtDNA helikáza

# 1 Úvod

Vedle svých aktivit v jádře, kde reguluje expresi cílových genů, je protein p53 schopen také transkripčně nezávislých regulací přímou interakcí s mimojadernými proteiny. Tato práce bude pojednávat o jeho interakcích s mitochondriálními proteiny a vlivu těchto interakcí na mitochondrie i buňku. Osud p53 v mitochondriích se liší v závislosti na podmínkách. Za normálních, nestresových podmínek je protein p53 v rámci mitochondrií aktivní zejména v mitochondriální matrix v procesu udržování integrity mitochondriálního genomu, zatímco po různých stresových podnětech dochází k jeho translokaci na vnější mitochondriální membránu, kde se účastní apoptotické signalizace, která vede až k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, spuštění apoptózy a degradaci obsahu buňky, tedy i mitochondrií samotných.

V dalších kapitolách této práce budou blíže popsány aktivity p53 v mitochondriích.

## 2 Protein p53 a mitochondrie

V této kapitole budou blíže popsány mitochondrie a protein p53.

### 2.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou orgány eukaryotních buněk. Pravděpodobně mají endosymbiotický původ, součástí buňky se staly pohlcením prokaryotního organismu, nejspíše alfa-proteobakterie, což se stalo asi před 1,2 miliardy let (Shih & Matzke, 2013). Tuto teorii podporuje mimo jiné existence mitochondriální DNA (mtDNA), která může být pozůstatkem genomu původního endosymbionta. Přestože se většina genů během evoluce přesunula do jádra, mtDNA stále obsahuje několik desítek genů, nezbytných pro jejich funkci. Mitochondriální genom bude detailněji popsán v další kapitole.

V mitochondriích se odehrává oxidativní metabolismus buňky, jako je Krebsův cyklus, oxidativní fosforylace a oxidace mastných kyselin. V buňce mají také signální funkci, například během apoptózy.

Udávaná velikost mitochondrií je asi  $1 \times 0,5 \mu\text{m}$ . Tyto orgány jsou nicméně velmi dynamické, jejich morfologie se může lišit dle typů buněk, a neustále procházejí procesem fúze a dělení, takže namísto jednotlivých kompaktních organel tvoří jakési propojené retikulum (Frey, Renken, & Perkins, 2002).

Mitochondrie mají dvě membrány, které se liší složením i funkcí, vnější je hladká a obsahuje poriny tvořící nescifické póry, kterými prochází volnou difuzí molekuly až do 10 kDa. Vnitřní membrána tvoří četné invaginace, nazvané kristy. Jsou s ní asociovány proteiny dýchacího řetězce, oxidativní fosforylace a transportní proteiny. Oproti vnější má vyšší obsah proteinů a propouští pouze malé molekuly plynů a vody. Vnitřek mitochondrií vyplňuje matrix, ve které jsou obsaženy enzymy oxidativního metabolismu, např. Krebsova cyklu, a další proteiny, RNA, ribozomy a mtDNA. Samostatným kompartmentem je také mezimembránový prostor (Voet & Voet, 2004).

## 2.2 Protein p53

Protein p53, neboli tumor supresorový protein, má v organismu mnoho funkcí. V jádře funguje jako transkripční faktor, který reguluje expresi velkého počtu genů (Riley, Sontag, Chen, & Levine, 2008), mimo jádro přímou interakcí s proteiny reguluje řadu dalších dějů.

Účastní se regulace buněčného cyklu, růstu, proliferace, buněčné smrti, stárnutí a diferenciace, také opravných mechanismů poškození DNA, a energetického metabolismu (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000).

### 2.2.1 Gen *TP53*

Lidský gen pro p53 protein se nazývá *TP53*, nachází se na *p* rameni 17. chromozomu na pozici 13.1 (17p31.1) a má 27 772 bazí. Mutace v tomto genu výrazně zvyšují pravděpodobnost rakovinného bujení, až 50 % všech tumorů má mutaci v *TP53* (Hollstein et al., 1994).

### 2.2.2 Struktura

Protein p53 tvoří 393 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 43,6 kDa a skládá se z několika domén; N-konec proteinu tvoří transaktivací domény, TAD1 (aminokyseliny 17-25) a TAD2 (48- 56), tyto domény aktivují transkripční faktory. Následuje prolin bohatá doména a DNA vazebná doména DBD (aminokyseliny 102-292). Tato doména interaguje v jádře s DNA a v cytoplazmě s cílovými proteiny. Dále je nukleární lokalizační signál (aminokyseliny 305-321) tetramerizační doména (325-355), důležitá pro formaci homotetrameru p53, což je běžná forma aktivního p53, a C-terminální region (aminokyseliny 356-393), který má význam ve stabilizaci interakce s DNA i proteiny. Protein má několik izoform, jejich exprese se liší dle tkání (UniProt, 2017), (Goodsell, 2002).

## 3 Translokace

Proces translokace p53 do mitochondrií probíhá velmi odlišně za normálních, nestresových podmínek, a po stresovém podnětu.

### 3.1 Translokace indukovaná stresem

K rapidní translokaci p53 do mitochondrií dochází po stresovém podnětu, jakým je například genotoxický stres (Natalie D Marchenko, Zaika, & Moll, 2000), hypoxie (Sansome, Zaika, Marchenko, & Moll, 2001), tepelné poškození buňky (Gu et al., 2014) či vystavení gamma záření u radiosenzitivních orgánů (Strom et al., 2006). Translokace není podmíněna přítomností mitochondriální targeting sekvence v proteinu p53, ale je regulována monoubiquitinací E3 ubiquitin ligázou MDM2 cytosolické frakce p53 (Natasha D Marchenko, Wolff, Erster, Becker, & Moll, 2007). Ta za normálního stavu provádí spolu s dalšími enzymy polyubiquitinaci C-terminálních lysinů p53; Lys 370, 372, 373, 381, 382 a 386, čímž je protein určen k degradaci ve 26S proteasomu. Tak je udržována nízká hladina p53 v cytosolu. Po stresovém stimulu ale dochází u p53 k monoubiquitinaci. Monoubiquitinovaný p53 je stabilizován a lokalizován na vnější mitochondriální membránu, kde spouští apoptózu.

Ubiquitinace E3 ligázou MDM2 je regulována jednak celkovou hladinou MDM2 v buňce, jednak posttranslačními modifikacemi p53. Během stresu se snižuje hladina MDM2 v buňce, takže probíhá převážně monoubiquitinace p53 (Li et al., 2003).

