

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Magdálková

Funkce proteinu p53 v mitochondriích

The function of p53 protein in mitochondria

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.

Praha, 2018

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, 11.1.2018

Kateřina Magdálková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, doc. RNDr. Martinu Kalousovi, CSc., za jeho vstřícnost, pomoc a rady. Dále děkuji své rodině za podporu při psaní bakalářské práce.

Abstrakt

Protein 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. Za fyziologických podmínek se určité množství proteinu p53 nachází v mitochondriích, kde přispívá k udržování integrity mitochondriálního genomu. Po stresovém stimulu pak dochází k rychlé translokaci velkého množství proteinu p53 na vnější mitochondriální membránu i do mitochondriální matrix, kde se účastní indukce programované buněčné smrti, apoptózy či nekrózy.

Klíčová slova: p53, mitochondrie, mtDNA, apoptóza, nekróza

Abstract

Protein p53 is known as a tumor suppressor. 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. Under physiological conditions, certain amount of this protein can be found in mitochondria, where it is involved in mitochondrial genome integrity maintaining. Under stress conditions, p53 protein rapidly translocates to outer mitochondrial membrane or mitochondrial matrix, and takes a part in apoptotic or necrotic signaling pathway.

Keywords: p53, mitochondria, mtDNA, apoptosis

Seznam použitých zkratk

Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
APE	Apurinní endonukleáza
BER	Base excision repair
BH	Bcl Homology
CypD	Cyclophilin D
DBD	DNA binding domain, DNA vazebná doména
D-loop	Displacement loop
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
Drp1	Dynamine-related protein 1
GST	Glutathione S-transferase
HAUSP	Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
HIPK	Homeodomain-interacting protein kinase
HMG	High Mobility Group
HSP	Heavy strand promotor
Hsp	Heat shock protein 60/10
CHCHD	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-like protein
IMS	intermembrane space, mezimembránový prostor
LSP	Light strand promotor
MDM2	E3 ubiquitin ligáza
ML-1	Myeloid leukemia 1
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mPT	Mitochondrial permeability transition
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mtDNA	Mitochondrial DNA
MTS	Mitochondria-targeting sequence, mitochondriální cílová sekvence
mtSSB	Mitochondrial single strand binding protein
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLS	Nuclear localization signal, jaderný lokalizační signál
OMM	Outer mitochondrial membrane

OSCP	Oligomycin sensitivity conferring protein
PFT- μ	Pifithrin- μ
POLG	Polymerase Gamma gene
POLMRT	Mitochondrial RNA polymerase
POLRMT	RNA polymeráza mitochondriální
RECQL4	RecQ like helicase 4
RKO	Buněčná linie kolorektálního karcinomu
RRM2B	Ribonukleotid reduktáza M2 B
RTS	Rothmund Thompson syndrome
SPG7	Spastic Paraplegia 7
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
VDAC	Voltage-dependent anion channel

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Protein p53	2
2.1 Gen <i>TP53</i>	2
2.2 Struktura	2
2.3 Posttranslační modifikace.....	3
3 Translokace proteinu p53 do mitochondrií	4
3.1 Translokace za fyziologických podmínek	4
3.1.1 Translokace závislá na oxidativním metabolismu a CHCHD4	4
3.1.2 Translokace závislá na RECQL4 helikáze.....	5
3.2 Translokace proteinu p53 za podmínek vedoucích k programované buněčné smrti.....	6
3.2.1 Průběh translokace	6
3.2.2 Funkce MDM2 E3 ubiquitin ligázy	6
3.2.3 Regulace ubiquitinace proteinu p53 MDM2 ligázou.....	7
3.2.4 Cílová lokalizace proteinu p53 v mitochondriích	8
3.2.5 Využití regulace mitochondriální translokace proteinu p53	8
4 Úloha proteinu p53 v transkripčně nezávislé indukci apoptózy	10
4.1 Apoptóza.....	10
4.1.1 Kaspázová kaskáda	10
4.2 Indukce apoptózy proteinem p53 nezávislá na transkripci.....	10
4.2.1 Mitochondriální translokace p53	11
4.2.2 Permeabilizace vnější mitochondriální membrány	11
4.3 Interakce proteinu p53 s proteiny Bcl2 rodiny	12
4.3.1 Proteiny Bcl2 rodiny	12
4.3.2 Interakce s antiapoptotickými proteiny BclXL, Bcl2 a Mcl1	12
4.3.3 Interakce s proapoptotickými proteiny Bax a Bak.....	13
4.3.4 Význam DNA vazebné domény proteinu p53 v indukci apoptózy	14
4.4 Interakce s proteinu p53 s prokaspázou 3.....	14
4.5 Klinické využití regulace apoptózy	14
5 Úloha proteinu p53 v transkripčně nezávislé indukci nekrózy	16
5.1 Nekróza.....	16
5.2 Indukce nekrózy proteinem p53	16
5.2.1 Mitochondriální póry přechodné propustnosti.....	16
5.2.2 Interakce proteinu p53 s cyclophilinem D	17
5.3 Využití regulace indukce nekrózy proteinem p53	18

5.3.1 Inhibice mitochondriální translokace proteinu p53 a její klinické využití.....	18
6 Funkce proteinu p53 v udržování integrity mitochondriálního genomu.....	20
6.1 Nukleoid	20
6.2 Transkripce	20
6.3 Replikace	21
6.4 Opravy mitochondriální DNA	21
6.5 Regulace transkripce genů účastnících se údržby mtDNA proteinem p53	21
6.6 Interakce s proteiny nukleoidu	22
6.6.1 Polymeráza γ	22
6.6.2 TFAM	23
6.6.3 HmtSSB	24
6.7 Přímá interakce proteinu p53 s mtDNA	25
6.8 Důsledky působení proteinu p53 v mitochondriální matrix	25
7. Závěr.....	27
Seznam použité literatury	28

1 Úvod

Protein p53 má celou v buňce celou řadu funkcí. Vedle svých transkripčně regulačních aktivit v jádře je schopen také na transkripci nezávislých regulací přímou interakcí s cytosolickými proteiny. Tato práce se zabývá funkcí proteinu p53 v mitochondriích, popisuje interakce s mitochondriálními proteiny a genomem a důsledky těchto interakcí pro funkci mitochondrií i celé buňky.

V buňce můžeme rozlišit dvě samostatné frakce proteinu p53, jadernou a cytosolickou. Protein p53 uvnitř a na povrchu mitochondrií pochází z cytosolické frakce, a jeho obsah se liší v závislosti na aktuálním stavu buňky. Za fyziologických podmínek je malé množství proteinu p53 lokalizováno v blízkosti mitochondriálního nukleoidu, kde se účastní procesů zajišťujících údržbu kvality mitochondriální DNA. Po stresovém podnětu dochází k rychlé translokaci velkého množství proteinu p53 na mitochondriální povrch, kde interakcí s proteiny Bcl2 rodiny indukuje spuštění apoptózy, a případně i do mitochondriální matrix, kde interakcí s cyclophilinem D aktivuje otevření mitochondriálních pórů přechodné propustnosti a spuštění nekrózy.

2 Protein p53

Protein p53, neboli tumor supresorový protein, má v organismu celou řadu funkcí. Účastní se regulace buněčného cyklu, růstu, proliferace, buněčného dělení, senescence a diferenciacce. Je schopen iniciovat buněčnou smrt (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000).

V jádře buňky působí protein p53 jako transkripční faktor regulující expresi množství genů (Riley, Sontag, Chen, & Levine, 2008), mimo jádro se přímou fyzickou interakcí s proteiny účastní buněčných procesů. Poruchy signalizačních drah proteinu p53 mohou být příčinou vzniku rakoviny.

2.1 Gen *TP53*

Lidský gen kódující protein p53 se nazývá *TP53*, nachází se na *p* rameni 17. chromozomu na pozici 13.1 (17p31.1) a má 27 772 bází. Až 50 % lidských rakovinných buněk má mutaci v *TP53* genu, jedná se tedy o nejčastější cíl mutace u rakoviny lidí (Olivier, Hollstein, & Hainaut, 2010). Vrozená predispozice pro rozvoj rakoviny způsobená mutací v *TP53* genu se nazývá syndrom Li-Fraumeni.

2.2 Struktura

Protein p53 tvoří 393 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 43,6 kDa a skládá se z následujících domén; na N-konci proteinu jsou dvě transkripční domény, TAD1 (aminokyseliny 17-25) a TAD2 (48-56), tyto domény aktivují transkripční faktory. Následuje doména bohatá na prolin (61-94) a DNA vazebná doména (DBD) (102-292), která zprostředkovává interakci s DNA i cílovými proteiny. Dále je jaderný lokalizační signál NLS (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 isoform, všechny kóduje gen *TP53* a jejich exprese se liší dle tkání (UniProt, 2017).



Obrázek 1. Struktura proteinu p53 s barevně odlišenými doménami: *Transaktivační domény – modrá a zelená, Prolin bohatá doména – oranžová, DNA vazebná doména – fialová, Tetramerizační doména - žlutá, C-terminální doména - šedá. Převzato a upraveno podle (Saha, Kar, & Sa, 2015).*

Běžnou aktivní formou proteinu p53 je homotetramer, kde spolu jednotlivé monomery interagují svými tetramerizačními doménami. Struktura proteinu p53 v mitochondriích v současné době není zcela známa, může mít formu tetrameru i monomeru (Kristina Heyne et al., 2008). Pro indukci apoptózy na vnější mitochondriální membráně je postačující monomer proteinu p53, případně pouze jeho DNA vazebná doména (Mossalam, Matissek, Okal, Constance, & Lim, 2012). Během indukce nekrózy v mitochondriální matrix má protein p53 formu tetrameru (Vaseva et al., 2012).

