

p53 ja sen retrogeenit norsun genomissa

Pia Angervaniva
LuK-tutkielma
Biologian tutkinto-ohjelma, genetiikka
Oulun yliopisto
Toukokuu 2018

Avainsanat: p53, kasvunrajoitegeeni, karsinogeneesi, transkriptiotekijä, norsu, retrogeeni

Sisällysluettelo

| | |
|--|----|
| 1 Johdanto..... | 2 |
| 2 Proteiinin p53 rakenne ja toiminta..... | 5 |
| 2.1 p53:n domeenit..... | 5 |
| 2.2 Proteiinin p53 normaali toiminta..... | 8 |
| 2.2.1 Aktivoituminen..... | 8 |
| 2.2.2 Solusyklin säätely..... | 9 |
| 2.2.3 p53:n säätely..... | 10 |
| 2.3 Proteiinin p53 epänormaali toiminta..... | 12 |
| 3 <i>p53</i> norsun genomissa..... | 14 |
| 3.1 Peton paradoksi..... | 14 |
| 3.2 <i>p53</i> :n kopioiden lukumäärä..... | 14 |
| 3.3 <i>p53</i> :n retrogeenien toiminta..... | 15 |
| 3.4 Huomionarvoista..... | 17 |
| 4 Yhteenveto..... | 18 |
| 5 Kirjallisuusviitteet..... | 20 |

1 Johdanto

Karsinogeneesiin eli syövän syntyyn sisältyy aina onkogeenistä aktiivisuutta, joka viittaa sellaisiin geenimutaatioihin, jotka saavat solun muodostamaan syöpään johtavia kasvaimia. Tällaisia mutaatioita syntyy tyypillisesti DNA:n korjaamisessa tai replikaatiossa. Karsinogeneesiin vaikuttaa olennaisesti myös kasvaimen kasvunrajoitegeenin toiminnan heikkeneminen (Gerard P. Zambetti, 2005, s. 2). Merkittävin kasvunrajoitegeeni on *p53* eli *TP53*, sillä se kykenee toimimaan monipuolisesti potentiaalista onkogeenistä stressiä vastaan soluissa. Geeniin *p53* ja sen tuottamaan samannimiseen proteiiniin *p53* alettiin kiinnittämään huomiota jo vuonna 1979. Geeniä on sittemmin tutkittu jo lähes 40 vuotta, ja monimutkaisuudestaan huolimatta sen tuottama *p53*-proteiini on nykyään yksi parhaiten tunnettuja proteiineja. Sen tutkituin toiminto on sen kyky toimia transkriptiotekijänä. *p53*:een kohdistuva translaation jälkeinen muuntelu sekä vuorovaikutus muiden proteiinien kanssa mahdollistavatkin lukuisten eri geenien transkription hallitsemisen. Tämä edellyttää kuitenkin *p53*:n transkriptionaalisen aktiivisuuden säätelyä monella eri tasolla.

Kon & Privesin (1996) mukaan geeniä *p53* on aluksi pidetty onkogeeninä, koska sen ensimmäisissä tutkimuksissa geenin yliexpression havaittiin johtavan syöpää aiheuttaviin muutoksiin soluissa. 1980-luvun lopulla kuitenkin todettiin geenin *p53* villityypin olevan siltäkin antionkogeeninen eli syövän kasvua ehkäisevä geeni – edellyttäen kuitenkin, että geeni toimii normaalisti. Mutatoituneet muodot proteiinista *p53* ovat lähes aina syöpää aiheuttavia (Ko & Prives, 1996). *p53* löydettiin ensimmäisen kerran, kun SV40 viruksen iso T-antigeenin havaittiin sitoutuvan *p53*:een estäen sen normaalin toiminnan. Havainto oli merkittävä, sillä kyseessä on yksi tärkeimmistä mekanismeista, joiden avulla onkogeeniset virukset aiheuttavat syöpää (Hilary M. Sheppard, Siska I. Corneillie, Christine Espiritu, Andrea Gatti, & Xuan Liu, 1999). Nykyään *p53*:n tiedetään olevan osallisena lähes kaikissa ihmisen syöpätapauksissa joko niin että se on suoraan mutatoituneena, tai siten että geenin aktivoituminen estyy välillisesti solu- tai virusperäisen onkogeenin takia (Y Cho, S Gorina, PD Jeffrey, & NP Pavletich, 1994).

Elimistön normaaliin ja tasapainoiseen toimintaan kuuluu hypertrofiaa eli solujen koon kasvua sekä hyperplasiaa eli solujen lukumäärän kasvua. Syöpäkasvaimen synnyssä kasvu on kuitenkin myös epäjärjestelmällistä. Dysplasiassa solujen kasvuprosessi on epänormaalia, ja sen voidaan luokitella olevan lievää, kohtalaista tai vaikeaa. Dysplasia voi palautua normaaliiksi varsinkin sen lievissä tapauksissa, mutta sen on myös mahdollista pahentua edelleen

vaarallisempaan muotoon, jolloin puhutaan neoplasiasta. Neoplasiassa varsinaiset kasvaimet luokitellaan joko maligneiksi eli pahanlaatuisiksi tai benigneiksi eli hyvänlaatuisiksi (Kleinsmith, 2014, s. 18). Koko organismin eliniän ajan soluihin kasautuu mutaatioita, jotka voivat lopulta johtaa pahanlaatuisen kasvaimen syntyyn. Olivierin, Hollsteinin & Hainautin (2010) mukaan geenissä *p53* on tapahtunut sitä enemmän mutaatioita mitä pahanlaatuisempi syöpä on kyseessä (Wang ym., 2004a; Wang ym., 2004b; Langerod ym., 2007). Mikäli syöpään liittyy vain vähän *p53*:n mutaatioita, on proteiinin *p53* toiminta tavallisesti tällöin inaktivoituna. Syöpäkasvaimet pääsevät leviämään terveisiin kudoksiin invaasiona, sekä muihin kudoksiin verenkierron ja lymfan kautta metastaasien eli etäpesäkkeiden avulla. Monien syöpäsolujen loputon lisääntyminen perustuu niiden kykyyn tuottaa telomeraasientsyymiä, joka pidentää kromosomien päitä suojaavaa telomeeriä (Kleinsmith, 2014, s. 18-20). Kasvu voi olla nopeaa tai hidasta, mutta kuitenkin jatkuvaa ja se vaikuttaa lopulta kudosten normaaliin toimintaan ja järjestelmällisyyteen. Lukuisat geneettiset sekä epigeneettiset muutokset voivat tarjota valintaedun syöpäsoluille terveiden somaattisten solujen sijaan. Tällaisia muutoksia ovat solun kasvusignaalien itseriittoisuus, kasvua rajoittavien signaalien sivuuttaminen, apoptoosin välttäminen, kestävä angiogeneesi, loputon lisääntyminen, immuunipuolustuksen välttäminen, solun aineenvaihdunnan muuntelu ja kyky lähettää metastaseja sekä tunkeutua viereisiin kudoksiin (Hanahan & Weinberg, 2000). Näin mutatoituneiden solujen somaattisen evoluution seurauksena on tavallisesti syöpä (Merlo, Pepper, Reid, & Maley, 2006).

Syöpää aiheuttavia tekijöitä eli karsinogeneenejä on paljon, mutta ne aiheuttavat usein saman lopputuloksen eli geenimutaation. DNA:ssa voi tapahtua monenlaisia mutaatioita, jolloin sen emäsjärjestys muuttuu. Mutaatiot eivät tule genomiin kuitenkaan aina vain karsinogeenien tuottamina vaan niitä syntyy myös polymeraasien virheinä. Tomasettin, Lin & Vogelsteinin (2017) mukaan syövä syntyy myös replikaation virheistä. On nimittäin havaittu, että normaalien kantasolujen jakautumisen ja syövän esiintyvyyden välillä on voimakas ympäristöstä riippumaton korrelaatio. Monet muutokset genomissa selittyvätkin siis sattunnaisina DNA:n replikaatiovirheinä, eikä esimerkiksi karsinogeenisillä tekijöillä. Tomasetti, Li & Vogelstein (2017) korostavat, että jokaisen ihmisen normaalien kantasolujen jakautumiseen sisältyy aina suunnilleen kolme mutaatiota, (Lynch, 2010; Tomasetti, Vogelstein & Parmigiani, 2013) ja normaalit kantasolut voivat jakautua tavallisesti läpi elämän. Tällä on merkitystä etenkin silloin, jos solun jakautumisia ehtii yksilön eliniän aikana olla paljon,