Posttranslační modifikace p53 mohou mít vliv na afinitu p53 k MDM2. Jedním ze známých mechanismů změny afinity je fosforylace Ser46 p53. Homeodomain-interacting protein kináza-2 (HIPK2), aktivovaná v reakci na poškození DNA UV zářením, fosforyluje p53 na Ser46 zbytku. (D'Orazi et al., 2002). Tato fosforylace umožní prolyl-izomeráze Pin1 provést konformační změny p53 (Sorrentino et al., 2013), které snižují afinitu p53 k MDM2. Tím se zvýší se poměr monoubiquitinace oproti polyubiquitinaci a tedy i translokace na vnější mitochondriální membránu. MDM2 však neslouží jako transportér p53, v mitochondriích nebyly detekovány žádné jejich komplexy. Po mitochondriální translokaci dojde k rapidní deubiquitinylaci pomocí HAUSP komplexu, apoptoticky aktivní p53 tedy není ubiquitinylovaný (Natasha D Marchenko et al., 2007).

## 3.2 Translokace za nestresových podmínek

Za normálních podmínek je v mitochondriích přítomno jen malé množství proteinu p53, přesto i v absenci stresu dochází k translokaci p53 do mitochondrií, i když v podstatně menší míře. Část cytosolického p53 je importována skrz vnější i vnitřní mitochondriální membránu pomocí transportérů TOM a TIM do matrix, kde se účastní procesů udržujících integritu mtDNA.

Zatím jsou známy tři způsoby translokace neubiquitinovaného p53. Prvním z nich je kolo-localizace s RECQL helikázou. Interakcí s touto helikázou je maskována NLS p53, zatímco 84 aminokyselin na N-konci RECQL4 nese MTS, díky které je komplex lokalizován do blízkosti mitochondriálního nukleoidu (De et al., 2012).

Dalším způsobem lokalizace p53 do mitochondrií je odhalení kryptické MTS proteolytickým štěpením p53 a následný import jeho 40kDa podjednotky. Tímto štěpením dojde ke ztrátě obou transaktivačních domén p53. (Boopathi, Srinivasan, Fang, & Avadhani, 2008).

Během třetí cesty importu dochází ke kovalentní vazbě p53 s importním receptorem, oxidoreduktázou CHCHD4, lokalizovanou v mezimembránovém prostoru, načež proběhne translokace skrz TOM komplex. Tento transport je závislý na oxidativní metabolické aktivitě, při oxidativním stresu se zvýší exprese CHCHD4 a tím i import p53 (Zhuang et al., 2013). Mechanismus, jakým se p53 dostane z mezimembránového prostoru do matrix, není přesně znám.

## 4 Mitochondriální DNA

Lidský mitochondriální genom tvoří dvouřetězcová molekula DNA o délce 16 569 bazí, která obsahuje celkem 37 genů. Konkrétně to jsou geny pro 12S a 16S RNA, 22tRNA, a 13 proteinů oxidativní fosforylace: podjednotky 1, 2 a 3 cytochrom-c-oxidázy, podjednotky 6 a 8 ATP syntházy, jeden protein cytochrom-c-oxidoreduktázy a 7 podjednotek NADH dehydrogenázy. Rozlišujeme řetězec těžký - H, s vyšším obsahem purinů, a lehký - L, s vyšším obsahem pyrimidinů. Geny jsou přítomny na obou řetězcích, 28 genů na L-strand a 9 na H-strand (Anderson et al., 1981).

### 4.1 Nukleoid

Nukleoid je oblast v mitochondrionu, která obsahuje mtDNA asociovanou s proteiny nezbytnými pro udržování její integrity a komplexy replikace a transkripce. Počet nukleoidů v lidské buňce se liší dle typu buňky, od 500 do 12 900 (Bogehagen, 2012), jeden nukleoid savců obsahuje obvykle jednu až dvě molekuly mtDNA (Kukat et al., 2011). S mtDNA je asociováno více než 50 proteinů (Bogehagen, Wang, Shen, & Kobayashi, 2003). Pro správné sbalení nukleoidu je nutný mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), který se nespecificky váže na mtDNA, a je ho takové množství, aby ji byl schopný celou rovnoměrně pokrýt. Vzdálenost mezi dimery TFAM na mtDNA je asi 35 až 40 nukleotidů (Alam et al., 2003).

Proteiny replikačního a transkripčního aparátu jsou také lokalizovány v bezprostřední blízkosti mtDNA a jsou tedy součástí nukleoidu. V mitochondriích jsou to DNA polymerázy  $\gamma$  POLG a POLG2, zajišťující replikaci a proofreading, RNA polymeráza POLMRT, transkripční faktor B, DNA helikáza TWINKLE, LONP1 proteáza a mitochondriální transkripčně elongační faktor TEFM (Bogehagen et al., 2003).

Mitochondrial single strand binding protein (mtSSB), tzv. covering protein, chrání během transkripce a replikace jednořetězcovou mtDNA před štěpením nukleázami a opětovným spojením (Maier et al., 2001).

Protein p53 interaguje s řadou proteinů nukleoidu. V lidských buňkách je nukleoid připojený k vnitřní mitochondriální membráně pomocí ATAD3 proteinu (Bogehagen, Rousseau, & Burke, 2008).

## 4.2 Transkripce

Mezi geny mtDNA je minimum nekódujících sekvencí. Výjimkou je přibližně 1 kbp dlouhý nekódující region, ve kterém se nachází displacement neboli D-loop, struktura, ve které jsou od sebe vlákna dsDNA odděleny a mezi ně je vsunuto třetí vlákno DNA.

Transkripce mtDNA začíná z promotorů HSP1 a HSP2 na H-řetězci a promotoru LSP na L-řetězci. LSP a HSP1 se nachází v D-loop regulačním regionu, promotor HSP2 je downstream od HSP1. Transkripty jsou polycystronní a jsou polyadenylovány (Anderson et al., 1981). Transkripci provádí mitochondriální RNA polymeráza POLRMT (Masters, Stohl, & Clayton, 1987), která pro svou funkci vyžaduje asociované transkripční faktory; mitochondriální transkripční faktor A TFAM, který váže mtDNA skrz své HMG-box domény (Fisher & Clayton, 1985), dále transkripční faktory B TFB1M nebo TFB2M, které stimulují iniciaci transkripce interakcí s TFAM (McCulloch & Shadel, 2003) a fungují jako rRNA adenin methyltransferázy (Cotney & Shadel, 2006; Falkenberg et al., 2002). V přítomnosti těchto faktorů se POLRMT váže na promotor a spouští transkripci (Gaspari, Falkenberg, Larsson, & Gustafsson, 2004).

