

BIĄŁKO P53 – STRAŻNIK GENOMU W ZAKAŻENIU WIRUSOWYM

P53 PROTEIN – GUARDIAN OF THE GENOME IN THE VIRAL INFECTION

Monika ZAPAŚNIK^{1,2}, Joanna Magdalena CYMERYS¹

¹Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie;

²Pracownia Neuroplastyczności, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie

Streszczenie: P53 jest wielofunkcyjnym białkiem o masie cząsteczkowej 53 kDa, aktywowanym w odpowiedzi na różnorodne stropy komórkowe. Przyczynia się do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁ oraz do indukcji apoptozy, bierze udział w regulacji transkrypcji genów, w procesie różnicowania się komórek i angiogenezie, zaś do jego najbardziej znanych funkcji należy naprawa uszkodzeń DNA. Niezbędny w sytuacjach stresu komórkowego, mogącego zagrozić integralności genomu, nosi nazwę „strażnika genomu”. Zakażona komórka dąży do uniemożliwienia wirusowi ekspresji genów uruchamiając szlak apoptozy, gdyż jej śmierć może powstrzymać rozprzestrzenianie się zakażenia. W interesie wirusa leży jak najszybsze powielenie genomu i maksymalne odroczenie apoptozy, dąży on również do aktywacji cyklu komórkowego. Różne wirusy w toku koewolucji z organizmem gospodarza wykształciły szereg złożonych mechanizmów modyfikacji komórkowych szlaków biochemicznych zmierzających ku autodestrukcji, w których podstawowym celem wirusa jest p53. W tym artykule dokonano ogólnej charakterystyki p53 zwracając szczególną uwagę na strategię stosowane przez wirusy podczas zakażenia.

Słowa kluczowe: p53, apoptoza, wirus, zakażenie.

Abstract: P53 is a multifunctional protein of 53 kDa, activated in response to various molecular stressors. It is involved in cell cycle arrest in G₁ and induction of apoptosis, regulation of gene transcription, cell differentiation, angiogenesis, but its primary role is DNA repair. Necessary during molecular stress, when genome integrity is threatened, it was titled „the guardian of the genome”. In virus infected cell cellular approach is to prevent virus from gene expression and replication, activating apoptotic pathways, because cell death may defend a whole organism from infection. The aim of a virus is to replicate its genome quickly and delay apoptosis as far as possible to achieve it, as well as to activate cell cycle. Various viruses in course of coevolution with host organisms developed many complex mechanisms of biochemical cellular death pathways modification, in which the main aim of viral attack is p53. This article presents general characteristics of p53 particularly concentrating on viral strategies during infection, especially connected with „the guardian of the genome”.

Key words: p53, apoptosis, virus, infection.

Wykaz stosowanych skrótów: **Apaf-1** (*apoptosis protease activating factor*) – czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne; **ASPP** (*apoptosis stimulating proteins of p53*) – rodzina białek wzmacniających odpowiedź p53; **DISC** (*death-inducing signaling complex*) – kompleks inicjujący śmierć komórki; **EBV** (*Epstein-Barr virus*) – wirus Epsteina-Barr, **HHV4** (*Human herpesvirus 4*) – ludzki herpeswirus 4; **EMCV** (*Encephalomyocarditis virus*) – wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego; **HBV** (*Hepatitis B virus*) – wirus zapalenia wątroby typu B; **HCMV** (*Human cytomegalia virus*) – ludzki wirus cytomegalii, **HHV5** (*Human herpesvirus 5*) – ludzki herpeswirus 5; **HCV** (*Hepatitis C virus*) – wirus zapalenia wątroby typu C; **HHV6** (*Human herpesvirus 6*) – ludzki herpeswirus 6; **HIV** (*Human Immunodeficiency Virus*) – ludzki wirus niedoboru odporności; **HPIV3** (*Human Parainfluenza-3 virus*) – ludzki wirus parainfluenzy 3; **HPV** (*Human papillomavirus*) – ludzki wirus papilloma; **HSV** (*Herpes simplex virus*) – wirus opryszczki; **Mcl-1** (*myeloid cell leukemia sequence 1*) – białko z rodziny Bcl-2 zaangażowane w proces apoptozy; **MDM2** (*murine double minute 2*) – białko przyspieszające ubiquitytację p53; **mt-p53** (*mutant type protein 53*) – postać zmutowana p53; **NF-κB** (*nuclear factor κB*) – czynnik transkrypcyjny κB; **PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*) – białko zaangażowane w replikację DNA; **pRb** (*retinoblastoma 1 protein*) – czynnik transkrypcyjny; **p53wt** – białko kodowane przez gen prawidłowy p53; **PvLT** (*Polyoma virus large T antigen*) – duży antygen T wirusa polioma; **STAT** (*signal transducers and activators of transcription*) – białka przekazujące sygnały i aktywatory transkrypcji; **SUMO** (*small ubiquitin-like modifier*) – białko komórkowe aktywujące białko p53; **SV40** (*Simian virus 40*) – małpi wirus SV40; **TIGAR** (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) – białko regulujące proces glikolizy i odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny; **TNFR** (*tumour necrosis factor receptor*) – receptor dla czynnika martwicy nowotworu; **TNF-α** (*tumour necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **USP7** (*ubi-quitin specific peptidase 7*) – peptydaza specyficzna wobec ubiquityny.