2.3 Posttranslační modifikace

Aktivita proteinu p53 je regulována posttranslačními modifikacemi. Fosforylace protein p53 stabilizuje a zvyšuje jeho DNA vazebnou aktivitu (Ashcroft & Vousden, 1999). Acetylace také pozitivně reguluje stabilitu proteinu p53 a jeho transkripčně aktivační funkce (Barlev et al., 2001). Polyubiquitinace proteinu p53 slouží jako signál k degradaci, kdežto monoubiquitinace působí stabilizačně (Li et al., 2003).

3 Translokace proteinu p53 do mitochondrií

Naprostá většina mitochondriálních proteinů je syntetizována na cytosolických ribosomech a do organel následně dopravena procesem zvaným translokace. Proteiny určené pro transport do mitochondrií mají většinou na svém N-konci mitochondriální cílovou sekvenci (MTS). V cytosolu jsou tyto proteiny chráněny proti sbalení interakcí s chaperony Hsp70. Průchod skrz membrány mitochondrií zajišťují translokázy, ve vnější membráně to jsou TOM komplexy, ve vnitřní TIM komplexy. TOM komplex je tvořen receptorovými proteiny Tom20, Tom22 a Tom70 a proteinem Tom40 tvořícím kanál umožňující průchod skrz membránu. TIM komplex se skládá z proteinů Tim23, který tvoří pór, a dále Tim50 a Tim17 (Wiedemann, Frazier, & Pfanner, 2004). Translokace proteinu p53 do mitochondrií probíhá vícero způsoby. Mechanismus se liší v závislosti na stavu buňky, translokace probíhá jinak v klidovém stavu, jinak po různých stresových stimulech a během buněčné smrti. Výsledná lokalizace proteinu p53 v mitochondriích závisí právě na způsobu translokace.

Zajímavou skutečností je, že protein p53 nemá mitochondriální cílovou sekvenci (MTS). Zda a jakým mechanismem k translokaci proteinu p3 dojde je určeno jeho posttranslačními modifikacemi.

3.1 Translokace za fyziologických podmínek

3.1.1 Translokace závislá na oxidativním metabolismu a CHCHD4

CHCHD4, savčí homolog kvasinkového Mia40, je gen kódující receptor účastnící se transportu proteinů do mezimembránového prostoru (IMS). Přes N-koncový motiv Cys-Pro-Cys tvoří disulfidické vazby s cysteinovými residui substrátových proteinů určených pro transport do IMS, čímž u nich indukuje tvorbu disulfidických můstků. Tento děj má význam pro správné sbalení proteinu v IMS (Mesecke et al., 2005).

Během oxidačního stresu dochází ke zvýšené transkripci genu CHCHD4. Zároveň jsou ve zvýšené míře oxidovány cysteinové zbytky proteinu p53, což jej činí vhodným substrátem pro CHCHD4 (Augustyn, Merino, & Barton, 2007).

Zvýšení exprese genu CHCHD4 vede ke změnám v distribuci a aktivitě proteinu p53 v buňce. Obsah proteinu p53 v buněčném jádře a jeho transkripčně regulační aktivity se sníží. Větší množství proteinu p53 je lokalizováno v mitochondriích, přičemž jeho celkový

obsah v buňce zůstává stejný. V mitochondriích lze detekovat kolokalizaci proteinů CHCHD4 a p53 (Zhuang et al., 2013).

Tento mechanismus translokace má význam v udržování integrity mitochondriálního genomu. Během zvýšení respirační aktivity a vzniku oxidačního stresu, který může mít za následek poškození mtDNA, dochází ke zvýšení transportu proteinu p53 do matrix mitochondrií, kde se účastní replikace, transkripce a oprav mitochondriálního genomu. V buňkách s overexpresí CHCHD4 lze po vystavení oxidačnímu stresu ošetřením peroxidem vodíku pozorovat výrazně lepší obnovu integrity mtDNA oproti kontrole. Tento jev nepozorujeme u buněk bez funkčního p53. Mechanismus, kterým se p53 dostane z mezimembránového prostoru k nukleoidu mtDNA, není přesně znám (Zhuang et al., 2013)

Tento systém translokace umožňuje p53 odlišně regulovat dva různé genomy v závislosti na oxidační metabolické aktivitě.

3.1.2 Translokace závislá na RECQL4 helikáze

RECQL4 je DNA helikáza, která se účastní formace prereplikačního komplexu a iniciace replikace jaderné DNA (Sangrithi et al., 2005). Přestože má tento protein ve své sekvenci jaderný lokalizační signál (NLS), lze jej detekovat i mimo jádro buňky (Petkovic, Dietschy, Freire, Jiao, & Stagljar, 2005). Protein p53 je transkripčním regulátorem genu RECQL4, po poškození DNA funguje jako represor promotoru. Mimo to může s proteinem RECQL4 také přímo interagovat v cytoplasmě, region aminokyselin 293-362 proteinu p53 interaguje s aminokyselinami 270-400 na N-konci RECQL4, čímž dochází k překrytí NLS obou proteinů. RECQL má také funkční MTS, díky které interaguje s receptorem Tom20 ve vnější mitochondriální membráně, což umožní transport obou proteinů skrz komplex TOM. Mechanismus průchodu vnitřní membránou není přesně znám. Proteiny jsou pak lokalizovány k mitochondriálnímu nukleoidu, kde se účastní regulace replikace mtDNA (De et al., 2012).

Míra interakce proteinu p53 s RECQL4 a tedy i mitochondriální translokace jejich komplexu se liší v závislosti na buněčném cyklu. Během pozdní S fáze a G2 fáze jsou tyto proteiny akumulovány spíše v mitochondriální frakci, zatímco během S fáze je většina RECQL4 detekovatelná v jádře. Při poškození DNA je interakce proteinu p53 a RECQL4 rozrušena, takže proteiny směřují do jádra. Za fyziologických podmínek se však komplexy RECQL4 a p53 nachází primárně v blízkosti mitochondriálního nukleoidu (De et al., 2012).

Tento mechanismus translokace je nezbytný pro správný průběh replikace mtDNA, slouží však také jako prevence nežádoucí aktivity p53 v jádře při absenci stresu. Buňky s mutací v genu RECQL4, takzvané RTS buňky, vykazují zvýšenou senzitivitu ke genotoxickému stresu (Jin et al., 2008). To je způsobeno zvýšenou akumulací transkripčně aktivního proteinu p53 v jejich jádře.

3.2 Translokace proteinu p53 za podmínek vedoucích k programované buněčné smrti

3.2.1 Průběh translokace

Za stresových podmínek se chování proteinu p53 výrazně liší. Po stresovém stimulu, jakým je například genotoxický stres (N. D. Marchenko, Zaika, & Moll, 2000), hypoxie (Sansome, Zaika, Marchenko, & Moll, 2001), tepelné poškození (Gu et al., 2014) či vystavení gamma záření u radiosenzitivních orgánů (Strom et al., 2006), je protein stabilizován, takže je jeho celkový obsah v buňce vyšší, než za fyziologických podmínek. Během 15 - 30 minut proběhne transport velkého množství p53 k vnější mitochondriální membráně i do vnitřních kompartmentů mitochondrií (Noda, Awais, Sutton, Awais, & Ozawa, 2017), což má za následek spuštění programované buněčné smrti - apoptózy, nebo nekrózy (Erster, Mihara, Kim, Petrenko, & Moll, 2004), (Vaseva et al., 2012)

V buňkách se vyskytují dvě samostatné frakce proteinu p53, jaderný a cytoplazmatický. K mitochondriální translokaci proteinu p53 dochází i po zastavení veškerého jaderného exportu, z čehož lze vyvodit, že zdrojem mitochondriálního p53 je cytoplazmatická frakce tohoto proteinu (Marchenko, Wolff, Erster, Becker, & Moll, 2007).

3.2.2 Funkce MDM2 E3 ubiquitin ligázy

Za fyziologických podmínek je v cytoplazmě udržována nízká hladina proteinu p53. Enzym MDM2, což je E3 ubiquitin ligáza, tvoří s proteinem p53 komplexy a provádí neustálou polyubiquitinaci jeho C-terminálních lysinů, protein je následně degradován v 26S proteasomu. Po stresovém stimulu však dochází k rozpadu komplexů p53/MDM2, MDM2 provádí namísto polyubiquitinace pouze monoubiquitinaci, která protein p53 stabilizuje a slouží jako signál pro jeho transport k mitochondriím. Tam je p53 deubiquitinován HAUSP komplexem, aktivní mitochondriální protein p53 tedy není monoubiquitinován (Marchenko et al., 2007).

3.2.3 Regulace ubiquitinace proteinu p53 MDM2 ligázou

Ubiquitinace ligázou MDM2 je regulována celkovým obsahem enzymu v cytoplazmě, posttranslačními modifikacemi proteinu p53 a interakcí s dalšími proteiny.