## 4.3 Replikace

Replikace mtDNA probíhá z jednoho replikačního počátku na každém vlákně,  $O_H$  na H vlákně a z  $O_L$  na L vlákně (Shadel & Clayton, 1997). Podle asymetrického modelu je replikace na obou vláknech kontinuální, nejprve dochází k zahájení DNA syntézy v  $O_H$  na leading H vlákně, poté, co jsou replikovány asi dvě třetiny vlákna, započne replikace lagging L vlákna z  $O_L$  (Tapper & Clayton, 1981). Iniclace replikace je spojená s transkripcí. Primer potřebný k iniciaci v  $O_H$  je transkripčním produktem z LSP promotoru (Shadel & Clayton, 1997). Syntézu DNA provádí polymeráza  $\gamma$  (Ropp & Copeland, 1996). Lidská polymeráza  $\gamma$  je heterotrimer složený z jedné katalytické podjednotky o velikosti 139 kDa a dvou procesivních, 53 kDa velkých podjednotek (Yakubovskaya, Chen, Carrodegua, Kisker, & Bogenhagen, 2006). Katalytická podjednotka má jak polymerázovou, tak 3'5'exonukleázovou aktivitu, provádí také proofreading nově syntetizovaného řetězce (Kaguni, 2004). Rozplétání asi 20 bp dlouhých úseků mtDNA v replikační vidličce se děje pomocí helikázy TWINKLE (Spelbrink et al., 2001). Její aktivita je stimulována proteinem mtSSB (Korhonen, Gaspari, & Falkenberg, 2003).

## 4.4 Opravy mitochondriální DNA

V mitochondriální DNA dochází k mutacím přibližně desetkrát častěji, než v DNA jaderné (Haag-Liautard et al., 2008). MtDNA se nachází v blízkosti komplexů oxidativní fosforylace, během které je produkováno množství volných kyslíkových radikálů. Ty způsobují oxidativní poškození DNA, v jehož důsledku dochází často k přeměně deoxyguanosinu na 8-oxo-7,8-dihydroxo-2'-deoxyguanosin (Breen & Murphy, 1995) (Faucher, Doublie, & Jia, 2012). Nejčastějším a nejlépe popsáním mechanismem opravy poškození mtDNA je Base excision repair – BER (Kazak, Reyes, & Holt, 2012).

První fází BER je rozpoznání poškozené báze a následné štěpení N-glykosidické vazby enzymem glykosylázou. Chybná báze je tak odstraněna a na mtDNA dochází k vytvoření abazického místa, ve kterém je zbylá fosfátová kostra odbourána endonukleázou APE1 (Fromme & Verdine, 2004). Chybějící nukleotidy jsou poté dosyntetizovány polymerázou  $\gamma$  (Yakubovskaya et al., 2006), a DNA je spojena mitochondriální ligázou III (Simsek et al., 2011). Na průběh BER má vliv protein p53, který interaguje s polymerázou  $\gamma$ , tato interakce bude podrobněji popsána níže.

## 4.5 p53 a mitochondriální genom

Protein p53 má významnou úlohu v udržování integrity mitochondriálního genomu. Jednak působí v jádře jako regulátor transkripce genů podstatných pro transkripci, replikaci či opravu mtDNA, jednak v matrix přímo interaguje s mtDNA a proteiny účastnícími se replikace a opravných aktivit, a sám má 3'5'exonukleázovou aktivitu (Mummenbrauer et al., 1996). Obsah mtDNA v buňkách exprimujících p53 je výrazně vyšší, než v p53 deficientních buňkách, což ukazuje na význam exprese p53 pro funkci mitochondriálního genomu (Kulawiec, Ayyasamy, & Singh, 2009).

## 4.6 Regulace transkripce p53 cílových genů

Protein p53 v jádře transkripčně reguluje množství genů. Níže bude popsána transkripční regulace dvou genů, *TFAM* a *RRM2B*, jejichž exprese je podstatná pro funkci mtDNA.

### 4.6.1 *TFAM*

*TFAM* je jaderně kódovaný gen pro mitochondriální transkripční faktor A, který se podílí na mtDNA replikaci, transkripci a sbalení do nukleoidu (Shadel, 2008).

Sekvence myšního genu *TFAM* obsahuje čtyři putativní p53 vazebné konsenzus sekvence, z nichž u jedné byla zjištěna interakce s p53. Schopnost Transaktivace *TFAM* genu proteinem p53 byla prokázána transfekcí p53 deficientních myších embryonálních fibroblastů *wt p53*. U těchto transfektovaných buněk s funkčním p53 byla hladina mRNA *TFAM* výrazně vyšší, než u kontrolních buněk. (Park et al., 2009). V kosterní svalovině myši bez funkčního p53 je snížený obsah mRNA i samotného proteinu *TFAM*. To má za následek snížené množství mtDNA v mitochondriích a celkově nižší fyzickou výdrž<sup>1</sup> těchto myši. Tato regulace je tkáňově specifická, v jaterních či srdečních buňkách nebylo snížené množství *TFAM* pozorováno.

Kromě regulace transkripce je p53 schopen také interagovat s proteinem *TFAM* v mitochondriích a ovlivňovat tím jeho aktivitu, čemuž se budu věnovat níže.

#### 4.6.2 *RRM2B*

Protein p53 je transkripčním regulátorem exprese jaderně kódovaného genu pro ribonukleotid reduktázu M2 B (*RRM2B*) (Tanaka et al., 2000). Produkt tohoto genu je podjednotkou enzymu ribonukleotid reduktázy, která provádí syntézu dNTP potřebných pro replikaci a opravy mtDNA (Pontarin, Ferraro, Bee, Reichard, & Bianchi, 2012). Změna exprese tohoto genu má za následek rozsáhlé deplece mitochondriální DNA (Bourdon et al., 2007).

### 4.7 Interakce s proteiny v mitochondriální matrix

V matrix mitochondrií protein p53 přímo interaguje s několika proteiny zajišťujícími údržbu a replikaci mtDNA. Jednotlivé interakce a jejich význam budou popsány v následujících odstavcích.

#### 4.7.1 Polymeráza $\gamma$

Lidská polymeráza  $\gamma$  je heterotrimer s jednou katalytickou a dvěma procesivními podjednotkami (Kaguni, 2004) a zajišťuje replikaci mtDNA. Během syntézy mtDNA může docházet k zařazení nesprávného nukleotidu, což je vedle oxidativního poškození DNA další možná příčina vzniku mutací. 3'-5' exonukleázová aktivita polymerázy  $\gamma$  sama o sobě ne-

---

<sup>1</sup> exercise capacity

stačí k odstranění těchto nukleotidů. V mitochondriálním extraktu p53 deficientních buněk docházelo k chybnému vytváření dGTP:T párů, které nebyly efektivně odstraňovány, a k akumulaci krátkých úseků mtDNA. Po přidání rekombinantního p53-GST fúzního proteinu došlo k významnému snížení počtu chybných párů (Bakhanashvili et al., 2008). Odstranění chybně spárovaných nukleotidů tedy probíhá efektivněji v přítomnosti p53, který funguje jako externí proofreader a má přímý vliv na přesnost syntézy mtDNA polymerázou  $\gamma$ .

Interakce s p53 má také roli v BER, kdy stimuluje aktivitu polymerázy  $\gamma$  při inkorporaci nukleotidů do mtDNA, a tím zvyšuje účinnost této opravy (de Souza-Pinto, Harris, & Bohr, 2004).