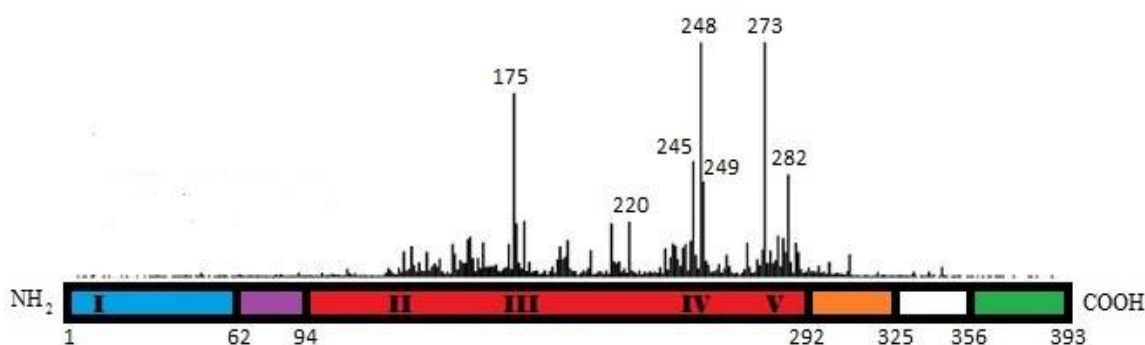
kuten esimerkiksi pitkäikäisillä ja suurikokoisilla nisäkkäillä. Myös ihmisen elämän aikana riski sairastua eri tyyppisiin syöpiin korreloi normaalien kantasolujen jakautumisten lukumäärän kanssa. Tomasettin, Lin & Vogelsteinin mukaan replikaatiovirheistä aiheutuvat mutaatiot edesauttavat jopa ympäristötekijöistä aiheutuvia karsinogeneejä sekä perinnöllisyyttä enemmän syövän syntyä. Syöpää aiheuttavan mutaation ollessa seurausta replikaation virheestä, ei syövän syntyyn voi tällöin vaikuttaa ennaltaehkäisemällä sitä esimerkiksi välttelemällä ympäristön riskitekijöitä (Cristian Tomasetti, Lu Li, & Bert Vogelstein, 2017; Tomasetti & Vogelstein, 2015).

Mikäli *p53* puuttuu yksilöltä kokonaan, on syövän puhkeaminen jo lapsuusiällä lähes väistämätöntä. Vastaavasti *p53*:n ylimääräisillä kopioilla on havaittu olevan merkittäviä vaikutuksia etenkin norsujen genomissa, sillä norsujen tiedetään olevan erittäin vastustuskykyisiä syöpää vastaan. Koska *p53* on olennaisessa osassa myös ihmisen syöpätapauksissa, on geenin ja sen tuottaman proteiinin ymmärtäminen tärkeää. Lisäksi on myös mahdollista, että *p53*:n kopioiden tutkiminen voi tulevaisuudessa tarjota uusia sovelluksia syöpähoitoihin.

2 Proteiinin p53 rakenne ja toiminta

2.1 p53:n domeenit

Proteiinin toiminnan ymmärtäminen edellyttää sen rakenteen tuntemista, sillä proteiinin toiminta on täysin riippuvainen sen kolmiulotteisesta rakenteesta. Nimensä proteiini p53 on saanut sen SDS-PAGE-analyysin mukaan, jossa alun perin arvioitiin sen massan olevan 53 kilodaltonia. Todellisuudessa p53:n massa on noin 43,7 kDa, ja sen pituus ihmisellä on 393 aminohappoa (Kuva 1.). p53:n polypeptidiin sisältyy useita domeeneita, jotka ovat siis proteiinien itsenäisiä toiminnallisia ja rakenteellisia yksiköitä. Domeenien koordinoitu toiminta on välttämätöntä, jotta DNA:n sitoutuminen ja transaktivointi olisivat mahdollisia. Proteiinin p53 (Kuva 1.) aminohappopäässä eli N-päässä sijaitsee transaktivaatiodomeenit TAD1 ja TAD2, ja niiden läheisyydessä on proliinirikas domeeni PRD, joka Baptisten, Friedlanderin, Chenin & Privesin (2002) mukaan osallistuu p53-välitteiseen syöpäsolun kasvun estämiseen ja apoptoosiin (Walker & Levine, 1996; Sakamuro ym., 1997; Venot ym., 1998; Zhu ym., 1999). Ketjun keskellä on DNA-sekvenssejä sitova domeeni DBD, joka sitoutuu spesifisti DNA:han ja aktivoi sellaisten geenien transkriptiota joilla on vastaavat sekvenssit promootoreidensa läheisyydessä. p53:n domeeneihin kuuluu myös oligomerisaatiosta vastaava domeeni sekä karboksyylihappopäässä eli C-päässä sijaitseva etenkin DNA-vaurioita tunnistava domeeni CTD (Kelly D Sullivan, Matthew D Galbraith, Zdenek Andrysik, & Joaquin M Espinosa, 2018; Y Cho ym., 1994).



Kuva 1. p53:n rakenne. Luonnosteltu kuva p53:n domeenirakenteesta. Kuvassa näkyvissä aminohappopää sekä karboksyylihappopää. Aminohappopäästä eli N-päästä domeenit vasemmalta oikealle lueteltuna: transaktivaatiodomeenit (sininen), aminohapot suunnilleen 1-40 ja 40-62, proliinirikas domeeni (violetti), aminohapot 62-94, DNA-sekvenssejä tunnistava domeeni (punainen), aminohapot 94-292, proteiinin oligomerisaatiosta vastaava domeeni (keltainen), aminohapot 325-356 sekä karboksyylihappopäässä eli C-päässä DNA-vaurioita tunnistava domeeni (vihreä), aminohapot 356-393. Roomalaiset numerot merkitsevät konservoituneita proteiinisekvenssejä ja mustat viivat merkitsevät suhteellisia mutaatiofrekvenssejä ihmisen syöpäsairauksissa. Kuva on muokattu lähteiden Cho ym. 1994, *Science*, 265(5170), 346-355 ja Joerger & Fersht (2007) *Oncogene*, 26(15), 2226-2242 kuvista 1a ja 1a.

Chon ym. (1994) mukaan proteiinin p53 keskellä olevassa domeenissa, DBD:ssä, jossa siis tapahtuu DNA:n sitoutuminen, on havaittu tapahtuvan myös suurin osa syöpää aiheuttavia p53:n mutaatioita. Molekyylitasolla tarkasteltuna DBD on tertiäärirakenteeltaan hyvin kompakti tynnyrin muotoinen, itsenäisesti kietoutunut rakenne. DBD:ssä on neljä konservoitunutta proteiinisekvenssiä, (Kuva 1., II-V) jotka Chon ym. mukaan sitoutuvat DNA:n syviin ja mataliin uurteisiin. Vähemmän konservoituneet proteiinisekvenssit puolestaan muodostavat β -levyn. β -levy on vastakkaisuuntaisten β -säikeiden muodostama ja vetysidosten stabiloimaa perusta, joka tukee DNA:n sitoutumista. Domeenin konservoituneet alueet sisältävä rakenne on konformaatioiltaan β -voileipä, jonka tarkoituksena on toimia perustana kahdelle sinkkiatomin avulla yhdessä pysyvälle isolle silmukalle ja silmukka-taso-kierre motiiville. Rakenteeltaan silmukka-taso-kierre motiivi on vuorovaikutuksessa DNA:n syvien uurteiden kanssa, ja isot silmukat vuorovaikuttavat DNA:n matalien uurteiden kanssa, ja juuri näihin rakenteisiin domeenin neljä konservoitunutta kohtaa (Kuva 1., II-V) perustuvat. Mikäli jossain näistä neljästä konservoituneesta alueesta tai β -levyssä tapahtuu mutaatio, puhutaan konformaationaalisista mutanteista (Y Cho ym., 1994). Ko & Privesin (1996) mukaan yleisimmät p53:n mutaatiot tapahtuvat useimmiten yhdessä näistä neljästä konservoituneesta alueesta, (Kuva 1.) jolloin etenkin p53:n kyky sitoutua DNA:han heikkenee (Hollstein ym., 1994). Zambettin (2005, 32) mukaan DNA:n sitoutumisesta vastaava domeeni on herkkä mutaatioille myös sen alhaisen sulamislämpötilan takia. Ihmisellä kyseisen domeenin sulamislämpötila on esimerkiksi vain muutama aste $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ yläpuolella. Jokainen konservoitumattomalla alueella tapahtunut substituutio todennäköisesti alentaa domeenin sulamispistettä $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ alapuolelle, jolloin proteiini ei enää kykene laskostumaan. Lisäksi kyseisen domeenin toiminnan kannalta olennainen aminohappo arginiini on altis mutageeneille. Zambetti (2005, s. 201) huomauttaa, että koska moni DBD:n toiminnallisesti tärkeä alayksikkö on arginiini, (Pfeifer ym. 2002) voivat niissä tapahtuvat mutaatiot estää DNA:n sitoutumisen.