Během stresu vyvolaného poškozením DNA jsou MDM2 mRNA i protein MDM2 degradovány, takže je molární poměr proteinu p53 ku MDM2 vyšší. Experimenty s transfekcí buněk proteinem p53 a MDM2 plazmidy ukázaly, že při molárním poměru p53:MDM2 1:1 či 1:2 probíhala polyubiquitinace, zatímco při poměru 2:1 a vyšším probíhala hlavně monoubiquitinace (Marchenko et al., 2007).

Dalším mechanismem regulace je snížení afinity p53 k MDM2 posttranslačními modifikacemi a následnými změnami konformace proteinu p53. Enzym Homeodomain-interacting protein kináza-2 (HIPK2), aktivovaná v reakci na poškození DNA UV zářením, fosforyluje protein p53 na Ser46 (D'Orazi et al., 2002). Tato fosforylace umožní prolyl-izomeráze Pin1 provést konformační změny proteinu p53, čímž je snížena jeho afinita k MDM2 (Sorrentino et al., 2013). Taktéž fosforylace Ser392 má pozitivní vliv na schopnost proteinu translokovat k mitochondriím (Castrogiovanni, Waterschoot, De Backer, & Dumont, 2018).

Za oxidačního stresu je monoubiquitinace MDM2 ligázou indukována pomocí proteinu Drp1 (dynamine-related protein 1), což je GTPáza řídící proces mitochondriálního dělení. Za fyziologických podmínek se nachází v cytosolu, při oxidačním stresu interaguje s DNA vazebnou doménou proteinu p53. Exprese Drp1 v buňce vyvolá monoubiquitinaci p53, jeho mitochondriální lokalizaci a buněčnou smrt, přičemž tento proces neprobíhá v buňkách s mutantní MDM2, která postrádá E3 ligázovou aktivitu (Guo, Sesaki, & Qi, 2014).

MDM2 ligáza samotná neslouží jako zprostředkovatel transportu proteinu p53 k mitochondriím. Tuto roli pravděpodobně zastává protein Tid1, mitochondriální DnaJ co-chaperonový protein, který v reakci na hypoxii nebo genotoxický stres tvoří ternární komplexy s p53 a mtHsp70 na vnější mitochondriální membráně (OMM). V buňkách s deplecí Tid1 oproti kontrole nedochází k mitochondriální translokaci proteinu p53 a ani ke spuštění apoptózy (Ahn et al., 2010). Přesný průběh transportu proteinu p53 k vnější mitochondriální membráně není zcela znám.

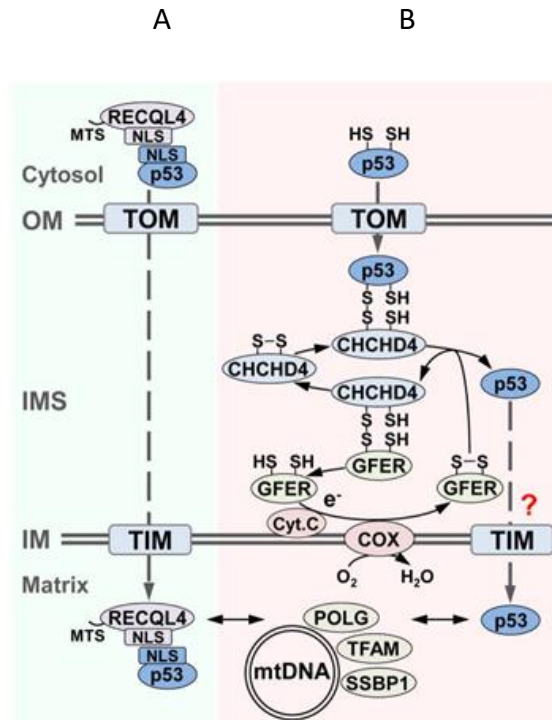
3.2.4 Cílová lokalizace proteinu p53 v mitochondriích

Cílová lokalizace proteinu p53 se liší v závislosti na povaze stresu, který vede ke spuštění programované buněčné smrti (PCD). Po apoptotickém stimulu dojde k rychlému transportu proteinu p53 k vnější mitochondriální membráně, kde interaguje s proteiny Bcl2 rodiny, což má za následek permeabilizaci této membrány (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru a spuštění apoptózy (N. D. Marchenko et al., 2000). Při oxidačním stresu je p53 transportován skrz OMM do vnitřních kompartmentů mitochondrií, kde interaguje s proteinem vnitřní mitochondriální membrány Cyclophilinem D. Následně se ve vnitřní mitochondriální membráně (IMM) tvoří mitochondriální póry přechodné propustnosti (mPTP) a je spuštěna nekróza (Vaseva et al., 2012). Je možné, že součástí tohoto děje je translokace skrz OMM závislá na CHCHD4, popsána výše v této kapitole.

3.2.5 Využití regulace mitochondriální translokace proteinu p53

Přesné mechanismy translokace p53 do mitochondrií nejsou zcela známy, nicméně jsou předmětem zkoumání kvůli možnosti klinického využití. Nekróza tkání je závažným jevem vznikajícím v důsledku ischemických onemocnění mozku, srdce, ledvin. Inhibitory mitochondriální translokace p53 by mohly být využity při terapii těchto onemocnění díky své schopnosti zabránit iniciaci nekrózy. Například inhibicí hyperaktivace proteinu Drp1 peptidickým inhibitorem P110 u potkanů, kteří prodělali mozkovou ischemii, je dosaženo výrazné redukce infarktu (Guo et al., 2014). Další inhibitor mitochondriální translokace využitelný v terapii jsou například Pifithrin- μ (Noda et al., 2017).

Naopak indukce mitochondriální translokace proteinu p53 a vyvolání apoptózy je žádoucí v terapii nádorových onemocnění (Qiao et al., 2016). Tématu využití inhibice či indukce translokace proteinu p53 do mitochondrií se budu podrobněji věnovat v další kapitole této práce.



Obrázek 2. Transport proteinu p53 přes mitochondriální membrány. A - Protein p53 tvoří komplex s RECQL4 helikázou, takže jsou překryty NLS obou proteinů. Poté dojde k jejich transportu do mitochondriální matrix. B – Protein p53 prochází TOM kanálem, v IMS interaguje s CHCHD4 SH skupinami svých cysteiny-ových residuí, poté pravděpodobně prochází TIM kanálem do matrix mitochondrií, kde, stejně jako v předchozím případě, interaguje s proteiny nukleoidu mtDNA. Převzato a upraveno podle (J. H. Park, Zhuang, Li, & Hwang, 2016)

4 Úloha proteinu p53 v transkripčně nezávislé indukci apoptózy

Známe tři druhy řízené buněčné smrti (PCD); apoptózu, nekrózu a autofagii. Mohou být spuštěny jak transkripčně regulačními mechanismy, tak na transkripci nezávislou cestou, ve které hraje zásadní roli mitochondriální translokace proteinu p53. Transkripčně nezávislou indukci apoptózy proteinem p53 se budu zabývat v této kapitole.

4.1 Apoptóza

Apoptóza je silně regulovaný proces buněčné smrti, během kterého dochází v buňce k nenávrtným fyziologickým a morfologickým změnám, jako je kolaps cytoskeletu, fragmentace DNA a rozpad jaderné membrány. Tento způsob buněčné smrti nevede k tvorbě zánětu. Apoptóza může být spuštěna buď v reakci na extracelulární stimul, pak ji nazýváme vnější (extrinsic), nebo jako reakce na podnět pocházející zevnitř buňky, pak se jedná o apoptózu vnitřní (intrinsic) (Alberts, 2017).

4.1.1 Kaspázová kaskáda

Průběh apoptózy zajišťují enzymy kaspázy. Tyto cystein-aspartátové proteázy se v buňce za normálního stavu nachází jako inaktivní prekurzory prokaspázy. Aby mohly být aktivovány, je zapotřebí uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií, který následně s adaptorovými proteiny Apaf1 tvoří heptamer zvaný apoptosom, schopný přitahovat a vázat k sobě iniciátorové prokaspázy 9. Přiblížením molekul prokaspázy 9 je umožněna jejich vzájemná proteolýza. Tím se z nich stanou aktivní enzymy kaspázy, které štěpí a tím aktivují další exekutorové prokaspázy provádějící řízenou degradaci buňky (Nicholson, 1999).

4.2 Indukce apoptózy proteinem p53 nezávislá na transkripci

Fakt, že je protein p53 schopen indukovat apoptózu, je znám již dlouhou dobu. Jako první byla objevena transkripčně regulační role proteinu p53 v indukci apoptózy. V jádře buňky tento protein působí jako aktivátor exprese proapoptotických genů Bax (Toshiyuki & Reed, 1995), NOXA (E. Oda et al., 2000), PUMA (Nakano & Vousden, 2001) a p53AIP1 (K. Oda et al., 2000). Pozdější experimenty ukázaly, že existuje další, na transkripci nezávislý mechanismus indukce apoptózy proteinem p53. Delece či mutace v transaktivační doméně není fatální pro schopnost proteinu p53 spustit apoptózu (Haupt, Rowan, Shaulian, Vousden, &

Oren, 1995), navíc, po přidání rekombinantního p53 do cytosolického extraktu bez přítomnosti buněčných jader dochází k uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspázové kaskády (Ding et al., 2000). Protein p53 tedy dokáže apoptózu spustit i přímou, rychlejší, na transkripci nezávislou cestou.