#### 4.7.2 TFAM

Mitochondriální transkripční faktor A – TFAM, je multifunkční protein s hmotností 29 kDa, který se účastní udržování integrity mtDNA na několika úrovních, je nezbytný při replikaci, transkripci, detekci a opravě poškozené DNA a při skládání mtDNA do nukleoidu (Kang & Hamasaki, 2005).

Tento protein je složený ze dvou tandemových High Mobility Group boxů – HMG1 a HMG2, které jsou spojeny 36 aminokyselin dlouhým zásaditým linker regionem, na C konci proteinu je 27 zásaditých aminokyselinových zbytků. TFAM se v mitochondriích vyskytuje v rovnovážném poměru jako dimer a monomer, při nasednutí na mtDNA dimerizuje (Wong, Rajagopalan, Freund, et al., 2009).

TFAM interaguje s proteinem p53. K primární vazbě dochází mezi HMG1 boxem TFAM a transkripční doménou p53, ke slabší sekundární vazbě dochází na C-terminální regulační doméně (Wong, Rajagopalan, Freund, et al., 2009). Komplex TFAM-p53 je stabilizován elektrostatickými a hydrofobními interakcemi. Během vazby dochází ke konformačním změnám u p53, kde se v TAD tvoří dva negativně nabitě helixy (S15-L32 a Q38-D57), spojené linker regionem, které pak TFAM váže.

TFAM se preferenčně váže na poškozenou mtDNA obsahující 8-oxoG (Yoshida et al., 2002) a tak inhibuje aktivitu BER enzymů, jako například OGG1 a APE. Za přítomnosti p53 je tato

aktivita TFAM utlumená. Dochází také k inhibici vazby TFAM na oxidativně poškozenou DNA (Yoshida et al., 2003).

#### 4.7.3 HmtSSB

Protein HmtSSB (Human mitochondrial single strand binding protein) je homotetramer (Wong, Rajagopalan, Townsley, et al., 2009). Primární struktura tohoto proteinu je homologní k SSB proteinu *E. coli*, naopak nemá žádné podobnosti s jaderným ssb proteinem RPA (Van Dyck, Foury, Stillman, & Brill, 1992).

HmtSSB se během replikace a transkripce mtDNA váže na jednořetězcovou DNA v D-loop, čímž zabraňuje opětovnému spojení řetězců (Van Tuyle & Pavco, 1985). Mimo to se účastní balení mtDNA do nukleoidu (Bogenhagen et al., 2003), stimuluje helikázu TWINKLE (Korhonen et al., 2003) i polymerázu  $\gamma$  (Williams & Kaguni, 1995). V přítomnosti mtSSB se procesivita této polymerázy dvakrát zvýší, je také stimulována její 3'-5' exonukleázová aktivita a přesnost syntézy (Farr, Wang, & Kaguni, 1999).

MtSSB interaguje s proteinem p53 skrz obě transaktivační subdomény, TAD1 i TAD2 (Wong, Rajagopalan, Townsley, et al., 2009). Po krátkém genotoxickém stresu mají tyto subdomény fosforylované serinové zbytky Ser 6, 9, 15 a 20, což zvyšuje negativní náboj N-konce p53 a tím i afinitu k mtSSB. Na homotetrameru mtSSB jsou čtyři možná vazebná místa (Raghunathan, Kozlov, Lohman, & Waksman, 2000), lze tedy předpokládat, že je schopen současné interakce jak s p53, tak s mtDNA. Jak již bylo řečeno výše, p53 má slabou 3'-5' exonukleázovou aktivitu a je schopen hydrolyzovat 8-oxodG z mtDNA (Janus et al., 1999). Při interakci s mtSSB se tato aktivita mírně zvyšuje, což je pravděpodobně způsobeno tím, že má komplex mtSSB-p53 vyšší afinitu k DNA, než p53 samotný (Wong, Rajagopalan, Townsley, et al., 2009).

#### 4.8 Přímá interakce p53 s mtDNA

V lidském mitochondriálním genomu bylo nalezeno sedm putativních p53 vazebných sekvencí, které mají vysokou podobnost s konsenzus p53 vazebnou sekvencí, a to na pozici 1553, 1809, 2397, 2903, 4637, 12230 downstream od HSP a na pozici 16190 v D-loop regionu downstream od LSP (Heyne et al., 2004). Pro zjištění interakce s těmito sekvencemi

byly vytvořeny referenční plazmidy s jednotlivými sekvencemi, minimálním beta-globinovým promotorem a luciferázovým genem, a dále kontrolní plazmidy s promotorovou sekvencí p53-responzivního p21-Waf genu a prázdné vektory. Po 32hodinové inkubaci s p53 byla pozorována luciferázová aktivita u kontrolních plazmidů s p21Waf promotorem a u transfektovaných plazmidů obsahujících putativní sekvenci 1553. U této jediné sekvence, lokalizované v 16S rRNA lokusu, byla tedy prokázána schopnost vázat p53, a to s poměrně nízkou afinitou. Jako p53 vazebný motiv byly určeny bp 1553-1572, což je v lidské mtDNA konzervovaná sekvence. Význam této interakce není přesně znám.

## 5 Mitochondrie v p53 indukované apoptóze

### 5.1 Apoptóza

Apoptóza, neboli řízená buněčná smrt, je silně regulovaný proces, během kterého dochází k nevratným morfologickým a fyziologickým změnám, jako je kolaps cytoskeletu, fragmentace DNA a rozpad jaderné membrány.

#### 5.1.1 Kaspázová kaskáda

Kaspázy jsou proteázy, které se za normálních podmínek vyskytují v buňce jako inaktivní prekursorů prokaspázy. Během apoptózy u nich dochází ke štěpení a konformačním změnám, čímž jsou aktivovány. Můžeme je rozdělit na iniciátorové (mezi které řadíme kaspázu 2, 8, 9 a 10) a efektorové (kam patří kaspáza 3, 6 a 7). Jako první jsou během apoptózy aktivovány iniciátorové kaspázy, které provedou proteolytické štěpení a tím aktivaci efektorových kaspáz, a tím dojde ke spuštění proteolytické kaspázové kaskády. Efektorové kaspázy poté štěpí různé substráty a tak probíhá apoptotický proces řízené degradace, který je již nevratný (Nicholson, 1999).

#### 5.1.2 Cesty apoptózy

Apoptóza probíhá několika různými cestami, podle původu podnětu, který ji indukuje, můžeme cesty apoptózy rozdělit na vnitřní – *intrinsic*, pokud podnět pochází zevnitř buňky, a vnější – *extrinsic*, pokud je apoptóza spuštěna v reakci na extracelulární stimul (Alberts, 2017).