Zambettin (2005, s. 36-37) mukaan proteiinin p53 karboksyylihappopää on yhteydessä DNA:n sitoutumisesta vastaavan domeenin ja oligomerisaatiosta vastaavan domeenin kanssa. Koska p53 toimii soluissa tetrameerinä, on proteiinin kvaternaarisrakenteessa yhdistyneenä neljä monomeeria. p53 sitoutuu DNA:han homotetrameerinä, jonka vuoksi jo yhden alleelin haitallinen mutaatio estää koko tetrameerin toiminnan. Näin ollen proteiinissa tapahtuvat mutaatiot ovat dominoivia negatiivisia mutaatioita. Kon & Privesin (1996) mukaan

proteiinin karboksyylihappopää kykenee säätelmään p53:n aktiivisuutta sitoutua DNA:han, sillä karboksyylihappopää sitoutuu itse epäspesifisti eri muodoissa olevaan DNA:han, kuten vaurioituneeseen DNA:han ja tunnistaa näin vaurion (Wang ym. 1993; Balkalkin ym. 1994; Bayle ym. 1995; Lee ym. 1995; Reed ym. 1995). Se kykenee myös yhdistämään DNA:n sitoutumisesta vastaavan domeenin tetramerisaatiosta vastaavan domeenin kanssa. Domeenien välillä tapahtuukin paljon vuorovaikutusta, ja yhden domeenin toiminnallinen muutos vaikuttaa myös muiden domeenien toimintaan. Kon & Privesin (1996) mukaan ainakin karboksyylihappopäässä tapahtuvat deleetit, (Hupp ym. 1992) sitoutuminen vasta-aineeseen tai dnaK-saperoniproteiiniin, (Hupp ym. 1992; Halazonetis ym. 1993) sekä proteiinikinaasien kaseiinikinaasi II (Hupp ym. 1992) tai proteiinikinaasi C (Takenaka ym. 1995) aiheuttama fosforylaatio stimuloivat voimakkaasti p53:n sitoutumista DNA:han. Zambetti (2005, s. 36) kertoo teoksessaan, että proteiinin karboksyylihappopää sekä aminohappopää ovat konformaatioltaan varsin joustavia ja niihin kohdistuukin runsaasti p53:n toimintaa säätelevää translaation jälkeistä muuntelua (Appella & Anderson, 2000; Brooks & Gu, 2003; Xu, 2003).

p53:n tiedetään säätelevän muiden geenien transkriptiota kahden toiminnallisesti erikoistuneen, aminohappopäässä sijaitsevien transkriptiota aktivoivien domeenien TAD1 ja TAD2 avulla. Sullivan ym. (2018) korostavat p53:n toimivan nimenomaan transkription aktivoijana, ei suorana transkription estäjänä. Näin ollen p53 estää siis välillisesti syöpäkasvaimen kasvua aktivoimalla kohdegeenejään. p53 sitoutuu kohdegeeneihinsä spesifisti niiden vaste-elementtien (RE) avulla, jotka Olivierin, Hollsteinin & Hainautin (2010) mukaan sijaitsevat kohdegeenien promoottoreissa tai introneissa (Riley ym., 2008). p53 käyttää siis kahta autonomista transaktivaatiodomeenia aktivoimaan kohdegeenien transkriptiota, ja kohdegeenien transaktivointi edellyttää p53:n sitoutumista sen vaste-elementteihin. Sullivanin ym. (2018) mukaan kummankin TADin inaktivointi lopettaa kaikkien p53:sta riippuvaisten geenien ekspressiomuutokset, jolloin myös p53:n kyky ehkäistä kasvaimen kasvua lakkaa (Brady, ym. 2011). On kuitenkin havaittu, että vain toisen TADin inaktivointi ei estä p53:n toimintaa (Jiang ym., 2011). Sullivan ym. (2018) ehdottavatkin, että evoluution saatossa kaksi TADia on turvannut solujen normaalin elinkierron yhden TADin sijaan. Lisäksi he korostavat, että aminohappopää ei ole edes herkkä mutaatioille toisin kuin polypeptidin keskellä oleva DNA:n sitoutumisesta vastaava domeeni (Soussi, Kato, Levy & Ishioka, 2005).

Orenin & Rotterin (1999) mukaan proteiinin p53 ei-mutatoitunutta muotoa eli sen villityyppiä kutsutaan myös wtp53-proteiiniksi, ja sen muoto on soluissa tavallisesti latentti eli se on läsnä mutta ei aktiivinen. Solujen tuottama p53-proteiini ei latentissa muodossaan ole vielä aktiivinen transkriptiotekijä eikä se näin ollen sitoudu tehokkaasti DNA:n vaste-elementeiksi kutsuttuihin jaksoihin. Vasta proteiiniin p53 kohdistuva translaation jälkeinen muuntelu aiheuttaa siihen konformaatiomuutoksen joka mahdollistaa proteiinin sitoutumisen sen vaste-elementteihin. Latentin p53:n aktivoituminen on monimutkainen prosessi, johon sisältyy sekä p53:n muokkausta, että p53:n vuorovaikutusta muiden proteiinien kanssa (Oren & Rotter, 1999). Zambettin (2005, 7) mukaan on havaittu, että p53:n aminohappopäässä tapahtuva seriniin ja treoniiniin fosforylaatio, karboksyylihappopäässä tapahtuva lysiiniin asetylaatio sekä koko proteiinin stabilointi aiheuttavat todennäköisesti p53:n konformaatiomuutoksen, joka mahdollistaa proteiinin aktivoitumisen ja edelleen sitoutumisen DNA:han (Jayaraman & Prives 1999; Prives & Manley 2001).

2.2 Proteiinin p53 normaali toiminta

2.2.1 Aktivoituminen

Zambettin (2005, s. 7) mukaan p53:n tiedetään olevan synteesisä jälkeen hyvin lyhytikäinen soluissa, ja sen puoliintumisajan on havaittu olevan vain noin 6 – 20 minuuttia (Reich ym., 1983). Aktivoituessaan p53 voi kuitenkin aiheuttaa lukuisia solujen sisäisiä sekä solujen välisiä toimintoja, kuten solusyklin keskeytymisen ja apoptoosin sekä esimerkiksi tukahduttaa solun aineenvaihduntaan sisältyvien geenien toiminnan. Oren & Rotter (1999) korostavat aktiivisen p53:n pyrkivän estämään DNA:n vahingoittuneiden solujen jakaantumista, (Lane D. P. 1992) ja se ylläpitää myös DNA:n stabiiliutta solusyklin tarkistuspisteissä sekä aktivoi DNA:ta korjaavia geenejä. Lisäksi p53 vaikuttaa mahdollisesti myös DNA:n replikaatiossa eräänlaisena laaduntarkkailijana. Jotta p53 kykenee ohjailemaan esimerkiksi solujen kasvutekijöiden säätelyä sekä apoptoosia ja soluadheesiota, on sen oltava suoraan tai epäsuorasti vuorovaikutuksessa lukuisten eri geenien kanssa (Oren & Rotter, 1999).

Erilaiset stressisignaalit aiheuttavat proteiinissa erilaisia modifikaatioita ja näin myös p53:n aiheuttamat vasteet eli valinnat mitkä geenit transkriptoidaan, riippuvat stressityypistä (Gerard P. Zambetti, 2005, s. 10). Proteiini p53 onkin hyvin keskeinen säätelyproteiini, joka tulkitsee jatkuvasti vastaanottamiaan signaaleita ja aiheuttaa niiden perusteella vasteita sekä soluissa että koko organismissa. Solujen onkogeeninen stressi aktivoi proteiinin p53 synteesiä ja stabiloi sitä lukuisten eri välittäjien avulla. Ko & Privesin (1996) mukaan etenkin

ionisoiva säteily sekä ultraviolettisäteily indusoivat p53:sta, (Nelson & Kastan, 1994) ja lisäksi jo yksi vaurio DNA:n kaksoisjuosteessa voi aktivoida p53-proteiinin (DiLeonardo ym., 1994). Ko & Prives (1996) lisäävät, että myös olosuhteista aiheutuvan yleisen stressin, (Donohewer & Bradley 1993) kuten hypoksian eli kehon hapenpuutteesta aiheutuvan keskushermoston hapenpuutteen sekä kuumuuden ja nälkiintymisen on havaittu mahdollisesti indusoivan p53:ta (Zhan ym., 1993; Graeber ym., 1994).

Zambettin (2005, s. 13) mukaan on havaittu, että eri solulinjojen altistaminen samalle stressitekijälle aiheuttaa usein toisistaan poikkeavia p53:n vasteita. Tämän lisäksi myös samanaisten solujen altistaminen samalle stressitekijälle aiheuttaa usein toisistaan poikkeavia p53:n transkriptionaalisia vasteita, mikä kertoo p53:n monimutkaisesta toiminnasta. Toisaalta tiedetään myös, että p53 aktivoi joidenkin geenien, kuten *p21*:n ja *Mdm2*:n transkription vasteena kaikkiin stressitekijöihin, ja joidenkin geenien transkription vasteena vain tiettyihin stressitekijöihin.