4.2.1 Mitochondriální translokace p53

Po stresovém stimulu, jako je například tepelné poškození (Gu et al., 2015), iradiace, poškození DNA nebo oxidační stres, dochází k rychlému transportu cytoplazmatické frakce proteinu p53 k vnější mitochondriální membráně (N. D. Marchenko et al., 2000). Po poškození DNA u ML-1 buněk kolorektálního karcinomu přidáním camptothecinu (inhibitor topoisomérázy I vyvolávající poškození DNA) byla pozorována zvýšená přítomnost p53 v mitochondriální frakci, aniž by byly detekovány jiné jaderné proteiny, přičemž celková hladina proteinu p53 v buňce zůstala stejná. K mitochondriální lokalizaci proteinu p53 taktéž nedocházelo při p53 nezávislé, TNF indukované apoptóze. Mitochondriální lokalizace proteinu p53 tedy není pouze důsledkem zvýšeného obsahu proteinu či reakcí na poškození organel během apoptózy (N. D. Marchenko et al., 2000). Zároveň je sama o sobě postačující k indukci apoptózy. Přidáním MTS z proteinů OMM Bak či Bcl2 a následnou transfekcí p53 deficientních buněk těmito proteiny bylo dosaženo spuštění apoptózy, aniž by byla detekována přítomnost p53-MTS konstruktů v jádře (Mossalam et al., 2012).

4.2.2 Permeabilizace vnější mitochondriální membrány

Následkem translokace proteinu p53 na OMM je proces zvaný permeabilizace vnější mitochondriální membrány (mitochondrial outer membrane permeabilization - MOMP), uvolnění cytochromu c a aktivace kaspáz. Permeabilizaci provádí proteiny Bcl-2 rodiny, které tvoří v OMM póry a jejichž aktivitu protein p53 reguluje (Mihara et al., 2003). Rychlost tohoto děje je přímo úměrná množství translokovaného proteinu p53, obecně se jedná o rychlý proces, k uvolnění cytochromu c dochází už 0,5-1 hodinu po stabilizaci proteinu p53 a jeho translokaci do mitochondrií (Mihara et al., 2003). V pozdní apoptóze obsah proteinu p53 v mitochondriích opět klesá. Po 16 hodinách od ošetření buněk camptothecinem byl pozorován pokles hladiny mitochondriálního p53, aniž by došlo ke změně celkového obsahu proteinu p53 v buňce. Tento děj pravděpodobně souvisí s defosforylací Ser20 proteinu p53 (Castrogiovanni, Vandaudenard, Waterschoot, De Backer, & Dumont, 2015)

4.3 Interakce proteinu p53 s proteiny Bcl2 rodiny

4.3.1 Proteiny Bcl2 rodiny

Proteiny Bcl2 rodiny jsou regulátory permeabilizace OMM, mají buď proapoptotickou, nebo antiapoptotickou funkci. Můžeme je rozdělit do tří skupin, podle toho, které ze 4 homologních BH domén sdílí s proteinem Bcl2. Do BH4 skupiny patří proteiny Bcl2, BclXL a Mcl1 s antiapoptotickou funkcí, které stabilizují OMM a inhibují proapoptotické Bcl2 proteiny (Martinou et al., 1994). Ve skupině BH123 jsou proteiny Bax a Bak s proapoptotickou funkcí, za normálního stavu přítomny jako inaktivní monomery, Bax v cytosolu, Bak na vnější straně OMM. Po apoptotickém stimulu a tvoří permeabilizační póry v OMM (Emily et al., 2001). Proteiny BH3-only skupiny jsou PUMA, NOXA, tBid a další, působí proapoptoticky – translokují se na OMM a svou BH3 doménou interagují s BH4 proteiny, čímž rozruší jejich komplexy s proapoptotickými proteiny. Dále interaguje s BH123 proteiny, které naopak aktivují (Emily et al., 2001).

Po transportu k OMM se protein p53 chová jako super BH3-only protein, je schopen fyzicky interagovat s proteiny Bcl2 rodiny a indukovat změnu jejich konformace. Pro tyto přímé interakce není nezbytný C-konec proteinu p53, vyžadovaný při transkripčně-regulačních aktivitách (N. D. Marchenko et al., 2000).

4.3.2 Interakce s antiapoptotickými proteiny BclXL, Bcl2 a Mcl1

Za normálního stavu protein Bcl-XL inhibuje na OMM protein Bak a proteiny Bcl2 a Mcl1 v cytosolu protein Bax. Zabraňují tak jejich oligomerizaci a tvorbě pórů v OMM.

Po apoptotickém stimulu byly detekovány komplexy těchto proteinů s proteinem p53 (Mihara et al., 2003) (Petros, Gunasekera, Xu, Olejniczak, & Fesik, 2004). Interakce probíhá mezi pozitivně nabitým regionem L1, L2/ α 1, L3 a α 2 DBD proteinu p53 a záporně nabitým BH3-vazebným regionem α 1/2 a α 5/6 proteinů Bcl2 rodiny, mechanismus interakce s proteinem p53 je u BH4 proteinů Bcl2 rodiny konzervovaný (Bharatham, Chi, & Yoon, 2011). U obou vazebných míst pak dojde ke konformačním změnám. Výsledkem je rozpad inhibičních komplexů BclXL/Bak, Mcl1/Bax a Bcl2/Bax a tedy ztráta funkce stabilizace OMM (Leu, Dumont, Hafey, Murphy, & George, 2004) (Tomita et al., 2006).

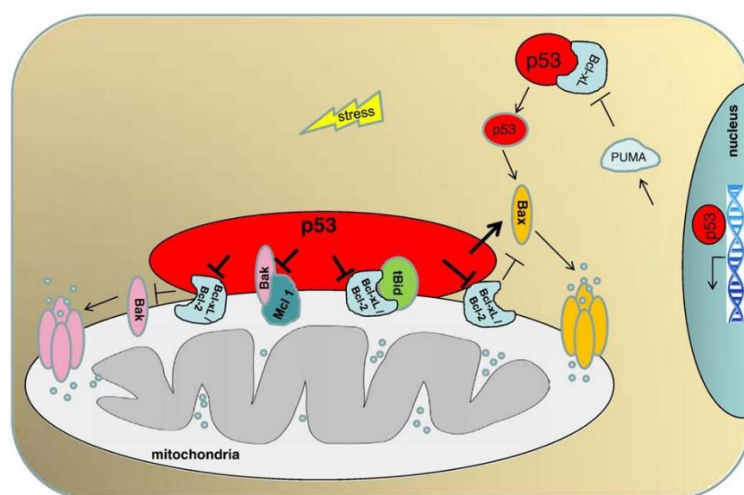
4.3.3 Interakce s proapoptotickými proteiny Bax a Bak

Protein p53 interaguje také s proapoptotickými BH123 proteiny Bax a Bak, které jsou si strukturně i funkčně podobné.

Bax se za normálního stavu nachází v cytosolu jako inaktivní monomer v inhibičním komplexu s proteinem Bcl2. Tyto komplexy jsou po apoptotickém stimulu rozrušeny interakcí proteinu p53 s Bcl2, jak už bylo popsáno výše (Mihara et al., 2003). Je možné, že je po rozpadu komplexů odhalena MTS proteinu Bax. Poté sám s proteinem p53 interaguje. Proteiny spolu netvoří stabilní komplexy a dochází ke tvorbě přechodných vazeb. Následkem tohoto kontaktu projde protein Bax konformačními změnami, kterými je aktivován. Lokalizuje se na OMM, kde oligomerizuje a tvoří permeabilizační póry (Chipuk et al., 2004), (Czabotar, Lessene, Strasser, & Adams, 2014).

Protein Bak se i za normálního stavu nachází na cytosolické straně OMM, kde tvoří inhibiční komplexy s proteiny BclXL a Mcl-1. K aktivaci proteinu Bak je třeba rozrušení těchto komplexů, což vedle BH3 proteinů (Willis et al., 2005) dokáže také protein p53. Protein Bak přes svůj N-koncový α helix také přímo interaguje s DNA vazebnou doménou proteinu p53, čímž je aktivován, může oligomerizovat a tvořit póry v OMM (Leu et al., 2004).

Protein p53 tedy zajišťuje aktivaci proapoptotických proteinů Bax a Bak hned dvěma způsoby, uvolněním Bax a Bak z inhibičních komplexů s proteinem Bcl2 a následným vyvoláním konformačních změn přímou fyzickou interakcí.



Obrázek 3. Regulace MOMP proteinem p53. Po stresovém stimulu dochází k lokalizaci proteinu na vnější mitochondriální membránu, kde interaguje s proteiny Bcl2 rodiny a tím reguluje jejich aktivitu. Interakcí s antiapoptotickými Mcl1, Bcl2 a BclXL rozrušuje jejich inhibiční komplexy s proapoptotickými proteiny Bax a

Bak. S těmi poté protein p53 sám interaguje a tím je aktivuje, takže mohou oligomerizovat a tvořit póry v OMM, kterými dochází k uvolnění cyt c do cytosolu. Převzato z (Vaseva & Moll, 2009).