### 5.2 p53 závislá apoptóza

Protein p53 je schopen indukovat apoptózu. Transfekcí p53 deficientních buněk Saos-2 adenovirálním expresním vektorem s *wt p53* lze u těchto buněk aktivovat kaspázovou proteolytickou kaskádu a spustit apoptózu (Martin Schuler, Bossy-Wetzler, Goldstein, Fitzgerald, & Green, 2000). V této p53 závislé dráze apoptózy hrají klíčovou roli mitochondrie. V reakci na stresový signál, kterým může být například poškození DNA či hypoxie, se p53 velmi rychle lokalizuje na vnější mitochondriální membránu (Natalie D Marchenko et al., 2000). Poté dojde ke kolapsu membránového potenciálu a tvorbě pórů ve vnější mitochondriální membráně, což má za následek její permeabilizaci a uvolnění cytochromu *c*, Smac, Htra2 a dalších apoptogenních faktorů z mezimembránového prostoru do cytosolu

(Green & Evan, 2002). Tam cytochrom c aktivuje iniciátorovou prokaspázu 9 skrze vazbu na adaptorový protein Apaf1. Ten po navázání cytochromu c tvoří heptamer zvaný apoptosom, který přitahuje a váže molekuly prokaspázy 9. Ty po přiblížení aktivují sebe a poté i další, exekuční prokaspázy, jako je prokaspáza 3, čímž je spuštěna proteolytická kaskáda (Green & Reed, 1998).

Mechanismus, jakým p53 apoptózu indukuje, je velmi komplexní, a probíhá na vícero úrovních. Jako první byla známá transkripčně regulační role p53. V jádře indukuje expresi proapoptotických genů Bax (Toshiyuki & Reed, 1995), NOXA (E. Oda et al., 2000), PUMA (Nakano & Vousden, 2001) a p53AIP1 (K. Oda et al., 2000).

### 5.2.1 Transkripčně nezávislá indukce apoptózy

Aktivace transkripce těchto genů ale není jediný způsob, p53 indukuje apoptózu i u buněk bez transkripční či translační aktivity (Gao & Tsuchida, 1999), (Caelles, Helmberg, & Karin, 1994). Delece či mutace v p53 transaktivační doméně není fatální pro schopnost p53 indukovat apoptózu (Haupt, Rowan, Shaulian, Vousden, & Oren, 1995). Navíc, po přidání rekombinantního p53 do cytosolického extraktu bez přítomnosti buněčných jader dochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a aktivaci kaspázové kaskády (Ding et al., 2000). Všechny tyto poznatky ukazují, že paralelně s regulací transkripce existuje další, rychlejší přímá cesta, kterou p53 indukuje apoptózu. Vzhledem ke klíčové roli mitochondrií bude tato přímá cesta podrobněji popsána.

### 5.2.2 Translokace na vnější mitochondriální membránu a její permeabilizace

Při indukci p53 dependentní apoptózy dochází k rapidní translokaci části p53 na vnější mitochondriální membránu, což bylo zjištěno srovnáním mitochondriálních frakcí buněk s *wt p53* před a po apoptotickém stimulu. Po poškození DNA u buněk myeloidní leukémie (ML-1) a buněk kolorektálního karcinomu (RKO) přidáním camptothecinu, nebo po vyvolání hypoxického stresu ošetřením desferroxoaminem, byla část p53 lokalizována v mitochondriální frakci. Mitochondriální lokalizace byla specifická pouze pro p53, jiné jaderné proteiny detekovány nebyly. Dochází k ní pouze v případě p53 cesty apoptózy. Po indukci p53 nezávislé, TNF cesty apoptózy u ML-1 buněk nebyla lokalizace p53 do mitochondrií pozorována, ačkoliv celková hladina p53 v buňce byla na stejné úrovni, jako po vyvolání

p53 závislé cesty desferroxoaminem. Z toho lze vyvodit závěr, že mitochondriální lokalizace p53 během této cesty apoptózy není pouze důsledkem zvýšeného množství proteinu v buňce či reakcí na poškození organel, ale je důležitou součástí její regulační dráhy (Natalie D Marchenko et al., 2000).

Význam mitochondriální lokalizace p53 byl zkoumán přidáním mitochondriální targeting sekvence k p53. Proteiny BclXL a Bcl2 jsou lokalizovány ve vnější mitochondriální membráně (González-García et al., 1994) (Akao, Otsuki, Kataoka, Ito, & Tsujimoto, 1994). Fúzí C-konce p53 s jejich transmembránovými doménami byly získány fúzní proteiny p53CTB (fúze s BclXL) a p53CTM (fúze s Bcl2). Po transdukci p53 deficientních buněk lymfomu virovými vektory exprimujícími p53CTB nebo p53CTM byly tyto fúzní proteiny translokovány do vnější mitochondriální membrány. V jádře buněk jejich přítomnost detekována nebyla, ani neprobíhala transkripce proapoptotických genů, přesto byla apoptotická aktivita těchto buněk srovnatelná jako u buněk exprimujících wt p53. Mitochondriální lokalizace p53 je tedy postačující k indukci apoptózy. (Mihara et al., 2003) (Talos, Petrenko, Mena, & Moll, 2005).

Po translokaci na vnější mitochondriální membránu dochází k její permeabilizaci a uvolnění cytochromu c. Tento proces je regulován proteiny z Bcl2 rodiny, se kterými p53 fyzicky interaguje a tím reguluje jejich aktivitu (Mihara et al., 2003).

### 5.2.3 Proteiny Bcl2 rodiny

Proteiny Bcl2 rodiny sdílí alespoň jednu ze čtyř homologních domén s proteinem Bcl2, tyto domény se nazývají BH – Bcl Homology, a proteiny podle nich můžeme rozdělit na tři skupiny.

#### 5.2.3.1 BH4

První skupina proteinů, BH4, má s Bcl2 homologní všechny 4 domény. Patří sem Bcl2, BclXL a Mcl1, což jsou proteiny s antiapoptotickou funkcí, které aktivně stabilizují vnější mitochondriální membránu a zabraňují její permeabilizaci (González-García et al., 1994) (Akao et al., 1994). Mohou také interagovat s proapoptotickými Bcl2 a tím je udržovat v inaktivním stavu.

### 5.2.3.2 BH123

Ve druhé skupině BH123 jsou proteiny Bax a Bak s proapoptotickou funkcí, které mají homologní domény BH1, BH2 a BH3. Za normálního stavu jsou v buňce přítomny jako inaktivní monomery, Bax v cytosolu, Bak na OMM (Wolter et al., 1997). Po apoptotickém stimulu tvoří homoolomery a translokují se na OMM, což způsobí její permeabilizaci (Wei et al., 2000).

### 5.2.3.3 BH3 only

Proteiny třetí skupiny BH3 jsou PUMA, NOXA, Bid a další, mají proapoptotickou funkci, převádí death signál do mitochondrií. Za normálního stavu se nachází v cytosolu, po apoptotickém stimulu proběhne translokace na OMM (Huang & Strasser, 2000), tam svou BH3 doménou interagují s Bcl2 a BclXL, čímž inaktivují jejich stabilizační funkci, nebo s BH123, čímž je aktivují a umožní jejich oligomerizaci (Emily et al., 2001).