2.2.2 Solusyklin säätely

Solujen elinkierto eli solusykli perustuu solujen jakautumisen eli mitoosin (M-vaihe), ja välivaiheen eli interfaasin (G1-, S- ja G2-vaihe) vuorotteluun. Solusykli on sykliinien sekä sykliineistä riippuvaisten kinaasien (CDK) ohjaamaa. Solusykliä ohjailee useampi CDK, jotka ovat sitoutuneena erilaisiin, solusyklin eri vaiheiden mukaan nimettyihin sykliineihin. Nimensä mukaisesti CDK on toiminnallinen vain sen ollessa sitoutuneena sykliiniin. CDK:t ovat proteiinikinaaseja, entsyymejä jotka säätelevät solusykliä katalysoimalla kohdeproteiinien fosforylaatiota. Fosforylaatioissa fosfaattiryhmä liitetään kohdeproteiiniin. Merkittävä kohdeproteiini on esimerkiksi retinoblastoomaproteiini RB, jonka on havaittu ennen fosforylaatiota estävän solusyklin jatkumista G1-vaiheessa sekä valmistavan solua uuteen solusykliin. Solusykliä kontrolloidaan monella eri tavalla, kuten CDK-sykliinien kanssa yhteydessä olevien kasvutekijöiden avulla. Organismit tuottavat lukuisia erilaisia kasvutekijöitä, jotka stimuloivat kohdesolujen jakaantumista. Esimerkiksi epidermaalinen kasvutekijä EGF stimuloi usean eri solutyypin jakaantumista. Solusyklissä on myös tarkastuspisteitä, joissa pyritään varmistamaan sopivat olosuhteet ennen solusyklin seuraavaan vaiheeseen jatkamista.

Proteiinin p53 on havaittu kontrolloivan solusyklin ensimmäistä tarkistuspistettä vaiheen G1 loppupuolella ja toista tarkistuspistettä vaiheen G2 lopussa (Kleinsmith, 2014, s. 36-41). Vaurioitunut DNA saa aikaan p53:n aktivoitumisen ja solusyklin pysähtymisen, joka tarjoaa lisäaikaa vaurion korjaamiselle (M L Agarwal, A Agarwal, W R Taylor, & G R Stark, 1995).

Zambettin (2005, 54) mukaan p53:n kohdegeenit voidaan jakaa yleisesti kahteen eri kategoriaan sen mukaan, pysäytetäänkö solun jakaantuminen ja mahdollistetaan sen korjaaminen, vai ohjataanko solu suoraan apoptoosiin. Mikäli vauriota ei saada korjattua, ohjaa p53 solun apoptoosiin. Di Leonardon, Linken, Clarkin & Wahlin (1994) mukaan etenkin tarkistuspisteessä G1/S solun toiminnan kannalta on usein tärkeämpää pysäyttää viallista DNA:ta sisältävän solun jakautuminen, kuin yrittää korjata vaurio ennen solusyklin S-vaihetta.

Oren & Rotter (1999) korostavat p53:n tärkeää kohdegeeniä *p21*, jonka koodaama proteiini inhiboi lukuisten sykliineistä riippuvaisten proteiinikinaasien toimintaa (El-Deiry W. S. ym., 1993; Harper J. W. ym., 1993). Kyseinen geeni oli ensimmäisiä tutkittuja p53:n kohdegeenejä, ja nykyään sen tiedetään koodaavan tärkeää solusyklin tarkistuspistettä hallitsevaa proteiinia (Abbas & Dutta, 2009). Agarwalin ym. (1995) mukaan geenin *p21* tuottama proteiini inhiboi sykliiniriippuvaisia G1/S-tarkistuspisteen kinaaseja ja G2/M-tarkistuspisteelle spesifejä cdc2-kinaaseja, ja koska *p21* on p53:n kohdegeeni, kykenee p53 hallitsemaan välillisesti sekä G1/S-vaiheen tarkistuspistettä, että G2/M-vaiheen tarkistuspistettä. Etenkin p53-välitteinen solusyklin pysähtyminen tarkistuspisteessä G2/M on yhteydessä p21:n toimintaan. Fischerin (2017) mukaan CDK:iden inhibointi johtaa retinoblastoomaproteiinin stabilointiin ja aktivointiin, joka on olennaista solusyklin pysähtymisessä (Flatt ym., 2000; Harrington, Bruce & Dyson, 1998). Mutatoituessaan p53 menettää kyvyn hallita solusykliä ja sen tarkastuspisteitä, jolloin genomien translokaatiota tapahtuu enemmän ja genomien stabiilius vähenee (M L Agarwal ym., 1995). Zambettin (2005, s. 18) mukaan solusyklin tarkistuspisteissä ilmenevä p53:n toimimattomuus aiheuttaa lukuisia haitallisia vaikutuksia solun tasapainoon, kuten huonosti ajoittuvaa DNA:n replikoitumista, kromosomaalista epävakautta ja apoptoosin toimimattomuutta.

2.2.3 p53:n säätely

Proteiinin p53 aktiivisuutta säädellään solujen välillä monin eri tavoin, ja etenkin vuorovaikutus sen kohdegeenin *Mdm2* tuotteiden kanssa on merkittävää. Zambettin (2005, s. 9) mukaan *Mdm2*:n tuottama proteiini kykenee sitoutumaan p53:een ja estämään sen aktivoitumisen, tai toimimaan E3-ubikitiiniligaasin kaltaisella tavalla liittäen siihen ubikitiini-säätelyproteiinin. Ubikitiinin lisääminen ohjaa proteiinin proteasomiin hajotettavaksi vähentäen näin toiminnallisten p53-proteiinien lukumäärää (Honda ym., 1997). Näin p53 kykenee aktivoimaan oman inhibiittorinsa, jolloin kyseessä on negatiivinen takaisinkytkentäsilma. Orenin & Rotterin (1999) mukaan Mdm2 on ikään kuin p53:n fysiologinen antagonistti joka

estää p53:n kyvyn aktivoida muiden geenien transkriptiota. DNA:n vaurioituessa erityisesti proteiinin p53 aminohappopään fosforylaatio heikentää p53:n ja Mdm2:n yhteyttä, joka puolestaan kasvattaa proteiinin p53 määrää ja transkriptioaktiivisuutta (Gerard P. Zambetti, 2005, s. 26). Takaisinkytkentäsilmukalla onkin ajateltu olevan tarkoitus proteiinin p53 aktiivisuuden hallitsemisessa esimerkiksi yliekspression varalta, sekä toisaalta p53:n aiheuttamien vasteiden lopettamisessa, kun niille ei ole enää tarvetta (Montes de Oca Luna R., Wagner D. S. and Lozano G., 1995; Jones S. N., Roe A. E., Donehower L. A. and Bradley A., 1995).

Osa p53:n kohdegeeneistä koodaa myös DNA:ta korjaavia proteiineja, (Harris & Sengupta, 2005) ja useita näistä säädellään solusykliissä *p21*-välitteisesti. Roy ym. (2018) ovat havainneet, että p53 on läsnä replikaatiohaarukoissa DNA:n kahdentuessa, ja sillä on merkittävä rooli DNA:n ollessa viallista. Mikäli replikaatiohaarukka pysähtyy vaurion takia, siitä aiheutuva replikaatiostressi saa p53:n ohjaamaan vaurioita korjaavia proteiineja paikalle, jonka jälkeen se käynnistää replikaation uudestaan. Toimimaton p53 korvataan tavallisesti muilla DNA:ta korjaavilla proteiineilla, mutta niillä on havaittu olevan taipumus aiheuttaa mutaatioita (Roy ym., 2018). Erilaisiin DNA-vaurioihin on olemassa erilaisia entsyymaattisia korjausmekanismeja. Esimerkiksi gammasäteilyn aiheuttamat vauriot DNA:n kaksoisjuosteessa aktivoivat ATM-proteiinikinaasia, jota tarvitaan muun muassa p53:n optimaaliseen toimintaan (Herzog, Chong, Kapsetaki, Morgan, & McKinnon, 1998; Rotman & Shiloh, 1998). Tibbetsin ym. (1999) mukaan on havaittu, että ATM kykenee fosforyloimaan proteiinin p53 aminohappopäässä sijaitsevan seriini-15 -yksikön, (Banin ym. 1998; Canman ym. 1998) ja tämän perusteella voidaan päätellä, että ATM aktivoi ja stabiloi suoraan p53:sta. Tibbetsin ym. korostavat, että seriini-15 on toiminnallisesti tärkeä yksikkö, (Fiscella ym. 1993) sillä se fosforyloidaan tavallisesti varhaisessa vaiheessa monenlaista genotoksista stressiä vastaan, (Shieh ym. 1997; Siliciano ym. 1997) ja sen fosforylointi muun muassa vähentää p53:n sitoutumista Mdm2:een (Shieh ym. 1997). Seriinin fosforylaatio kykenee lisäämään sekä p53:n lukumäärää, että aktiivisuutta soluissa. Aktivoitu p53 ekspressoii *p21*:ta, jonka ansiosta CDK-aktiivisuus pysyy matalana ja joka edelleen ylläpitää pitkäkestoista solusyklin pysähtymistä. Vastaavasti toiminnallisen ATM-kinaasin puute soluissa viivästyttää tai vähentää p53:n toimintaa. Vaikka p53 ei ole täysin riippuvainen ATM:sta, niin Tibbetsin ym. (1999) mukaan on havaittu, että ATM:n toimintaan vaikuttavat mutaatiot aiheuttavat puutteellista DNA-vaurioiden tunnistamista solusyklin tarkistuspisteissä sekä yliherkkyyttä

ionisoivalle säteilylle ja epänormaalien kromosomaalisten frekvenssien kasvua (Meyn, 1995; Beamish ym., 1996; Lavin & Shiloh, 1997).