4.3.4 Význam DNA vazebné domény proteinu p53 v indukci apoptózy

Interakce s proteiny Bcl2 rodiny probíhají, stejně jako kontakt s DNA, přes DBD proteinu p53. Tato doména sama o sobě dokáže indukovat MOMP, je-li zajištěn její transport k OMM, například přidáním MTS proteinu Bak (Matissek, Mossalam, Okal, & Lim, 2013). Některé mutace v *TP53* genu mají za následek nefunkčnost DBD proteinu p53. Takovéto proteiny nejenže nemohou vázat DNA, působit jako transkripční regulátory a indukovat apoptózu aktivací proapoptotických genů, ale nejsou schopny ani interakce s proteiny Bcl2 rodiny a indukce apoptózy přímou, na transkripci nezávislou cestou (Tomita et al., 2006).

4.4 Interakce s proteinu p53 s prokaspázou 3

Prokaspáza 3 je efektorová kaspáza, v buňce je většinou asociována s vnější mitochondriální membránou v komplexu s chaperony Hsp60 a Hsp10. Po indukci apoptózy je štěpena kaspázou 9 a tím aktivována, disociuje z Hsp komplexu a putuje do cytosolu, malá část však zůstává na mitochondriích (Samali, Cai, Zhivotovsky, Jones, & Orrenius, 1999). Během apoptózy tvoří asi 1-3% celkového obsahu proteinu p53 v buňce komplexy s prokaspázou 3. Zajímavým poznatkem je, že proteiny p53 s mutací v DBD jsou schopny interagovat s prokaspázou 3 na podobné úrovni, jako *wt* p53, nicméně v těchto případech dochází ve výrazně nižší míře ke štěpení prokaspázy 3 kaspázou 9 a její aktivaci (Frank, Pietsch, Dumont, Tao, & Murphy, 2011).

Aktivní kaspáza 3 štěpí protein p53 na Asp21 a Asp186, takže mohou vzniknout 4 fragmenty: p53(22-393), p53(1-186), p53(22-186) a p53(187-393). Dva z těchto fragmentů obsahují NLS, 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). Důsledkem interakce proteinu p53 s prokaspázou 3 je tedy kromě usnadnění její aktivace také urychlení procesu OMMP.

4.5 Klinické využití regulace apoptózy

Regulace funkce proteinu p53 v apoptotické signální dráze nezávislé na transkripci může být využita v terapii nádorových onemocnění. Nejčastější způsob regulace je indukce mitochondriální translokace proteinu p53. Té může být dosaženo vícero způsoby, například přidáním

MTS k proteinu p53, regulací aktivity jednotlivých proteinů účastnících se translokace, či použitím specifických látek indukujících aktivaci cytosolického proteinu p53.

Jednou z takových látek je například flavonoid Oroxylin A, extrahovaný z rostliny *Scutellaria baicalensis Georgi*. Ten indukují mitochondriální translokaci RECQL4 /p53 komplexu a spuštění apoptózy u HCT-116 buněk nádoru střeva. Míra inhibice růstu nádorů touto metodou je až 50,8 % (Qiao et al., 2016).

Indukce apoptózy bylo dosaženo také u linií MCF-7 a MDA-MB-231 buněk karcinomu prsu přidáním konstruktů DBD proteinu p53 s MTS proteinu BclXL. Tento konstrukt je lokalizován přímo k OMM, kde interaguje s Bcl2 proteiny a indukují MOMP (Matissek et al., 2013). Využití proteinu p53 v terapii nádorových onemocnění je velmi rozsáhlé téma a přesahuje rámec této práce.

5 Úloha proteinu p53 v transkripčně nezávislé indukci nekrózy

5.1 Nekróza

Nekróza může být indukována nezávisle na transkripci. Na rozdíl od apoptózy při ní dochází k rychlé ztrátě membránového potenciálu buněk, selhání iontových pump a kanálů, rozrušení integrity organel buňky a cytolýze. Vede ke tvorbě zánětu (Zong & Thompson, 2006). Protein p53 se účastní procesu indukce nekrózy po vystavení buňky oxidativnímu stresu a hypoxii.

5.2 Indukce nekrózy proteinem p53

Pozdější výzkumy ukázaly, že translokace k vnější mitochondriální membráně a interakce s Bcl2 proteinu není jediný způsob, kterým může protein p53 permeabilizovat mitochondriální membránu a indukovat buněčnou smrt. Po přidání proteinu p53 k Bax/Bak double-knockout mitochondriím docházelo k permeabilizaci jejich membrány a uvolnění cyt c, Smac a dalších faktorů stejně, jako u *wt* mitochondrií, zatímco přidání proteinu tBid, který indukuje oligomerizaci Bak a tvorbu pórů v OMM stejně jako p53, mělo takovýto efekt jen u *wt* organel. Dalšími experimenty s fluorescenčním barvivem calceinem, které slouží jako indikátor permeabilizace vnitřní mitochondriální membrány, bylo zjištěno, že přidáním purifikovaného proteinu p53 k *wt* i Bax/Bak DKO mitochondriím je dosaženo otevření pórů v IMM a spuštění nekrózy. Protein p53 je tedy schopen indukovat nekrózu, a to nezávisle na své apoptotické signalizaci (Vaseva et al., 2012).

5.2.1 Mitochondriální póry přechodné propustnosti

Oxidativní poškození buněk nastává například při ischemii a následné reperfuzi tkání, nebo při ošetření buněk H_2O_2 . V jeho důsledku dochází ke zvýšení hladiny Ca^{2+} iontů a ROS v matrix mitochondrií. V reakci na oxidativní poškození probíhá rychlá translokace proteinu p53 do mitochondriální matrix (Vaseva et al., 2012). Následně jsou otevřeny mitochondriální póry přechodné propustnosti (mPTP) ve vnitřní mitochondriální membráně. Těmito póry pak do matrix volně prochází molekuly o velikosti až 1,5 kD, což vede k disrupci protonového gradientu na vnitřní membráně, zastavení oxidativní fosforylace a produkce ATP, rozrušení vnější mitochondriální membrány a prasknutí celých organel (Bernardi & Forte, 2007). Protein p53 interaguje s komponenty mPTP, čímž umožňuje jejich otevření a aktivuje

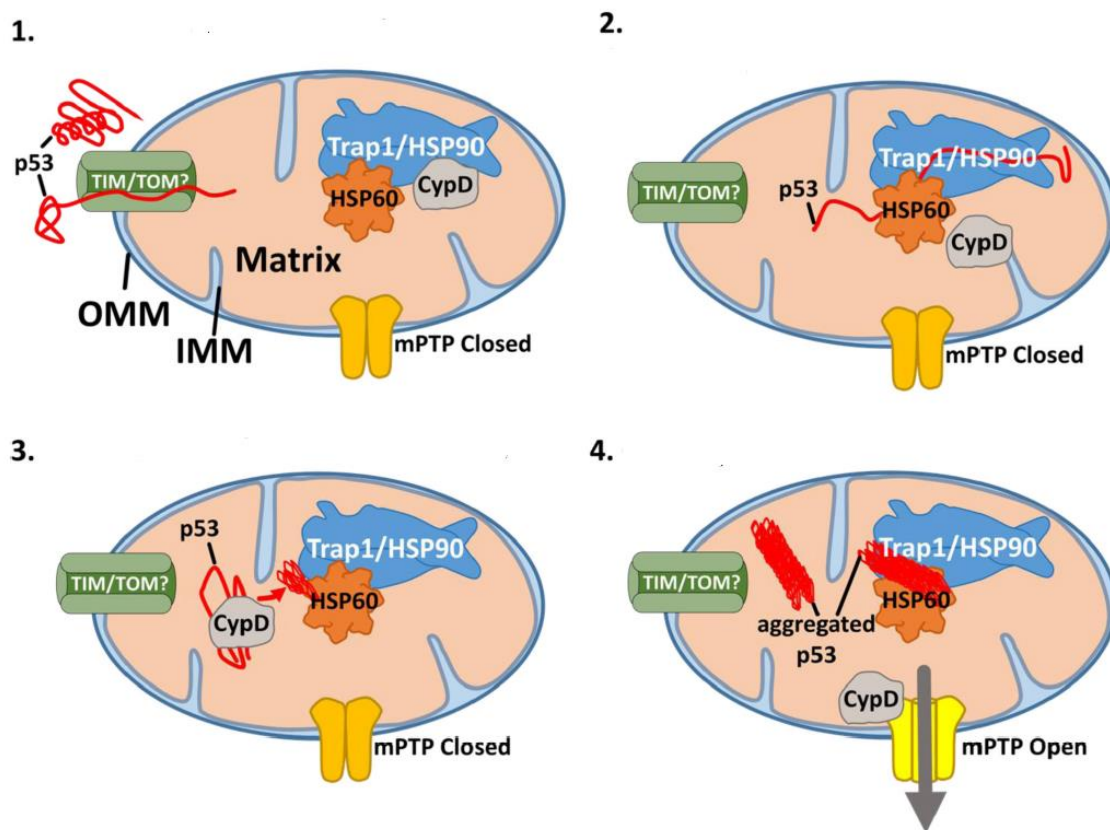
tak mitochondriální přechodnou propustnost – mPT (Vaseva et al., 2012). Struktura mPTP není zcela známa, podle současných poznatků se pór v IMM skládá ze dvou podjednotek F_1F_0 -ATP syntázy, Oligomycin Sensitivity Conferring proteinu (OSCP) a c podjednotky (Halestrap, 2014), a z produktu Spastic Paraplegia 7 genu (SPG7) (Shanmughapriya et al., 2015). Hlavním a nepostradatelným regulátorem otevření mPTP je cyclophilin D (CypD), prolyl cis-trans isomeráza, nacházející se v mitochondriální matrix (Baines et al., 2005). Fyzickou interakcí s CypD aktivuje protein p53 jeho funkci a umožní tak otevření mPTP (Vaseva et al., 2012). Původně byl jako součást mPTP uváděn také porinový napěťově závislý aniontový kanál VDAC, nacházející se v OMM, jehož propustnost je závislá na membránovém potenciálu (Szabó, De Pinto, & Zoratti, 1993). Dle pozdějších výzkumů ale mPTP probíhá i v VDAC^{-/-} buňkách, takže je tento kanál pro otevření mPTP postradatelný (Baines, Kaiser, Sheiko, Craigen, & Molkenin, 2007). K permeabilizaci OMM během mPT dochází pravděpodobně aktivitou proteinů Bcl2 rodiny Bax a Bak, které ale nejsou přímou součástí mPTP (Karch et al., 2013).