1. WSTĘP

P53 to wielofunkcyjne białko o masie cząsteczkowej 53 kDa, złożone z 393 aminokwasów, kodowane przez gen *tpp53* zlokalizowany na chromosomie 17 [58,69]. Aktywowane jest w odpowiedzi na różnorodne stresory komórkowe, np. promieniowanie gamma, UV, hipoksję, zmiany w budowie czynników wzrostowych, niedobór czynników troficznych, zmiany temperatury i potencjału oksydoredukcyjnego, delecje nukleotydów czy zmiany w budowie mikrotubul. P53 przyczynia się do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁ oraz do indukcji apoptozy, bierze udział w regulacji transkrypcji genów (jest czynnikiem transkrypcyjnym), w procesie różnicowania się komórek, angiogenezie (działa jako jej inhibitor), zaś do jego najbardziej znamienych funkcji należy bezpośrednie przeprowadzanie naprawy uszkodzeń DNA [46,35,10,-40,52,41,61,58,60]. Choć niewymagane w normalnych procesach wzrostu i rozwoju komórek (poza okresem życia płodowego [59]), p53 staje się niezbędne w sytuacjach szeroko rozumianego stresu komórkowego mogącego zagrazić integralności genomu, za które to zasługi otrzymało zaszczytną nazwę „strażnika genomu” [46,24,10,12,40,52,62,61,-58,69]. Inną niezwykle ważną rolą tego białka jest jego działanie przeciwnowotworowe. W ponad połowie wszystkich ludzkich nowotworów następuje utrata funkcji p53, spowodowana najczęściej mutacją punktową w genie p53. P53 jest supresorem nowotworów – ang. *tumour suppressor* [10,50,59,69,60]. Jako czynnik regulujący transkrypcję wielu genów p53 ma wpływ także na inne procesy komórkowe. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na jego udział w regulacji glikolizy i autofagii,

różnicowania i starzenia się komórek oraz przeprowadzania zmian struktur kostnych [59]. Badania myszy pozbawionych genu p53 (tzw. *knockout'ów*) wskazują, obok zwiększonej zachorowalności na różnego typu nowotwory, na obniżenie odporności, zaś wstępne obserwacje pozwalają powiązać zmniejszoną aktywność p53 w komórce z jej opóźnionym starzeniem się [59,69]. Białko to pełni funkcje istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki i ulega aktywacji w sytuacjach stresowych.

Jako czynnik transkrypcyjny białko p53 zbudowane jest z domen wiążących się z DNA i w formie tetramerycznej wiąże się do kwasów nukleinowych przyczyniając się do aktywacji lub zahamowania transkrypcji znacznej liczby genów, sięgającej wg niektórych źródeł ponad 500 [59,58,66]. Poza centralną domeną odpowiedzialną za wiązanie białka z DNA wyróżnić można domenę transaktywacyjną od strony N-końca (w tym miejscu zachodzi fosforylacja) oraz regulatorową domenę C-końcową, za pośrednictwem której białko ulega oligomeryzacji wskutek przyłączania się czynników regulatorowych [9,8,44,20,23,61,59].

P53 należy do małej rodziny białek, której członkami są jeszcze dwa inne białka: p63 i p73 [44,58]. Wykazują one również aktywność transkrypcyjną, regulują apoptozę i cykl komórkowy, nie zaobserwowano jednak by pełniły jakąkolwiek rolę w procesie supresji nowotworzenia. W przeciwieństwie do p53, ich aktywność koncentruje się na normalnych procesach zachodzących w komórce. Mutacja lub utrata funkcji p63 prowadzi do defektów kończyn i zaburzeń rozwoju skóry, zaś analogiczny deficyt p73 powoduje zaburzenia neurologiczne i zmiany zapalne [44].

2. P53 JAKO STRAŻNIK GENOMU

Rola p53 w procesie apoptozy

Apoptoza, będąca jedną z form programowanej śmierci komórki – PCD (*Programmed Cell Death*) to szereg zmian biochemicznych i morfologicznych zachodzących w komórce. PCD jest zjawiskiem naturalnym i niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania wszystkich żywych organizmów, zachodzącym w życiu embrionalnym oraz postnatalnym w narządach i tkankach w celu wyeliminowania niepotrzebnych, martwych bądź uszkodzonych komórek, w cytotoksyczności zależnej od przeciwciał oraz odpowiedzi komórkowej, nadawaniu przywileju immunologicznego, a więc w utrzymaniu homeostazy w organizmie [46,35,22,21,68].