2.3 Proteiinin p53 epänormaali toiminta

Proteiinin p53 epänormaali toiminta on lähes aina syöpää aiheuttavaa. Syöpä on geneettinen sairaus jossa solut jakautuvat hallitsemattomasti ja sen syntyyn eli karsinogeneesiin sisältyy sekä onkogeenien aktivoitumista että syöpäkasvaimen kasvunrajoitegeenin toiminnan heikkenemistä ja virheitä DNA:n kopioimisessa tai korjaamisessa. *p53*:n mutaatiot edesauttavat syövän kehittymistä monin eri tavoin. Olivier, Hollstein & Hainaut (2010) korostavat *p53*:ssa olevien somaattisten mutaatioiden olevan yleisiä suurimmassa osassa syöpäsairauksia, (Hollstein ym., 1991) ja ne johtavat syöpään esimerkiksi munasarjoissa, kurkunpäässä ja ruokatorvessa, paksusuolella, keuhkoissa sekä pään ja kaulan alueilla. Proteiinin p53 anti-proliferatiivinen eli kasvainten solukasvua ehkäisevä rooli erilaisissa stressitiloissa ja fysiologisissa prosesseissa, kuten ikääntymisessä, tekee proteiinista ensisijaisen inaktivoitavan kohteen syöpäkasvaimen synnyssä (Levine, 1997). Geenin *p53* mutaatioita tapahtuu kuitenkin myös sukusoluissa jolloin ne aiheuttavat alttiuden varhaisessa vaiheessa puhkeaviin syöpäsairauksiin, joita Olivier, Hollstein & Hainaut (2010) luettelevat olevan esimerkiksi rintasyöpä, sarkoomat, aivokasvaimet, lisämunaisen karsinoomat sekä Li-Fraumenin oireyhtymä ja muut sen kaltaiset oireyhtymät (Li ym., 1988; Olivier ym., 2003). Li-Fraumenin oireyhtymässä potilas on perinyt vain yhden toiminnallisen alleelin *p53*:sta, jonka vuoksi potilas altistuu lähes väistämättä lukuisille eri syöpäsairauksille elämänsä aikana. Olivier, Hollstein & Hainaut (2010) lisäävät, että kasvunrajoitegeenin *p53* geneettinen variaatio edesauttaa syövän syntyä myös siksi, että *p53* on hyvin polymorfinen sen sekä koodaavilta että ei-koodaavilta alueiltaan ja osa polymorfismeista kasvattaa herkkyyttä altistua syöväälle (Whibley ym., 2009).

Sigalin & Rotterin (2000) mukaan mutatoitunut p53-proteiini on tavallisesti sen kohdegeenin *Mdm2*:n kanssa aiheutuvan negatiivisen takaisinkytkentäsilman vaikutusalueen ulkopuolella, jolloin Mdm2 ei kykenekään enää hiljentämään p53:n toimintaa (Buschmann ym. 2000; Haupt ym. 1997). Zambettin (2005, 18) mukaan yliaktiivisena p53-proteiini saattaa vahingoittaa kantasolujen uusiutumista ja nopeuttaa esimerkiksi yksilön ikääntymistä, ja hallitsemattomana p53-proteiini saattaa myös indusoida hermosolujen apoptoosia ja laukaista jopa neurogeneratiivisia sairauksia joihin sisältyy aivojen rappeutumista. Zambettin (2005, 9) mukaan on olemassa myös pahanlaatuisia tukikudoksesta lähteviä kasvaimia, sarkoomia,

joissa p53 on villityyppinä eli normaalisti toimivana proteiinina, mutta *Mdm2*:n yliekspresso inaktivoi p53:n toimintaa merkittävästi, mikä on luonnollisesti etu syöpäsolulle (Cordon-Cardo ym. 1994). Sullivanin ym. (2018) mukaan lähes jokaisessa syöpätapauksessa on havaittu transkriptiotekijä-p53:n inaktivointia joko p53:n lokuksen mutaatioiden seurauksena tai onkogeenisinä tapahtumina, jotka ovat vähentäneet p53:n villityypin aktiivisuutta esimerkiksi juuri yliekspressoimalla *Mdm2*:sta joka tällöin ehkäisee p53:n toimintaa. Olivierin, Hollsteinin & Hainautin (2010) mukaan p53:n mutaatiot ovat tavallisesti missense-pistemutaatioita jotka aiheuttavat yksittäisiä aminohappomuutoksia. Näin ollen mutaatiot ovat hyvin monipuolisia tyypiltään sekä sekvenssisisällöltään. Syöpätyypit ovat tämän takia myös helposti tunnistettavia p53-mutaatioiden perusteella. Sigalin & Rotterin (2000) mukaan on havaittu, että syöpäsoluissa ekspressoidaan paljon mutanteja p53-proteiineja, mutta toisinaan ne kykenevät uudelleenaktivoitumaan takaisin villityypeikseen (Foster, Coffey, Morin & Rastinejad, 1999). Mikäli mutanteissa versioissa on tapahtunut paljon rakenteellisia muutoksia etenkin DNA:ta sitovassa domeenissa, on niiden uudelleenaktivoituminen silloin epätodennäköisempää (Sigal & Rotter, 2000).

3 p53 norsun genomissa

3.1 Peton paradoksi

Suurikokoisilla ja pitkäikäisillä nisäkkäillä on valtava määrä soluja, jotka ehtivät jakautua lukemattomia kertoja yksilön eliniän aikana. Abegglen ym. (2015) sekä Sulak ym. (2016) esittävät, että jos kaikkien nisäkkäiden solut olisivat yhtä alttiita onkogeenisille mutaatioille, olisi syöpään sairastumisen riski suoraan verrannollinen nisäkkään koon ja eliniän kanssa. Tämä olisi loogista, koska suurilla ja pitkäikäisillä eliöillä ehtii elämänsä aikana tapahtua enemmän solunjakautumisia pieniin, lyhytikäisiin eliöihin verrattuna ja näin ollen niihin ehtii ajan kuluessa kerääntyä myös enemmän onkogeenisia mutaatioita. Teoria ei kuitenkaan kata kaikkia lajeja, vaikka yleisesti ottaen syövän syntymisen onkin ajateltu olevan suoraan verrannollinen yksilön ikääntymisen kanssa. Lisäksi organismin suuren koon evoluution merkittävänä rajoitteena on aina suurentunut riski sairastua syöpään (Sulak ym., 2016). Yksilön ruumiinkoko tai elinikä eivät kuitenkaan korreloi syöpäriskin kanssa, sillä on olemassa suuria, pitkäikäisiä organismeja, jotka ovat pieniä, lyhytikäisiä organismeja vastustuskykyisempiä syöpää vastaan. Peton paradoksilla tarkoitetaan tätä havaintoa, jossa nisäkkään koko ei korreloi syöpäriskin kanssa (Caulin & Maley, 2011). Onkin erittäin todennäköistä, että suurikokoinen ja pitkäikäinen laji on evoluution saatossa kehittänyt jonkinlaisen karsinogeneesiltä suojaavan mekanismin. Greavesin & Erminin (2015) mukaan juuri eläinten suuren koon sekä pitkäikäisyyden ja monimutkaisuuden kehittyminen on mahdollistanut myös syöpäsolujen kehittymisen. Tämän on puolestaan ajateltu aiheuttavan valintapaineen sopeutua syöpäriskiin. Koska monet eri lajit ovat kehittyneet toisistaan riippumatta, on syytä olettaa, että tällaisia mekanismeja on lukuisia (Greaves & Ermini, 2015).