5.2.2 Interakce proteinu p53 s cyclophilinem D

V současné době se povaha interakce proteinu p53 s CypD jeví spíše jako přechodná enzym-substrátová interakce, než původně předvídaný stabilní komplex. Dochází k ní mezi oblastí 80-220 DNA-vazebné domény proteinu p53 a aminokyselinami Arg55, Phe60, Phe113 a Trp121 CypD (Lebedev et al., 2016). Výsledkem této interakce je jednak aktivace enzymatické aktivity CypD, jednak agregace proteinu p53 do fibrilárních útvarů. Bylo prokázáno, že agregace, stejně jako otevření mPTP, je způsobena právě enzymatickou aktivitou CypD (Lebedev et al., 2016)

Zajímavým poznatkem je, že strukturální destabilizace nesnižuje schopnost proteinu p53 interagovat s CypD, naopak ji může zvyšovat. Pro interakci s CypD je pravděpodobně preferován nesbalený nebo posttranslačně modifikovaný protein p53, což odpovídá jeho stavu po importu do mitochondriální matrix. Tam interaguje s mitochondriálními chaperony mtHsp60, mtHsp70, mtHsp90 a jeho homologem Trap1. Za normálních podmínek tvoří protein Trap1 komplexy s CypD (Altieri, Stein, Lian, & Languino, 2012), jeho inhibicí je dosaženo senzitivace mitochondrií k otevírání mPTP. Je tedy možné, že po rychlé translokaci do mitochondriální matrix protein interaguje s Trap1 proteinem, čímž rozruší Trap1-CypD

komplexy. Uvolněný CypD poté může být aktivován proteinem p53 a svou enzymatickou aktivitou zajistit otevření mPTP (Lebedev et al., 2016).



Obrázek 4. Mechanismus aktivace cyclophilinu D proteinem p53. 1. V reakci na oxidativní stres je protein p53 translokován do matrix mitochondrií, 2. Nesbalený protein p53 interaguje s mitochondriálními chaperony, dochází k disociaci komplexu chaperonů s CypD, 3. CypD zprostředkovává agregaci proteinu p53, 4. CypD aktivuje otevření mPTP. Převzato z (Lebedev et al., 2016).

5.3 Využití regulace indukce nekrózy proteinem p53

Regulace funkce proteinu p53 v indukci buněčné smrti je v současné době intenzivně zkoumána kvůli možnému klinickému využití, konkrétně v terapii ischemických a neurodegenerativních chorob či rakoviny.

5.3.1 Inhibice mitochondriální translokace proteinu p53 a její klinické využití

Nekróza tkání je život ohrožující jev vznikající při ischemicko-reperfučním poranění mozku, srdce, ledvin a dalších orgánů. Inhibicí translokace proteinu p53 do mitochondriální matrix

lze zabránit otevření mPTP a tím redukovat vznik nekrózy a zánětu. Inhibovány jsou většími komponenty signální dráhy p53, například GTPáza Drp1. Ta řídí proces mitochondriálního dělení (Chang & Blackstone, 2010), během oxidativního stresu je aktivována, stabilizuje protein p53 a indukuje jeho MDM2 zprostředkovanou monoubiquitinaci (Guo et al., 2014). Pro inhibici aktivace Drp1 u buněk oxidativně poškozených H_2O_2 byl použit její specifický inhibitor P110. Peptidický inhibitor P110 je derivátem GTPázové domény Drp1, inhibuje GTPázovou aktivitu Drp1 a znemožňuje jí tvořit komplexy (Qi, Qvit, Su, & Mochly-Rosen, 2013). Inhibice Drp1 inhibitorem P110 má za následek zastavení mitochondriálního transportu proteinu p53. Použitím inhibitoru P110 u krys vystavených 2h ischemii a 24h reperfuzi bylo dosaženo redukce infarktu mozku ze 44 % na 13 % mozkové tkáně (Guo et al., 2014). Současné experimenty ukazují další možná využití inhibitoru P110 v terapii neurodegenerativních onemocnění, například Parkinsonovy choroby, kde je možné jeho použitím snížit degradaci dopaminergních neuronů (Filichia, Hoffer, Qi, & Luo, 2016).

Dalším inhibitorem translokace do mitochondriální matrix, zkoumaným pro své možné klinické využití, je PFT- μ , který snižuje afinitu proteinu p53 k proteinům BclXL a Bcl2 (Noda et al., 2017). Lze jej využít pro redukcii nekrózy buněk meziobratlové ploténky krys, vyvolané poškozením tlakem (Lin et al., 2017), či k ochraně zdravých tkání před poškozením radiací při terapii nádorových onemocnění (Strom et al., 2006).

6 Funkce proteinu p53 v udržování integrity mitochondriálního genomu

Lidský mitochondriální genom tvoří dvouřetězcová molekula DNA o délce 16 569 bází. Obsahuje celkem 37 genů, konkrétně 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 syntázy, 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 (Anderson et al., 1981).

6.1 Nukleoid

Nukleoid je oblast v mitochondrii, 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 (Bogehagen, Wang, Shen, & Kobayashi, 2003). S mtDNA je asociováno více než 50 proteinů (Bogehagen et al., 2003). Pro správné sbalení nukleoidu je nutný mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), který rovnoměrně pokrývá celou délku mtDNA (Kang, Kim, & Hamasaki, 2007).

Další komponenty nukleoidu jsou proteiny transkripčního a replikačního aparátu; DNA polymeráza γ , 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).

6.2 Transkripce

Mezi geny mtDNA je minimum nekódujících sekvencí. Výjimkou je přibližně 1 kbp dlouhý nekódující region, ve kterém se nachází displacement loop (D-loop).

Transkripce mtDNA začíná z promotorů HSP1 a HSP2 na H-řetězci a promotoru LSP na L-řetězci. Transkripty jsou polycystronné a jsou polyadenylovány. Transkripci provádí mito-

chondriální RNA polymeráza POLRMT (Masters, Stohl, & Clayton, 1987), vyžadující transkripční faktory, konkrétně mitochondriální transkripční faktor A TFAM (Fisher & Clayton, 1985) a dále transkripční faktory B TFB1M nebo TFB2M, které stimulují iniciaci transkripce interakcí s TFAM (McCulloch & Shadel, 2003).

6.3 Replikace

Replikace mtDNA probíhá z jednoho replikačního počátku na každém vlákně, OH na H vlákně a z OL na L vlákně. Iniciace replikace je spojená s transkripcí, primer potřebný k iniciaci v OH je transkripčním produktem z LSP promotoru (Shadel & Clayton, 1997). Syn- tézu DNA provádí polymeráza γ (Ropp & Copeland, 1996). 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).

6.4 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 oxidační fosforylace, během které je produkováno množství volných kyslíkových radikálů (ROS). Ty způsobují oxidační poškození DNA, v jehož důsledku dochází často k přeměně deoxyguanosinu na 8-oxo-7,8-dihydroxo-2'-deoxyguanosin (Faucher, Doublie, & Jia, 2012). Nejčastějším a nej- lépe popsáným 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 gly- kosylázou, odstranění chybné báze mtDNA a vytvoření abazického místa, ve kterém je zbylá fosfátová kostra odbourána apurinní endonukleázou APE1 (Kohli & Zhang, 2013). Chyběj- ící nukleotidy jsou poté dosyntetizovány polymerázou γ (Yakubovskaya, Chen, Carrodeguas, Kisker, & Bogenhagen, 2006).

6.5 Regulace transkripce genů účastnících se údržby mtDNA protei- nem p53

Udržování kvality mitochondriálního genomu se protein p53 stará na úrovni regulace tran- skripce, i přímou interakcí s proteiny nukleoidu v mitochondriální matrix. V jádře buňky působí jako regulátor transkripce genu *RRM2B*, který kóduje enzym ribonukleotid reduktázu

M2 B. Ta zajišťuje syntézu nukleotidů potřebných pro replikaci a opravy mtDNA (Pontarin, Ferraro, Bee, Reichard, & Bianchi, 2012). Poruchy exprese tohoto genu vedou k rozsáhlým deplecím mtDNA (Bourdon et al., 2007).

Dále je protein p53 zásadní pro transkripci genu *TFAM*. V p53 deficientních buňkách kosterní svaloviny myši dochází k výraznému snížení exprese tohoto genu, což má za následek snížení obsahu mtDNA v mitochondriích a celkově menší fyzickou výdrží myši (J.-Y. Park et al., 2009).