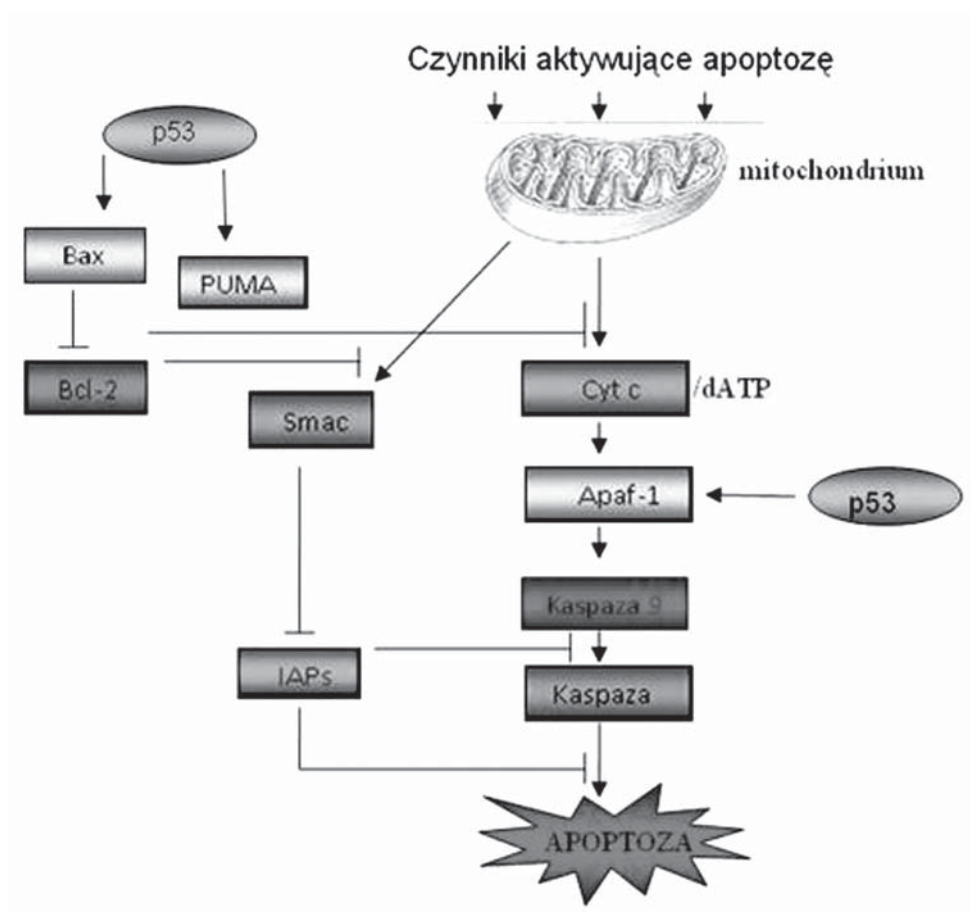
Do aktywacji apoptozy zachodzi pod wpływem czynników fizycznych (np. promieniowanie jonizujące, hipertermia), cytotoksycznych (np. perforyny i granzymy A i B, reaktywne formy tlenu), hormonów i cytokin oraz deficytu czynników wzrostowych i troficznych [22,21,68]. Można wyróżnić dwa szlaki apoptotyczne: zewnętrzny i wewnętrzny. Pierwszy z nich rozpoczyna odebranie sygnału śmierci przez receptory zlokalizowane w błonie komórkowej, prowadzące przez transdukcję sygnału do powstania kompleksu indukującego śmierć – DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) oraz aktywacji kaskady proteaz serynowych zwanych kaspazami, zakończonej kondensacją DNA jądrowego i jego fragmentacją, a nas-

tępnie zmianami pozostałych organelli komórkowych. Przy wewnętrznym przebiegu apoptozy kompleksu DISC powstaje niewiele, dochodzi natomiast do zmian potencjału błony mitochondrialnej. Kaspaza-8 łączy proapoptotyczne białko BID, prowadząc do wypływu cytochromu c z mitochondrium, w następstwie czego powstaje apoptosom, dochodzi do uruchomienia kaskady kaspaz, indukcji zmian na terenie jądra komórkowego oraz w obrębie innych organelli [46,35,21,68,59].