3.2 p53:n kopioiden lukumäärä

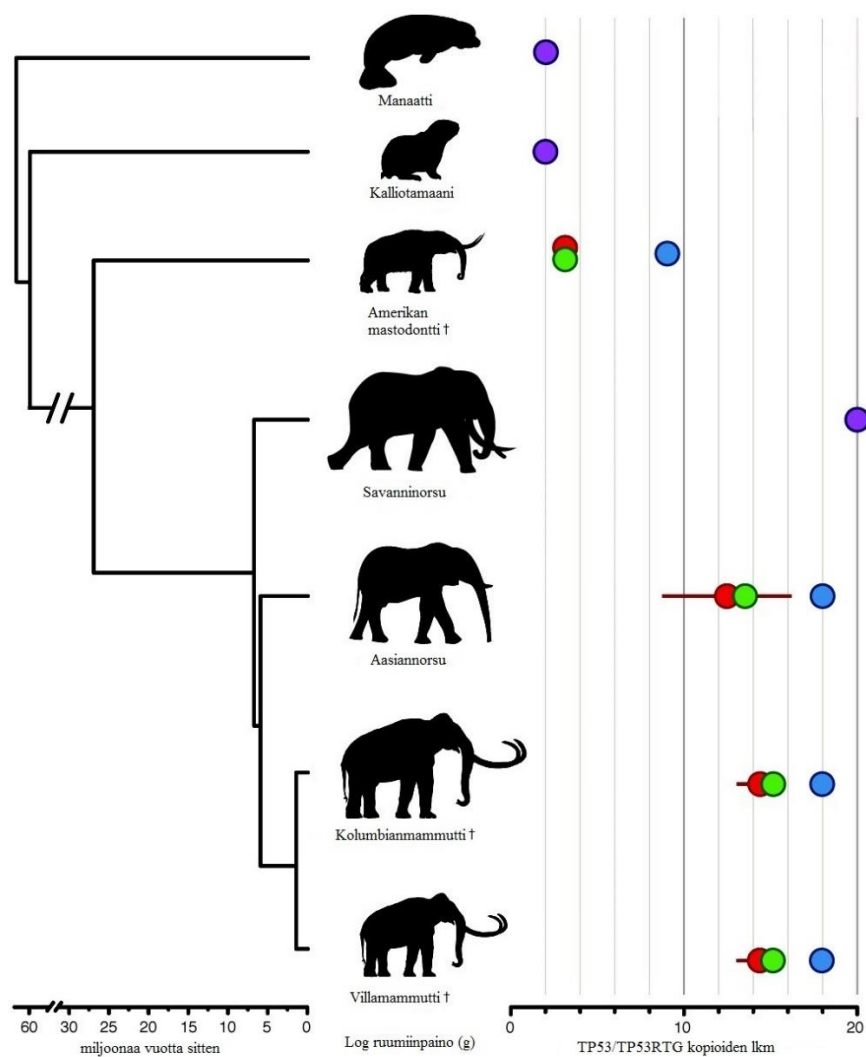
Sekä Abegglenin ym. (2015) että Sulakin ym. (2016) tutkimuksissa lukuisia pitkäikäisiä ja suurikokoisia nisäkäslajeja on tutkittu niiden syövän vastustuskykyisyyden suhteen eristämällä niiden DNA:ta ja kloonamalla ja sekvensoimalla sitä. Etenkin lajien syövästä aiheutuvaa kuolleisuutta on verrattu lajien ruumiinkokoon ja elinikään, mutta tällaista suoranaista yhteyttä tai korrelaatiota ei tutkimuksissa ole havaittu. Tästä huolimatta Abegglenin ym. (2016) mukaan erityisesti afrikannorsun sukuun kuuluvan savanninorsun (*Loxodonta africana*) genomianalyyseista on havaittu, että suuresta koostaan ja pitkäikäisyydestään huolimatta sen riski kuolla syöpään elämänsä aikana on vain noin 4,8 %. Ihmisellä tämä riski on

puolestaan noin 11 % – 25 %. Merkittävä ero ihmisen ja savanninorsun genomien välillä on, että ihmisellä on vain yksi kopio eli kaksi alleelia geeniä *p53* ja norsuilla kopioita on ainakin 20 eli 40 alleelia. Sekvenssilinjauksissa puolestaan on havaittu, että yksi näistä norsun genomien kopioista on verrattavissa muiden nisäkäslajien *p53*-geeniin. 19 muuta kopiota ovat siinä mielessä poikkeuksellisia, että niistä puuttuvat intronit. Tämä viittaa siihen, että norsulla näistä 20 kopiosta 19 ovat *p53*:n retrogeenejä (TP53RTG). Kopioiden välillä havaittiin olevan myös paljon variaatiota (Abegglen ym., 2015).

Abegglenin ym. (2016) mukaan myös aasiannorsun (*Elephas maximus*) DNA:sta on löytynyt 15 – 20 *p53*:n retrogeeniä. Lisäksi aasiannorsulla on havaittu jatkuvaa ikäsidonnaista apoptoosin vähenemistä, jonka perusteella voidaan päätellä, että *p53* on tehokkaimmillaan nuorilla norsuilla. Tämä on loogista, sillä nuoret norsut kasvavat erittäin nopeasti ja runsaasti alle kymmenessä vuodessa jopa niin paljon, että niiden paino nousee tuossa ajassa 100 kilogramman syntymäpainosta yli 3000 kilogrammaan. Nuoressa norsussa tapahtuu siis valtavasti ja nopeasti solunjakoja, joka edellyttää erittäin tarkkaa syöpää ehkäisevää järjestelmää (Abegglen ym., 2015). Sulak ym. (2016) lisäävät, että on tavallista, että syöpäriski kasvaa vasta organismin ohitettua sukukypsyysikänsä ja lisääntyttyä, sillä sen jälkeen valintapaine on pienempi, käytännössä olematon.

Sulakin ym. (2016) mukaan jokaisella tutkitulla suurikokoisella nisäkkäällä on havaittu olevan ainakin yksi kopio geeniä *p53*. Osalla on todettu olevan myös muutama ylimääräinen *p53*:n kopio, jotka olivat siis myös retrogeenejä. Sulak ym. (2016) ovat arvioineet *p53*:n kopioiden lukumäärän 61:lta lajilta, ja niistä on määritetty myös minimi-, maksimi- ja keskiarvoisia lukumääriä. (Kuva 2.) Heidän mukaan esimerkiksi pussieläimillä ja Yangochi-ropteran alalahkoon kuuluvilla lepakoilla on havaittu olevan muutama ylimääräinen *p53*:n retrogeeni (Ciotta ym., 1995; Czosnek ym., 1984; Hulla, 1992; Tanooka ym., 1995; Weghorst ym., 1995; Zakut-Houri ym., 1983). He lisäävät, että myös esimerkiksi pikkusii-litanrekin (*Echinops telfairi*) genomista (Belyi ym., 2010), kalliotamaanin genomista (*Pro-cavia capensis*) sekä lamantiinin eli kynsimanaatin (*Trichechus manatus*) genomista on löydetty yksi ylimääräinen *p53*:n retrogeeni (Kuva 2.) Savanninorsu kuitenkin erottuu muista nisäkkäistä sen 19 retrogeenillä ja lisäksi se on myös norsulajeista suurikokoisin. Sulakin ym. (2016) mukaan toiminnalliset *p53*:n kopiot löytyvät ainoastaan norsulajeilta, ja lisäksi mahdollisesti joiltakin lepakoilta. Savanninorsun DNA:ta verrattiin myös Sulakin ym. (2016) tutkimuksessa aasiannorsun sekä esimerkiksi mammutin ja muiden sen lähisukulais-ten DNA:han. Sulak ym. havaitsivat *p53*:n retrogeenien lukumäärän kasvaneen nopeasti sitä

mukaa, kun norsulajit ovat kehittyneet suurempikokoisiksi. He nimittäin arvioivat (Kuva 2.) aasiannorsulla olevan noin 12-17 *p53*:n retrogeeniä, kolumbianmammutilla (*Mammuthus columbi*) ja villamammutilla (*Mammuthus primigenius*) noin 14, ja 50 000 – 130 000 vuotta vanhalla Amerikan mastodonttimammutilla (*Mammuthus americanum*) noin 3-8 retrogeeniä. Norsun lähin sukulainen on pieni nisäkäslahko, tamaani (*Hyracoidea*), jonka genomissa on havaittu olevan vain yksi kopio geeniä *p53*. Tamaanin ja norsun sukujuuret erosivat toisistaan noin 54-65 miljoonaa vuotta sitten, (Eizirik, Murphy & O'Brien, 2001) ja tämän perusteella voidaan arvioida milloin *p53*:n retrogeenit ovat alun perin kehittyneet (Sulak ym., 2016).



Kuva 2. Arvio TP53/TP53RTG kopioiden lukumäärästä. Norsun fylogeneettinen puu. Arvioon on sisällytetty minimimäärä (vihreä), keskimäärä (punainen) sekä maksimimäärä (sininen) TP53/TP53RTG:n kopioita. Violetit pallot viittaavat genomisekvensseistä arvioituihin TP53/TP3RTG kopioiden lukumäärään. Kuva: Sulak ym., 2016, eLife 2016;5:e11994.