6.6 Interakce s proteiny nukleoidu

Interakce proteinu p53 s proteiny replikačního, transkripčního a opravného aparátu mtDNA v matrix mitochondrií má pozitivní vliv na uchování kvality mitochondriálního genomu, obecně se dá říci, že zajišťuje dostatečnou přesnost replikace a oprav, a tím zabráňuje negativním jevům spojeným s hromaděním mutací mtDNA. Dále se přímo účastní procesu opravy mtDNA, díky své 3'-5' exonukleázové aktivitě může provádět excizi chybných nukleotidů z mtDNA (Mummenbrauer et al., 1996). V mitochondriích bez funkčního proteinu p53 dochází k častým poruchám a celkovému snížení obsahu jejich mtDNA (Kulawiec, Ayyasamy, & Singh, 2009).

6.6.1 Polymeráza γ

Lidská DNA polymeráza γ je heterotrimer složený z jedné katalytické podjednotky o velikosti 139 kDa a dvou procesivních, 53 kDa velkých podjednotek (Yakubovskaya et al., 2006). Katalytická podjednotka má jak polymerázovou, tak 3'5' exonukleázovou aktivitu, provádí také proofreading nově syntetizovaného řetězce (Kaguni, 2004). Během syntézy mtDNA může docházet k zařazení nesprávného nukleotidu, což je vedle oxidativního poškození DNA další možná příčina vzniku mutací mtDNA. 3'-5' exonukleázová aktivita polymerázy γ sama o sobě není dostačující k odstranění těchto chybných nukleotidů v potřebné míře.

Protein p53 fyzicky interaguje s Poly a tím zvyšuje její procesivitu (Achanta et al. 2005). Této interakce se může účastnit také RECQL4 helikáza, která translokuje do mitochondriální matrix spolu s proteinem p53 (viz kapitola 2). Kontakt s proteinem p53 i RECQL4 zprostředkovávají exonukleázová i polymerázová doména Poly. Tato interakce stimuluje vazbu

Polγ k mtDNA v D-loop regionu a její polymerizační i exonukleázovou aktivitu (Gupta et al., 2013).

Protein p53 také funguje jako externí proofreader Polγ. Snižuje míru zařazení chybných nukleotidů do nově syntetizovaného řetězce, a díky své 3'-5' exonukleázové aktivitě také provádí jejich excizi. Například chybná inkorporace nukleotidu dUTP do mtDNA, která může být příčinou vzniku mutací, se vyskytuje v menší míře v mitochondriích s funkčním proteinem p53, také excize dUMP probíhá efektivněji, než v mitochondriích pocházejících z p53^{-/-} buněk (Bonda, Rahav, Kaya, & Bakhanashvili, 2016).

Syntéza nové molekuly mtDNA polymerázou γ, i opravné aktivity probíhají efektivněji v přítomnosti proteinu p53.

6.6.2 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 et al., 2007).

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 et al., 2009).

TFAM interaguje s proteinem p53, k primární vazbě dochází mezi HMG1 boxem TFAM a transaktivační doménou proteinu p53, ke slabší sekundární vazbě dochází na jeho C-terminální regulační doméně. Komplex TFAM-p53 je stabilizován elektrostatickými a hydrofobními interakcemi. Během vazby dochází ke konformačním změnám u proteinu p53, kde se v TAD tvoří dva negativně nabitě helixy S15-L32 a Q38-D57, spojené linker regionem, které mají funkci kontaktních míst s TFAM (Wong et al., 2009). TFAM se preferenčně váže na poškozenou mtDNA. Přidáním proteinu p53 k mtDNA poškozené cisplatinem a TFAM až dvacetinásobně zvýší mtDNA vazebnou aktivitu TFAM. Naopak vazebná aktivita TFAM k oxidativně poškozené mtDNA se v přítomnosti proteinu p53 snižuje (Yoshida et al., 2003).

Odlišné chování TFAM během oxidativního stresu odpovídá specifické odpovědi na tento druh stresu, kdy dojde k otevření mPTP a spuštění nekrózy.

V kosterní svalovině myši lze vyvolat mitochondriální translokaci proteinu p53 a jeho zvýšenou tvorbu komplexů s mtDNA a TFAM akutní fyzickou zátěží. Po 15 min trvající fyzické námaze a následném 3h odpočinku myši docházelo ke zvýšení hladiny proteinu p53 v intermyofibrilárních mitochondriích až 3,6krát. Tento jev pravděpodobně souvisí se zvýšením energetického metabolismu buňky, a tedy i potřeby exprese mitochondriálních genů (Saleem & Hood, 2013).

Význam interakce proteinu p53 a TFAM spočívá ve stimulaci aktivity TFAM v transkripci a opravách mitochondriálního genomu. Existují dokonce domněnky, že by protein p53 mohl fungovat jako mitochondriální transkripční faktor, a pozitivně modulovat genovou expresi regulací aktivity TFAM v D-loop regionu (Saleem & Hood, 2013).

6.6.3 HmtSSB

Protein HmtSSB (Human mitochondrial single strand binding protein) je homotetramer (Wong et al., 2009). Primární struktura tohoto proteinu je homologní s SSB proteinem *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 mtDNA v D-loop, čímž zabraňuje opětovnému spojení řetězců (Van Tuyle & Pavco, 1985). Stimuluje polymerázu γ , 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 et al., 2008). 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. 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 et al., 2008). Interakce s mtSSB má tedy pozitivní vliv na funkci proteinu p53 v opravě mtDNA.

6.7 Přímá interakce proteinu 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 (K Heyne et al., 2004). Pro podrobnější zkoumání interakcí 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 (K Heyne et al., 2004). Význam této interakce není přesně znám.

6.8 Důsledky působení proteinu p53 v mitochondriální matrix

Aktivita proteinu p53 v mitochondriální matrix se liší v závislosti na stavu buňky. Za fyziologických podmínek se protein p53 primárně účastní procesů udržování integrity mtDNA. Při poškození oxidativním stresem, vyvolaným například H_2O_2 , se však chování proteinu p53 mění a jeho funkce je spíše destabilizující. Inhibuje vazbu TFAM k mtDNA a celkově senzibilizuje buňky k oxidativnímu stresu. HepG2 buňky obsahující v mitochondriích matrix-specifický konstrukt proteinu p53 zvaný p53-290 vykazovaly po ošetření H_2O_2 menší životaschopnost než kontrolní HepG2 buňky, zároveň u nich došlo ke snížení obsahu mtDNA, a to v míře závislé na obsahu p53-290 konstruktů v matrix. (Koczor, Torres, Fields, Boyd, & Lewis, 2013). Tento jev pravděpodobně souvisí s indukcí nekrózy, kterou zajišťuje protein p53 po translokaci do mitochondriální matrix právě v reakci na oxidativní stres. Zvýšený obsah proteinu p53 má tedy, podobně jako jeho nedostatek, negativní vliv na integritu mitochondriálního genomu.

Hromadění mutací mtDNA je jeden z problémů stárnoucích organismů (Loeb, Wallace, & Martin, 2005). Zajímavým poznatkem je, že fyzická aktivita stimuluje translokaci proteinu p53 do mitochondriální matrix, což zvyšuje účinnost oprav mtDNA. U myši s defektní proofreading aktivitou polymerázy γ vystavených fyzické zátěži dochází k redukci hromadění

mutací mtDNA v mitochondriích kosterní svaloviny a prodloužení délky života, oproti kontrolním myším, které fyzickou aktivitu nevyvíjí (Safdar et al., 2016). To může být jeden z molekulárních mechanismů objasňujících přínos aktivního pohybu pro zdraví.

7 Závěr

Tato práce pojednává o funkci proteinu p53 v mitochondriích. Byly zde shrnuty dostupné poznatky o transportu proteinu p53 na povrch a do vnitřních kompartmentů mitochondrií. V dalších částech jsem se zabývala funkcí proteinu p53 v permeabilizaci vnější a vnitřní mitochondriální membrány během indukce apoptózy a nekrózy. Nakonec byla popsána role proteinu p53 v udržování integrity mitochondriálního genomu.

Výzkum funkce proteinu p53 v indukci buněčné smrti má možné klinické využití v terapii celé řady závažných onemocnění, u kterých dochází k nežádoucí degradaci tkání v důsledku aktivace nekrózy či apoptózy. Inhibice mitochondriální translokace proteinu p53 zabrání aktivaci buněčné smrti a výrazně redukuje odumírání tkání při infarktu vznikajícím v důsledku ischemicko-reperfučních onemocnění, dále zabraňuje nežádoucí degradaci nervových buněk u neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova či Parkinsonova choroba. Také jsou zkoumány možnosti využití inhibice mitochondriální funkce proteinu p53 v rámci ochrany zdravých tkání před poškozením ozářením během radioterapie nádorových onemocnění.

Stejně tak jsou pro klinickou praxi zajímavé možnosti aktivace funkce proteinu p53 v indukci apoptózy při terapii rakoviny. Indukcí mitochondriální translokace lze docílit vyvolání apoptózy nádorových buněk a inhibice růstu nádorů.

Také výzkum role proteinu p53 v údržbě mitochondriálního DNA je zajímavým tématem s možným klinickým využitím. Aktivity proteinu p53 jsou klíčové pro správný průběh replikace a oprav mtDNA, a zabraňují hromadění mutací mtDNA, což je jev spojený s řadou onemocnění.