## 5.3 Interakce Bcl2 proteinů s p53

Proteiny Bcl2 rodiny spolu mohou tvořit dimery (Oltval, Milliman, & Korsmeyer, 1993). Po translokaci na OMM s nimi p53 fyzicky interaguje a tím reguluje jejich aktivitu (Natalie D Marchenko et al., 2000). Jednotlivé interakce budou níže podrobněji popsány.

### 5.3.1 BclXL

BclXL je asociován s vnější mitochondriální membránou, kterou stabilizuje a zabraňuje její permeabilizaci. Tvorba komplexů s p53 byla detekována v p53 deficientních buňkách po kotransfekci wt p53 s BclXL, stejně tak v HeLa buňkách exprimujících BclXL a to s mitochondriálně targetovaným i wild type p53. Této interakce se neúčastní protein Bax, po trojitě kotransfekci s ním vznikaly opět pouze p53/BclXL komplexy, a to ve stejném množství, jako v nepřítomnosti Bax. Komplexy byly detekovány také mezi proteiny čistě endogenního původu, v mitochondriálním izolátu buněk krátkodobě vystavených působení camptothecinu, tedy po apoptotickém stimulu (Mihara et al., 2003).

NMR metodou bylo zjištěno, že interakce probíhá skrz DNA vazebnou doménu p53. (Petros, Olejniczak, & Fesik, 2004). BclXL během interakce neprodělá zásadní konformační změny, kontakt s p53 zajišťuje region na C-konci  $\alpha 1$  helixu BH4 a další dvě loops

mezi helixy  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  a  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ . Tento region není totožný s tím, který interaguje s BH3 proteiny.

Formací komplexů s BclXL p53 inhibuje jeho stabilizační funkci a tak přímo indukuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Při overexpresi BclXL a Bcl2 dochází k zastavení p53 závislé apoptózy, p53 nestačí tvořit inhibiční komplexy BclXL a OMM zůstává stabilizována (M Schuler & Green, 2001).

### 5.3.2 Bcl2

Protein Bcl2 je strukturně velmi podobný BclXL, a i on dle očekávání tvoří komplexy s p53, i když s menší afinitou. Jejich formace byla detekována imunoafinitní chromatografií extrahovaných mitochondriálních proteinů ML-1 buněk, krátkodobě vystavených poškození DNA camptothecinem. Kontakt probíhá skrz DNA vazebnou doménu, přičemž ani u jednoho z proteinů nedochází k zásadním konformačním změnám (Petros et al., 2004). Tuto vazbu dokáže rozrušit BH3 protein Bid, který se k Bcl2 váže s vyšší afinitou.

### 5.3.3 Interakce v případě mutací v DNA vazebné doméně p53

Z interakcí s BH4 proteiny vyplývá, že DNA vazebná doména p53 má dvojí funkci, slouží nejen při transkripční regulaci, ale také při přímé cestě p53 závislé apoptózy. Proto byly provedeny experimenty zjišťující, jaký vliv má mutace v DBD p53 na schopnost proteinu indukovat apoptózu.

Proteiny p53 exprimují buňky ML-1 a buňky nádorové linie MDA 231, MDA 468 a další, exprimující mutantní p53 s běžnými mutacemi v DBD, byly vystaveny působení camptothecinu po dobu 3,5 hodin, takže došlo k indukci apoptózy. Imunoprecipitací bylo detekováno obdobné množství p53 ve všech buňkách. U buněk s mutantním p53 však nedocházelo k tvorbě komplexů s Bcl2.

Mutantní p53 s nefunkční DBD proto nejsou schopny vyvolat permeabilizaci OMM a uvolnění cytochromu c transkripčně nezávislým mechanismem, stejně tak nemohou indukovat apoptózu transkripční aktivací proapoptotických genů (Petros et al., 2004), (Tomita et al., 2006).

#### 5.3.4 Bax

Bax je BH123 protein s proapoptotickou aktivitou, za normálního stavu se nachází v cytosolu jako neaktivní monomer, může být ve vazbě s antiapoptotickými Bcl2. Během apoptózy je aktivován interakcí s BH3 doménou proteinů Bid nebo Bim, poté projde konformačními změnami, translokuje se do OMM, oligomerizuje a tvoří póry v OMM, čímž ji permeabilizuje (Czabotar, Lessene, Strasser, & Adams, 2014).

Nepostradatelnost tohoto proteinu pro průběh transkripčně nezávislé p53 dependentní apoptózy byla potvrzena experimenty s myšimi embryonálními fibroblasty (MEF), u kterých byl inhibován nukleární import p53 pomocí WGA. U MEF exprimujících Bax byla po UV ozáření spuštěna apoptóza, u Bax deficientních MEF k apoptóze nedošlo.

Po interakci Bax s p53 dojde k permeabilizaci OMM bez přítomnosti jakýchkoliv dalších apoptotických proteinů. Nebyla zjištěna tvorba komplexů p53/Bax. p53 aktivuje Bax tzv. Hit-and-Run mechanismem, stejně jako BH3 only proteiny Bid a Bim. Jeho aktivaci umožňuje také tím, že vazbou BclXL uvolní Bax z inhibičního komplexu s BclXL – k tomu dochází již při ekvimolární koncentraci p53 a BclXL, zatímco k zpětnému rozrušení komplexu BclXL/p53 a tvorbě BclXL/Bax je třeba 50krát vyšší koncentrace Bax (Chipuk et al., 2004).

Význam interakce p53 a Bax tedy spočívá jak v přímé aktivaci tohoto proteinu, tak v uvolnění Bax z inhibičních komplexů s jinými Bcl2 proteiny.

#### 5.3.5 Bak

Protein Bak je strukturně a funkčně podobný Bax, na rozdíl od něj se ale nachází v OMM. Za normálních podmínek tvoří komplexy s BclXL a Mcl-1, čímž je udržován v inaktivním stavu. Pro aktivaci je nutné rozrušení těchto komplexů a nahrazení Bak v nich BH3 only proteiny (Willis et al., 2005). Poté může aktivovaný Bak formovat homooligomery a permeabilizovat OMM. Aktivace probíhá i interakcí s p53, který s Bak tvoří komplexy, přičemž spolu interagují DNA-vazebná doména p53 a N-terminální alfa helix BH3 domény BAK. Protein p53 také dokáže rozrušit inhibiční komplexy Bak/Mcl-1. (Leu, Dumont, Hafey, Murphy, & George, 2004), (Pietsch et al., 2008).