3.3 *p53:n* retrogeenien toiminta

Jokaisen retrogeenin lokuksen välisen alueen on havaittu Sulakin ym. (2016) mukaan olevan homologisia keskenään, ja ne sisältävät saman ainutlaatuisen yhdistelmän transposoituvia elementtejä. Tämän perusteella Sulakin ym. mukaan on todennäköistä, että *p53:n* retrogeenien lukumäärä on kasvanut norsulla etenkin toistuvien segmentaalisten duplikaatioiden takia. Sulak ym. (2016) esittävät, että useat *p53:n* retrogeeneistä ovat toiminnallisia, eli niiden transkriptiota ja translaatiota pitäisi tapahtua. *p53:n* retrogeenit eivät kuitenkaan suoranaisesti toimi *p53:n* tavoin transkriptiotekijöinä, mutta ne säätelevät *p53:n* toimintaa ja edesauttavat näin norsujen solujen tehostunutta herkkyyttä DNA-vaurioiden indusoimaan apoptoosiin. Retrogeeneillä havaittiin olevan kaksi toimintoa, jotka olivat *p53:n* signaloinnin inhibointi silloin kun sille ei ole tarvetta ja vastaavasti *p53:n* signaloinnin aktivointi DNA:n vaurioituessa. TP53RTG:n proteiinit eivät pysty suoraan säätelemään *p53:n* kohdegeenejä, sillä niistä puuttuu olennaisia alayksiköitä, joita tarvitaan ainakin tetramerisaatiossa ja DNA:n sitoutumisessa. Sulakin ym. (2016) mukaan *p53:n* ylimääräisillä kopioilla on mahdollisesti ollut suora rooli norsun suurikokoisuuden ja pitkäikäisyyden evoluutiossa. Mikäli näin on, yhdellä tai useammalla retrogeenillä on tapahduttava transkriptiota, ja Sulak ym. (2016) havaitsivatkin tutkimuksessaan *p53:n* lisäksi myös retrogeenien transkriptiota, etenkin retrogeenin TP53RTG12 voimakasta transkriptiota. Myöskään retrogeenin TP53RTG12 proteiini ei kykene suoraan säätelemään geeniekspressiota, mutta se kykenee monen muun TP53RTG:n proteiinin tavoin mahdollisesti säilyttämään suoran vuorovaikutuksen Mdm2:n kanssa transaktivaatiodomeenissa ja DNA:n sitoutumisesta vastaavassa domeenissa. Sulak ym. (2016) ehdottavatkin TP53RTG-proteiinien toimivan eräänlaisina houkuttimina Mdm2:lle, jonka ansiosta *p53* pääsee sen negatiivisen takaisinkytkentäsilman ulkopuolelle. On myös mahdollista, että TP53RTG-proteiinit suojelevat *p53:sta* Mdm2-välitteiseltä ubiquitiinin lisäämiseltä (Sulak ym., 2016).

Abegglenin ym. (2015) mukaan *p53:n* retrogeenit kasvattavat norsun solujen herkkyyttä DNA-vaurioihin käynnistämällä *p53:sta* riippuvaisen apoptoosin sen sijaan, että DNA:n korjaamista lisättäisiin. Norsun solujen havaittiinkin olevan kaksi kertaa herkempiä DNA:n vaurion indusoimaan apoptoosiin ihmisen soluihin verrattuna. Lymfosyytit kuolevat *p53*-välitteiseen apoptoosiin vasteena DNA:n vaurioihin (Heinrichs & Deppert, 2003; Lowe, Rulley, Jacks & Housman, 1993) samalla kun fibroblastit käyvät läpi sekä *p53*-välitteistä apoptoosia että solusyklin keskeyttämistä (Antoccia ym., 2009; Kastan ym., 1992; Attardi, Vries & Jacks, 2004). Kun DNA:ta vaurioitettiin säteilyllä, havaittiin, että norsun lymfosyytit

kuolivat p53-välitteiseen apoptoosiin nopeammin kuin ihmisen lymfosyytit. DNA-vaurion sattuessa myös kynnysarvo käynnistää p53:sta riippuvainen apoptoosi oli pienempi norsuilla kuin ihmisillä. Norsulla p53:n ylimääräiset kopiot toimivat siis eräänlaisina vahvisteina p53:n vasteissa. Koska p53:n retrogeenien ekspressiota on havaittu, on todennäköistä, että norsujen soluissa on vaihtoehtoinen signaalintijärjestelmä, jota ei ole lajeilla joilta laajentunut TP53/TP53RTG puuttuu. Sulak ym. (2016) kuvaavatkin norsujen olevan erittäin herkkiä genotoksiselle stressille ja hyperaktiivisia p53:n signaalintireitillä. Abegglenin ym. (2015) mukaan norsun DNA:n vaurioitua solukuolemien lisääntyminen on p53-välitteistä, jonka lisäksi tätä toimintaa siis voimistavat ylimääräiset retrogeenit. Norsun evoluutioon on mahdollisesti sisällynyt voimakas valintapaine torjua syöpää, joka on mahdollistanut syövältä suojautumisen lukuisten p53:n kopioiden avulla (Abegglen ym., 2015).

Mikäli ihminen perii vain yhden normaalisti toimivan alleelin p53:sta, kuten Li-Fraumenin syndroomassa ja sen kaltaisissa syndroomissa, on kyseisen yksilön riski sairastua syöpään elämänsä aikana lähes 100 %. Useampi eri syöpä puhkeaa tuolloin tavallisesti jo nuorella iällä. Sulak ym. (2016) vertaavat tätä tutkimukseen, jossa hiiren genomiin lisättiin ylimääräisiä normaalisti toimivia p53:n kopioita. Ne nimittäin aiheuttivat resistenssiä syöpää vastaan, mutta myös lyhensivät hiiren elinikää (Maier ym., 2004) ja kiihdyttivät ikääntymistä, (Tyner ym., 2002) sekä vähensivät kasvua ja kasvunopeutta (Maier ym., 2004) ja alensivat hiiren hedelmällisyyttä (Allemand ym., 1999, Maier ym., 2004). Hiirellä havaittiin myös muita kehityksellisiä heikentymiä, kuten pienet munuaiset (Godley ym., 1996). Tämän perusteella voidaan päätellä, että vaikka p53:n kopioiden lukumäärä suojelee tehokkaasti syövältä, niin siitä aiheutuu myös kuluja elimistölle (Campisi, 2003; Donehower, 2002; Ferbeyre & Lowe, 2002; Rodier ym., 2007). Norsueläimet ovatkin ilmeisesti kehittäneet mekanismin joka vähentää näitä kuluja. Sulakin ym. (2016) huomauttavat, että hiirelle on kuitenkin lisätty myös vain yksi tai kaksi ylimääräistä toiminnallista kopiota p53:n endogeenisestä lokuksesta, jolloin hiiri on ollut vastustuskykyinen syöpää vastaan ja silti ikääntynyt normaalisti sekä lisäksi pysynyt lisääntymiskykyisenä (García-Cao ym., 2002, 2006; Matheu ym., 2007).

3.4 Huomionarvoista

Abegglenin ym. (2015) huomauttavat, että myös ympäristöllä on vaikutus syövän synnyssä ja esimerkiksi ihmisen ja norsun vertailu on monimutkaista niiden erilaisten elinympäristöjen takia. Ihmiselle on tarjolla hoitoa syöpää vastaan joka voi parhaimmillaan pidentää

ihmisen elinikää. Toisaalta ihminen myös altistuu norsua enemmän karsinogeeneille, joka puolestaan kasvattaa riskiä sairastua syöpään yksilön elämän aikana. Greavesin & Erminin mukaan myös norsun taipumuksella verkkaiseen ja hitaaseen elämäntapaan voi olla vaikutus vastustuskykyisyyteen syöpää vastaan. Hidas aineenvaihdunta, mikä on tyypillistä suurikokoisille ja pitkäikäisille nisäkkäille, (Weiss, 1989) pitää etenkin epiteelin solut normaaleina. Tämä on olennaista verratessa norsua ihmiseen, sillä juuri ihmisen epiteelissä ilmenee suurin osa syöpätapauksista (Greaves & Ermini, 2015). Norsun *p53* vaatii kuitenkin paljon lisätutkimuksia, sillä se saattaa poiketa ihmisen vastaavasta geenistä etenkin, kun kyseessä on *p53*:n vuorovaikutus *p21*:n ja *Mdm2*:n kanssa (Abegglen ym., 2015).