Seznam použité literatury

- Ahn, B., Trinh, D., Zajchowski, L., Lee, B., Elwi, A., & Kim, S.-W. (2010). Tid1 is a new regulator of p53 mitochondrial translocation and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 29(8), 1155-1166.
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*: Garland science.
- Altieri, D. C., Stein, G. S., Lian, J. B., & Languino, L. R. (2012). TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 767-773.
- 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. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Ashcroft, M., & Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18(53).
- Augustyn, K. E., Merino, E. J., & Barton, J. K. (2007). A role for DNA-mediated charge transport in regulating p53: Oxidation of the DNA-bound protein from a distance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), 18907-18912.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., . . . Dorn, G. W. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658-662.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J., & Molkentin, J. D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature cell biology*, 9(5), 550-555.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., & Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Molecular cell*, 8(6), 1243-1254.
- Bernardi, P., & Forte, M. (2007). *The mitochondrial permeability transition pore*. Paper presented at the Novartis Foundation symposium.
- Bharatham, N., Chi, S.-W., & Yoon, H. S. (2011). Molecular basis of Bcl-XL-p53 interaction: insights from molecular dynamics simulations. *PLoS one*, 6(10), e26014.
- Bogenhagen, D. F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9), 914-920.
- 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.
- Bonda, E., Rahav, G., Kaya, A., & Bakhanashvili, M. (2016). p53 in the mitochondria, as a trans-acting protein, provides error-correction activities during the incorporation of non-canonical dUTP into DNA. *Oncotarget*, 7(45), 73323.
- 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.
- Castrogiovanni, C., Vandaudenard, M., Waterschoot, B., De Backer, O., & Dumont, P. (2015). Decrease of mitochondrial p53 during late apoptosis is linked to its dephosphorylation on serine 20. *Cancer biology & therapy*, 16(9), 1296-1307.
- Castrogiovanni, C., Waterschoot, B., De Backer, O., & Dumont, P. (2018). Serine 392 phosphorylation modulates p53 mitochondrial translocation and transcription-independent apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 190.

- 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), 49-63.
- 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), 11-19.
- 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.
- 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.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., Petrenko, O., & Moll, U. M. (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Molecular and cellular biology*, *24*(15), 6728-6741.
- 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.
- Filichia, E., Hoffer, B., Qi, X., & Luo, Y. (2016). Inhibition of Drp1 mitochondrial translocation provides neural protection in dopaminergic system in a Parkinson's disease model induced by MPTP. *Scientific reports*, *6*, 32656.
- 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.
- Gu, Z., Li, L., Wu, F., Zhao, P., Yang, H., Liu, Y., . . . Su, L. (2015). Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca²⁺ dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Scientific reports*, *5*, 11497.
- 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*.
- Guo, X., Sesaki, H., & Qi, X. (2014). Drp1 stabilizes p53 on the mitochondria to trigger necrosis under oxidative stress conditions in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, *461*(1), 137-146.

- Gupta, S., De, S., Srivastava, V., Hussain, M., Kumari, J., Muniyappa, K., & Sengupta, S. (2013). RECQL4 and p53 potentiate the activity of polymerase γ and maintain the integrity of the human mitochondrial genome. *Carcinogenesis*, 35(1), 34-45.
- 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 biology*, 6(8), e204.
- Halestrap, A. P. (2014). The C ring of the F1Fo ATP synthase forms the mitochondrial permeability transition pore: a critical appraisal. *Frontiers in oncology*, 4.
- 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.
- Heyne, K., Schmitt, K., Mueller, D., Armbruester, V., Mestres, P., & Roemer, K. (2008). Resistance of mitochondrial p53 to dominant inhibition. *Molecular cancer*, 7(1), 54.
- Chang, C. R., & Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 34-39.
- 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., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., & Deppert, W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cellular and molecular life sciences*, 55(1), 12-27.
- Jin, W., Liu, H., Zhang, Y., Otta, S. K., Plon, S. E., & Wang, L. L. (2008). Sensitivity of RECQL4-deficient fibroblasts from Rothmund–Thomson syndrome patients to genotoxic agents. *Human genetics*, 123(6), 643-653.
- Kaguni, L. S. (2004). DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 293-320.
- Kang, D., Kim, S. H., & Hamasaki, N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7(1), 39-44.
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., . . . Robbins, J. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife*, 2, e00772.
- 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.
- Koczor, C. A., Torres, R. A., Fields, E. J., Boyd, A., & Lewis, W. (2013). Mitochondrial matrix P53 sensitizes cells to oxidative stress. *Mitochondrion*, 13(4), 277-281.
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479.
- 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.
- Kulawiec, M., Ayyasamy, V., & Singh, K. K. (2009). p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway. *Journal of carcinogenesis*, 8.

- Lebedev, I., Nemajerova, A., Foda, Z. H., Kornaj, M., Tong, M., Moll, U. M., & Seeliger, M. A. (2016). A novel in vitro CypD-mediated p53 aggregation assay suggests a model for mitochondrial permeability transition by chaperone systems. *Journal of molecular biology*, 428(20), 4154-4167.
- Leu, J.-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), 443-450.
- 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.
- Lin, H., Zhao, L., Ma, X., Wang, B.-C., Deng, X.-Y., Cui, M., . . . Shao, Z.-W. (2017). Drp1 mediates compression-induced programmed necrosis of rat nucleus pulposus cells by promoting mitochondrial translocation of p53 and nuclear translocation of AIF. *Biochemical and biophysical research communications*, 487(1), 181-188.
- Loeb, L. A., Wallace, D. C., & Martin, G. M. (2005). The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18769-18770.
- 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, 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.
- Martinou, J.-C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., . . . Pietra, C. (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 13(4), 1017-1030.
- 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.
- Matissek, K. J., Mossalam, M., Okal, A., & Lim, C. S. (2013). The DNA binding domain of p53 is sufficient to trigger a potent apoptotic response at the mitochondria. *Molecular pharmaceutics*, 10(10), 3592-3602.
- 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.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., & Herrmann, J. M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 121(7), 1059-1069.
- 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.

- Mossalam, M., Matissek, K. J., Okal, A., Constance, J. E., & Lim, C. S. (2012). Direct induction of apoptosis using an optimal mitochondrially targeted p53. *Molecular pharmaceuticals*, 9(5), 1449-1458.
- 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 & Differentiation*, 6(11).
- Noda, N., Awais, R., Sutton, R., Awais, M., & Ozawa, T. (2017). Dynamic monitoring of p53 translocation to mitochondria for the analysis of specific inhibitors using luciferase-fragment complementation. *Biotechnology and bioengineering*, 114(12), 2818-2827.
- 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.
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a001008.
- 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.
- Park, J. H., Zhuang, J., Li, J., & Hwang, P. M. (2016). p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS letters*, 590(7), 924-934.
- Petkovic, M., Dietschy, T., Freire, R., Jiao, R., & Stagljar, I. (2005). The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability. *Journal of cell science*, 118(18), 4261-4269.
- Petros, A. M., Gunasekera, A., Xu, N., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-xL-binding interface using NMR. *FEBS letters*, 559(1-3), 171-174.
- 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.
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y.-C., & Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci*, 126(3), 789-802.
- Qiao, C., Lu, N., Zhou, Y., Ni, T., Dai, Y., Li, Z., . . . Wei, L. (2016). Oroxylin A modulates mitochondrial function and apoptosis in human colon cancer cells by inducing mitochondrial translocation of wild-type p53. *Oncotarget*, 7(13), 17009-17020.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 402-412.
- Ropp, P. A., & Copeland, W. C. (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase γ . *Genomics*, 36(3), 449-458.

- Safdar, A., Annis, S., Kraytsberg, Y., Laverack, C., Saleem, A., Popadin, K., . . . Khrapko, K. (2016). Amelioration of premature aging in mtDNA mutator mouse by exercise: the interplay of oxidative stress, PGC-1 α , p53, and DNA damage. A hypothesis. *Current opinion in genetics & development*, 38, 127-132.
- Saha, T., Kar, R. K., & Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in biophysics and molecular biology*, 117(2), 250-263.
- Saleem, A., & Hood, D. A. (2013). Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53–Tfam–mitochondrial DNA complex in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 591(14), 3625-3636.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P., & Orrenius, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *The EMBO Journal*, 18(8), 2040-2048.
- Sangrithi, M. N., Bernal, J. A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W. G., & Venkitaraman, A. R. (2005). Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell*, 121(6), 887-898.
- 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., & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual review of biochemistry*, 66(1), 409-435.
- Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N. E., Higgins, A. M., Tomar, D., Nemani, N., . . . Vallem, S. (2015). SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular cell*, 60(1), 47-62.
- 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 & Differentiation*, 20(2), 198-208.
- 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), 474-479.
- Szabó, I., De Pinto, V., & Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules: II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS letters*, 330(2), 206-210.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajero, 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.

- 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.
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S., & Moll, U. M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, *149*(7), 1536-1548.
- Vaseva, A. V., & Moll, U. M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1787*(5), 414-420.
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., & Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(15), 14473-14476.
- 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.
- 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. (2008). 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., Carrodegua, J. A., Kisker, C., & Bogenhagen, D. F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(1), 374-382.
- 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.
- Zong, W.-X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, *20*(1), 1-15.