## 5.4 Interakce s prokaspázou 3

Prokaspáza 3 je v buňce asociována zejména s vnější mitochondriální membránou, v komplexu s Hsp60 a Hsp10 (Leu et al., 2004) (Mihara et al., 2003). Po indukci apoptózy je aktivována, disociuje z Hsp komplexu a putuje do cytosolu, malá část však zůstává v mitochondriích (Natalie D Marchenko et al., 2000) (Mihara et al., 2003). Během apoptózy tato prokaspáza interaguje s p53, komplexy s p53 byly detekovány v mitochondriích Wm115 buňkách melanomu exprimujících *wt p53* po ošetření camptothecinem. Imunoprecipitací kaspázy 3 nebo p53 z lyzátu H1299 buněk bylo zjištěno, že komplexy s kaspázou 3 za apoptotických podmínek tvoří asi 1-3 % celkového buněčného p53. Zajímavé je, že na rozdíl od Bcl2 a BclXL, mutantní p53 proteiny jako R175H a R273H jsou schopny interagovat s kaspázou 3 na podobné úrovni jako wtp53, nicméně má takováto interakce vliv na schopnost kaspázy být aktivována iniciátorovou kaspázou 9. Po přidání kaspázy 9 k mitochondriím buněk transfekovaných R175H, exprimujících mutantní p53, docházelo k výrazně nižšímu štěpení prokaspázy 3 a tvorbě aktivní kaspázy 3, než u kontrolních mitochondrií s wtp53 (Frank, Pietsch, Dumont, Tao, & Murphy, 2011). V úvahu přichází několik možných mechanismů, jakým tato interakce ovlivňuje průběh apoptózy. Interakce p53 s prokaspázou 3 může usnadňovat její štěpení a aktivaci kaspázou 9. Kaspáza 3 může protein p53 štěpit, a to na dvou specifických místech, konkrétně na Asp21 a Asp186, takže vznikají čtyři fragmenty p53(22-393), p53(1-186), p53(22-186) a p53(187-393). Dva z těchto fragmentů obsahují nukleárně lokalizační signální sekvenci, další dva, konkrétně p53(1-186) a p53(22-186) se lokalizují do mitochondrií, což vyvolá změnu membránového potenciálu (Sayan, Sayan, Knight, Melino, & Cohen, 2006). Interakce p53 s kaspázou 3 může tedy také přímo urychlit permeabilizaci vnější mitochondriální membrány.

## 6 Závěr

Je zřejmé, že aktivity proteinu p53 v mitochondriích nejsou pro funkci buňky jako celku zanedbatelné. Ze dvou mitochondriálních aktivit p53, které zde byly popsány, je lépe prozkoumaná permeabilizace vnější mitochondriální membrány a následná indukce apoptózy. Zajímavým poznatkem je, že proteiny s mutací v DNA vazebné doméně, což jsou u p53 jedny z častých mutací, nejsou schopny indukovat nejen transkripčně-závislou, ale ani mitochondriální cestu apoptózy, což má jistě význam pro budoucí výzkum v oblasti nádorových onemocnění.

Už méně je popsána funkce p53 v údržbě mitochondriálního genomu, a to i přesto, že má tato jeho role pro organismus nemalý význam. Funkční p53 v mitochondriích je totiž podstatný pro efektivní opravy mutací mtDNA, které mohou vést k mitochondriálním poruchám. Tato oblast by si jistě zasloužila další výzkum.

## Seznam použité literatury

- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., & Tsujimoto, Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer research*, *54*(9), 2468-2471.
- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., . . . Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic acids research*, *31*(6), 1640-1645.
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*: Garland science.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M., Coulson, A. R., Drouin, J., . . . Sanger, F. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
- Bakhanashvili, M., Grinberg, S., Bonda, E., Simon, A., Moshitch-Moshkovitz, S., & Rahav, G. (2008). p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death & Differentiation*, *15*(12), 1865-1874.
- Bogenhagen, D. F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9), 914-920.
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D., & Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(6), 3665-3675.
- Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L., & Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Molecular & Cellular Proteomics*, *2*(11), 1205-1216.
- Boopathi, E., Srinivasan, S., Fang, J.-K., & Avadhani, N. G. (2008). Bimodal protein targeting through activation of cryptic mitochondrial targeting signals by an inducible cytosolic endoprotease. *Molecular cell*, *32*(1), 32-42.
- Bourdon, A., Minai, L., Serre, V., Jais, J.-P., Sarzi, E., Aubert, S., . . . Arakawa, H. (2007). Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics*, *39*(6), 776-780.
- Breen, A. P., & Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*(6), 1033-1077.
- Caelles, C., Helmborg, A., & Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*, *370*(6486), 220.
- Cotney, J., & Shadel, G. S. (2006). Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *Journal of molecular evolution*, *63*(5), 707-717.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(1), 49.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S. i., . . . Del Sal, G. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nature cell biology*, *4*(1), 11.
- De, S., Kumari, J., Mudgal, R., Modi, P., Gupta, S., Futami, K., . . . Mohanty, D. (2012). RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *J Cell Sci*, *125*(10), 2509-2522.

- de Souza-Pinto, N. C., Harris, C. C., & Bohr, V. A. (2004). p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. *Oncogene*, *23*(39), 6559-6568.
- Ding, H.-F., Lin, Y.-L., McGill, G., Juo, P., Zhu, H., Blenis, J., . . . Fisher, D. E. (2000). Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(49), 38905-38911.
- Emily, H.-Y. C., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X L sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, *8*(3), 705-711.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.-G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature genetics*, *31*(3), 289-294.
- Farr, C. L., Wang, Y., & Kaguni, L. S. (1999). Functional Interactions of Mitochondrial DNA Polymerase and Single-stranded DNA-binding Protein TEMPLATE-PRIMER DNA BINDING AND INITIATION AND ELONGATION OF DNA STRAND SYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(21), 14779-14785.
- Faucher, F., Doublé, S., & Jia, Z. (2012). 8-oxoguanine DNA glycosylases: One lesion, three subfamilies. *International journal of molecular sciences*, *13*(6), 6711-6729.
- Fisher, R., & Clayton, D. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(20), 11330-11338.
- Frank, A. K., Pietsch, E. C., Dumont, P., Tao, J., & Murphy, M. E. (2011). Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. *Cancer biology & therapy*, *11*(8), 740-745.
- Frey, T., Renken, C., & Perkins, G. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1555*(1), 196-203.
- Fromme, J. C., & Verdine, G. L. (2004). Base excision repair. *Advances in protein chemistry*, *69*, 1-41.
- Gao, C., & Tsuchida, N. (1999). Activation of Caspases in p53-induced Transactivation-independent Apoptosis. *Cancer Science*, *90*(2), 180-187.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2004). The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO Journal*, *23*(23), 4606-4614.
- González-García, M., Pérez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L., Thompson, C., & Nunez, G. (1994). bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, *120*(10), 3033-3042.
- Goodsell, D. (2002). RCSB PDB Molecule of the Month. Retrieved from <http://pdb101.rcsb.org/motm/31>
- Green, D. R., & Evan, G. I. (2002). A matter of life and death. *Cancer cell*, *1*(1), 19-30.
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, *281*(5381), 1309-1311.