Greaves & Ermini (2015) huomauttavat, että vaikka *p53* suojeleekin norsua syövältä, on kuitenkin olemassa myös muita suurikokoisia ja pitkäikäisiä nisäkkäitä joille on kehittynyt erilaisia toimintoja syöpää vastaan. Esimerkiksi valaat ovat tällaisia nisäkkäitä. Niiden genomista on löydetty vain yksi kopio *p53*-geeniä, mutta niillä on sen sijaan arveltu olevan hyperkasvaimia, jotka tuhoavat tai hajottavat pahanlaatuisia kasvaimia (John D. Nagy, Erin M. Victor, & Jenese H. Cropper, 2007). Myös kaljurotta, *Heterocephalus glaber*, on pienikokoisuudestaan huolimatta, muihin jyrsijöihin verrattuna pitkäikäinen laji ja siis vastustuskykyinen syöpää vastaan. Greavesin & Erminin (2015) mukaan *H. glaberin* genomista on *p53*:n ylimääräisten kopioiden sijaan havaittu hyaluronihapon suurikokoista muotoa, joka estää kasvainten kasvua (Gorbunova, Seluanov, Zhang, Gladyshev & Vijg, 2014).

4 Yhteenveto

p53 on merkittävä proteiini, koska sillä on keskeinen rooli syövän torjunnassa. Sen ensisijaisin sekä tunnetuin tehtävä on toimia transkriptiotekijänä, jolloin se kykenee suoraan aktivoimaan muiden geenien transkriptiota ja ehkäisemään niiden avulla välillisesti syövän kehittymistä. p53 sitoutuu kohdegeeneihinsä spesifisti. p53:n toimintaa säädellään soluissa paljon, ja sen tärkeä kohdegeeni on esimerkiksi *Mdm2*, jonka koodaama proteiini kykenee ehkäisemään p53:n toimintaa. Tämä negatiivinen takaisinkytkentäsilmutta on tärkeä, jotta p53:n vasteet saadaan loppumaan silloin kun niille ei ole tarvetta. p53 säätelee solusykliä sen kahdessa tärkeässä tarkistuspisteessä, (G1/S ja G2/M) joissa se voi aiheuttaa solusyklin pysähtymisen tai ohjata solun apoptoosiin. Sen tarkoituksena on pyrkiä estämään vaurioitunutta DNA:ta sisältävien solujen jakaantumista. Toiminta perustuu p53:n toiseen tärkeään kohdegeeniin *p21*, jonka tuottama proteiini hallitsee solusyklin tarkistuspisteitä. DNA-juosteiden vaurioiden lisäksi p53:n toimintaa aktivoivat myös erilaiset stressisignaalit, jotka aiheuttavat muutelmia p53:n rakenteessa. Näin ollen p53:n vasteet riippuvat stressityypistä. Stressisignaalit voivat olla peräisin esimerkiksi ionisoivasta säteilystä ja olosuhteista aiheutuvasta stressistä, kuten nälkiintymisestä.

p53:n epänormaali toiminta on lähes aina syöpää aiheuttavaa, ja ainakin 50 % ihmisen syöpätapauksista liittyy p53:n mutaatioihin. Mutaatiot syntyvät tavallisesti replikaatiossa tapahtuvista virheistä sekä karsinogeenien aiheuttamina. Lisäksi esimerkiksi virukset voivat inaktivoida p53:n toimintaa. p53:n somaattiset mutaatiot ovat yleisiä suurimmassa osassa syöpäsairauksia, mutta mutaatioita tapahtuu myös sukusoluissa. Mikäli ihminen perii vanhemmiltaan vain yhden toiminnallisen alleelin p53:sta, sairastuu hän lähes 100 % todennäköisyydellä lukuisiin eri syöpäsairauksiin elämänsä aikana. Mutatoitunut p53 on tavallisesti *Mdm2*:n aiheuttaman negatiivisen takaisinkytkentäsilmutan ulkopuolella, jolloin p53:n hallitsematon aktiivisuus vahingoittaa kantasolujen uusiutumista ja nopeuttaa yksilön ikääntymistä.

Norsun on arvioitu kuolevan syöpään 4,8 % todennäköisyydellä ja ihmisellä vastaava todennäköisyys on noin 11 % – 25 %. Yksi mahdollinen syy tähän merkittävään eroon ovat p53:n kopiot, joita norsulla on 20 ja ihmisellä vain 1. Norsulla näistä 20 kopiosta 19 ovat p53:n retrogeenejä. Savanninorsulla havaittiin olevan eniten p53:n retrogeenejä, muilla norsuilla niitä oli sitä vähemmän mitä pienempikokoisempi norsulaji oli kyseessä. Retrogeenien lukumäärä on todennäköisesti seurausta transposoituvista elementeistä ja niiden

segmentaalisista duplikaatioista. Retrogeenit kykenevät säätelemään p53:n toimintaa, ja niiden ansiosta norsun solut ovat ihmisen soluja herkempiä reagoimaan DNA-vaurioiden indusoimaan apoptoosiin.

5 Kirjallisuusviitteet

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 460-461. 10.1038/nrc2657
- Abegglen, L. M., Caulin, A. F., Chan, A., Lee, K., Robinson, R., Campbell, M. S., . . . Schiffman, J. D. (2015). Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *Jama*, 314(17), 1850-1860. 10.1001/jama.2015.13134
- Agarwal, M. L., Agarwal A., Taylor W. R., & Stark, G R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8493-8497. 10.1073/pnas.92.18.8493
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., & Prives, C. (2002). The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene*, 21(1), 9-21. 10.1038/sj.onc.1205015
- Caulin, A. F., & Maley, C. C. (2011). Peto's Paradox: evolution's prescription for cancer prevention. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(4), 175-182. 10.1016/j.tree.2011.01.002
- Cho, Y., Gorina S., Jeffrey, PD., & Pavletich, NP. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265(5170), 346-355. 10.1126/science.8023157
- Di Leonardo, A., Linke S. P., Clarkin K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, 8(21), 2540-2551. 10.1101/gad.8.21.2540
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36(28), 3943. 10.1038/onc.2016.502
- Greaves, M., & Ermini, L. (2015). Evolutionary Adaptations to Risk of Cancer: Evidence From Cancer Resistance in Elephants. *Jama*, 314(17), 1806-1807. 10.1001/jama.2015.13153

- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. //doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Harris, C. C., & Sengupta, S. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(1), 44-55. 10.1038/nrm1546
- Herzog, K., Chong, M. J., Kapsetaki, M., Morgan, J. I., & McKinnon, P. J. (1998). Requirement for Atm in Ionizing Radiation-Induced Cell Death in the Developing Central Nervous System. *Science*, *280*(5366), 1089-1091. 10.1126/science.280.5366.1089
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, *26*(15), 2226-2242. 10.1038/sj.onc.1210291
- Kleinsmith, L. J. (2014). *Principles of Cancer Biology*. United Kingdom: Harlow : Pearson Education Limited op. 2014.
- Ko, L. J., & Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development*, *10*(9), 1054-1072. 10.1101/gad.10.9.1054
- Levine, A. J. (1997). *p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division*. UNITED STATES: Elsevier Inc.10.1016/S0092-8674(00)81871-1
- Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, *6*(12), 924-935. 10.1038/nrc2013
- Nagy, J. D., Victor, E M., & Cropper, J H. (2007). Why Don't All Whales Have Cancer? A Novel Hypothesis Resolving Peto's Paradox. *Integrative and Comparative Biology*, *47*(2), 317-328. 10.1093/icb/icm062
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology Collection* (pp. 123-139). United States: Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.10.1101/cshperspect.a001008
- Oren, M., & Rotter, V. (1999). Introduction: p53 – the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *55*(1), 9-11. 10.1007/s000180050265

- Rotman, G., & Shiloh, Y. (1998). ATM: from gene to function. *Human Molecular Genetics*, 7(10), 1555-1563. 10.1093/hmg/7.10.1555
- Roy, S., Tomaszowski, KH., Luzwick, J W., Park, S., Li, J., Murphy, M., & Schlacher, K. (2018). p53 orchestrates DNA replication restart homeostasis by suppressing mutagenic RAD52 and POL θ pathways. *eLife*, 710.7554/eLife.31723
- Sheppard, H. M., Corneillie, S. I., Espiritu, C., Gatti, A., & Liu, X. (1999). New Insights in to the Mechanism of Inhibition of p53 by Simian Virus 40 Large T Antigen. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2746-2753. 10.1128/MCB.19.4.2746
- Sigal, A., & Rotter, V. (2000). Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Research*, 60(24), 6788-6793.
- Sulak, M., Fong, L., Mika, K., Chigurupati, S., Yon, L., Mongan, N. P., . . . Lynch, V. J. (2016). TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. *eLife*, 510.7554/eLife.11994
- Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysiak, Z., & Espinosa, J M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 133. 10.1038/cdd.2017.174
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S., . . . Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 13(2), 152-157. 10.1101/gad.13.2.152
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6217), 78.
- Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330. 10.1126/science.aaf9011
- Zambetti, G. P. (2005). *The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer*. New York, USA : Springer Science, Business Media, Inc.