- Gu, Z., Wang, H., Li, L., Liu, Y., Deng, X., Huo, S., . . . Su, L. (2014). Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Scientific reports*, 4.
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., & Keightley, P. D. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6(8), e204.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K., & Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes & Development*, 9(17), 2170-2183.
- Heyne, K., Mannebach, S., Wuertz, E., Knaup, K., Mahyar-Roemer, M., & Roemer, K. (2004). Identification of a putative p53 binding sequence within the human mitochondrial genome. *FEBS letters*, 578(1-2), 198-202.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M., Soussi, T., Fuchs, R., Sørlie, T., . . . Harris, C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic acids research*, 22(17), 3551.
- Huang, D. C., & Strasser, A. (2000). BH3-only proteins—essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103(6), 839-842.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303(5660), 1010-1014.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., & Deppert, W. (1999). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2155-2168.
- Kaguni, L. S. (2004). DNA polymerase  $\gamma$ , the mitochondrial replicase 1. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 293-320.
- Kang, D., & Hamasaki, N. (2005). Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042(1), 101-108.
- Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(10), 659-671.
- Korhonen, J. A., Gaspari, M., & Falkenberg, M. (2003). TWINKLE has 5'→3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48627-48632.
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spähr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., & Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13534-13539.
- Kulawiec, M., Ayyasamy, V., & Singh, K. K. (2009). p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway. *Journal of carcinogenesis*, 8(1), 8.
- Leu, J. I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., & George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology*, 6(5), 443.

- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., & Gu, W. (2003). Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, *302*(5652), 1972-1975.
- Maier, D., Farr, C. L., Poeck, B., Alahari, A., Vogel, M., Fischer, S., . . . Schneuwly, S. (2001). Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology of the cell*, *12*(4), 821-830.
- Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K., & Moll, U. M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO Journal*, *26*(4), 923-934.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., & Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria a potential role in apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(21), 16202-16212.
- Masters, B. S., Stohl, L. L., & Clayton, D. A. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, *51*(1), 89-99.
- McCulloch, V., & Shadel, G. S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Molecular and cellular biology*, *23*(16), 5816-5824.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell*, *11*(3), 577-590.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Müller, B., Wiesmüller, L., Deppert, W., & Grosse, F. (1996). p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, *85*(7), 1089-1099.
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*, *7*(3), 683-694.
- Nicholson, D. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, *6*(11), 1028-1042.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., . . . Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, *288*(5468), 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., . . . Nakamura, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, *102*(6), 849-862.
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, *74*(4), 609-619.
- Park, J.-Y., Wang, P.-y., Matsumoto, T., Sung, H. J., Ma, W., Choi, J. W., . . . Kang, J.-G. (2009). p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circulation research*, *105*(7), 705-712.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1644*(2), 83-94.

- Pietsch, E. C., Perchiniak, E., Canutescu, A. A., Wang, G., Dunbrack, R. L., & Murphy, M. E. (2008). Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 21294-21304.
- Pontarin, G., Ferraro, P., Bee, L., Reichard, P., & Bianchi, V. (2012). Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13302-13307.
- Raghunathan, S., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., & Waksman, G. (2000). Structure of the DNA binding domain of E. coli SSB bound to ssDNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(8), 648.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5), 402.
- Ropp, P. A., & Copeland, W. C. (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase  $\gamma$ . *Genomics*, 36(3), 449-458.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D., & Moll, U. M. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. *FEBS letters*, 488(3), 110-115.
- Sayan, B. S., Sayan, A. E., Knight, R. A., Melino, G., & Cohen, G. M. (2006). p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13566-13573.
- Shadel, G. S. (2008). Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. *The American journal of pathology*, 172(6), 1445-1456.
- Shadel, G. S., & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 409-435.
- Shih, P. M., & Matzke, N. J. (2013). Primary endosymbiosis events date to the later Proterozoic with cross-calibrated phylogenetic dating of duplicated ATPase proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12355-12360.
- Schuler, M., Bossy-Wetzell, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., & Green, D. R. (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7337-7342.
- Schuler, M., & Green, D. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis: Portland Press Limited.
- Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A.-K., . . . Jasin, M. (2011). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature*, 471(7337), 245-248.
- Sorrentino, G., Mioni, M., Giorgi, C., Ruggeri, N., Pinton, P., Moll, U., . . . Del Sal, G. (2013). The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53. *Cell death and differentiation*, 20(2), 198.
- Spelbrink, J. N., Li, F.-Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.-P., Tariq, M., . . . Morandi, L. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature genetics*, 28(3), 223-231.

- Strom, E., Sathe, S., Komarov, P. G., Chernova, O. B., Pavlovska, I., Shyshynova, I., . . . Skaliter, R. (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nature chemical biology*, 2(9), 474.
- Talos, F., Petrenko, O., Mena, P., & Moll, U. M. (2005). Mitochondrially targeted p53 has tumor suppressor activities in vivo. *Cancer research*, 65(21), 9971-9981.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., . . . Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 404(6773), 42-49.
- Tapper, D. P., & Clayton, D. (1981). Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5'ends of nascent daughter strands. *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 5109-5115.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., . . . Moll, U. M. (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8600-8606.
- Toshiyuki, M., & Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293-299.
- UniProt, C. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. Retrieved from <http://www.uniprot.org/uniprot/P04637>
- Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., & Brill, S. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *The EMBO Journal*, 11(9), 3421.
- Van Tuyle, G. C., & Pavco, P. A. (1985). The rat liver mitochondrial DNA-protein complex: displaced single strands of replicative intermediates are protein coated. *The Journal of cell biology*, 100(1), 251-257.
- Voet, D., & Voet, J. (2004). *Biochemistry*, vol. 1: Wiley, NJ.
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-310.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., . . . Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & Development*, 14(16), 2060-2071.
- Williams, A. J., & Kaguni, L. S. (1995). Stimulation of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase by single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 860-865.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., . . . Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, 19(11), 1294-1305.
- Wolter, K. G., Hsu, Y.-T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X.-G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology*, 139(5), 1281-1292.
- Wong, T. S., Rajagopalan, S., Freund, S. M., Rutherford, T. J., Andreeva, A., Townsley, F. M., . . . Fersht, A. R. (2009). Biophysical characterizations of human mitochondrial transcription factor A and its binding to tumor suppressor p53. *Nucleic acids research*, 37(20), 6765-6783.

- Wong, T. S., Rajagopalan, S., Townsley, F. M., Freund, S. M., Petrovich, M., Loakes, D., & Fersht, A. R. (2009). Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic acids research*, *37*(2), 568-581.
- Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J. A., Kisker, C., & Bogenhagen, D. F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  forms a heterotrimer. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(1), 374-382.
- Yoshida, Y., Izumi, H., Ise, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., . . . Itoh, H. (2002). Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, *295*(4), 945-951.
- Yoshida, Y., Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Itoh, H., Kang, D., & Kohno, K. (2003). P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer research*, *63*(13), 3729-3734.
- Zhuang, J., Wang, P.-y., Huang, X., Chen, X., Kang, J.-G., & Hwang, P. M. (2013). Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17356-17361.