Wprawdzie p53 zaangażowane jest w przebieg obu szlaków apoptozy, jednak silniej wiąże się z wewnętrznym, regulując ekspresję genów kodujących białka biorące udział w procesie PCD [10,59]. Apoptozę zależną od p53 wywołuje działanie takich czynników, jak: uszkodzenie DNA, niedobór czynników wzrostowych, ekspresja onkogenów jądrowych, np. *c-myc*, E2F oraz ekspresja różnych białek wirusowych. W sytuacji, gdy białko p53 znajduje się we właściwej lokalizacji w komórce (a więc w jądrze komórkowym), gdy nie uległo mutacji ani inaktywacji w żaden inny sposób, pod wpływem jego aktywności transkrypcyjnej dochodzi do zwiększenia ekspresji proapoptotycznego białka Bax i zmniejszenia ilości antagonistycznie działającego Bcl-2 [46,35,25,59,14,52,41]. Aktywowane p53 zwiększa również ekspresję Fas przyspieszając jego transport na powierzchnię komórki, dzięki czemu zwiększa się szansa odebrania przez nią sygnału śmierci [46,35,25,58]. Analogicznie dochodzi także do zwiększenia ilości receptorów Trail/DR5/ Killer [35,46]. Najnowsze wyniki badań nad białkami Puma i Noxa [25,62,59,46], należącymi do rodziny Bcl-2, wskazują na ich udział w procesie apoptozy oraz regulacji ich ekspresji przez p53. Ich rola sprowadza się do pośredniego przerywania ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej, a więc procesu dotychczas uznawanego za skutek aktywacji białek Bax i Bak oraz interakcji Bax i Bak z Bcl-2 [25,59,62]. P53 reguluje ponadto ekspresję wielu genów (np. *TIGAR*, *sestryny*), których produkty mają zdolność regulowania odpowiedzi komórki na reaktywne formy tlenu – ROS (*Reactive Oxygen Species*), a więc jednych z czynników indukujących apoptozę na szlaku wewnętrznym, z udziałem mitochondriów [46,35,25,59].

Chociaż znaczenie p53 w procesie apoptozy w dużej mierze opiera się na jego aktywności transkrypcyjnej, zaobserwowano, iż zmutowane białko p53 (mt-53), które nie jest zdolne do aktywacji transkrypcji genów, zachowuje zdolność do indukcji apoptozy. P53 potrafi brać również bezpośredni udział w apoptozie, wchodząc w interakcje z innymi proapoptotycznymi białkami (np. Bax, BclXL) oraz inhibitorami apoptozy z rodziny Bcl-2 [25].

Białko p53 stanowi najpotężniejszy oręż komórki w sytuacji stresu komórkowego, nie od niego jednakże zależy jej ostateczny los. Skierowanie procesów zachodzących w komórce na drogę apoptozy bądź zatrzymania cyklu komórkowego i naprawa zaistniałych szkód zależy od rozmiaru uszkodzeń DNA, obecności lub nie czynników niezbędnych komórce do przetrwania w środowisku zewnątrzkomórkowym, poziomu p53 i modyfikacji potranslacyjnych czy wreszcie od typu komórki [46,35,25,63,59]. Ogólnie rzecz ujmując, niewielkie uszkodzenia DNA spowodowane działaniem stresorów prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego w celu przeprowadzenia naprawy uszkodzeń, zmiany bardziej poważne prowadzą do apoptozy [35,46,63,59].



RYCINA 1. Udział p53 w procesie apoptozy: zwiększenie ekspresji białka Bax powoduje zahamowanie aktywności antyapoptotycznego Bcl-2, dochodzi do przerwania ciągłości błony mitochondrialnej i wypływu cytochromu c oraz czynnika Smac wiążącego IAPs (inhibitory apoptozy) z mitochondrium; ATP-zależny czynnik aktywujący proteazę-1 (Apaf-1) wiąże się z nieaktywną kaspazą-9 tworząc apoptosom, w którym dochodzi do aktywacji kaspazy-9 i uruchomienia kaskady kaspaz, w efekcie której dochodzi do śmierci komórki (opracowanie własne według www.weizmann.ac.il/home/ligivol/apoptosis_project)

Ilość p53 wymagana do skierowania komórki na szlak apoptozy jest wprost proporcjonalna do uszkodzeń DNA i niewielki poziom aktywnego białka powoduje wstrzymanie cyklu komórkowego, zaś jego duża zawartość inicjuje apoptozę. Powyższa zależność jest ważnym elementem regulacji p53 i ma związek z różnym powinowactwem do promotorów indukowanych genów, które jest niskie w przypadku genów szlaku apoptozy i wysokie u genów kodujących białka regulujące cykl komórkowy [35,25,58]. Wstrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcja apoptozy są więc dwiema niezależnymi aktywnościami p53, mogącymi zachodzić w komórce równolegle [25,51].

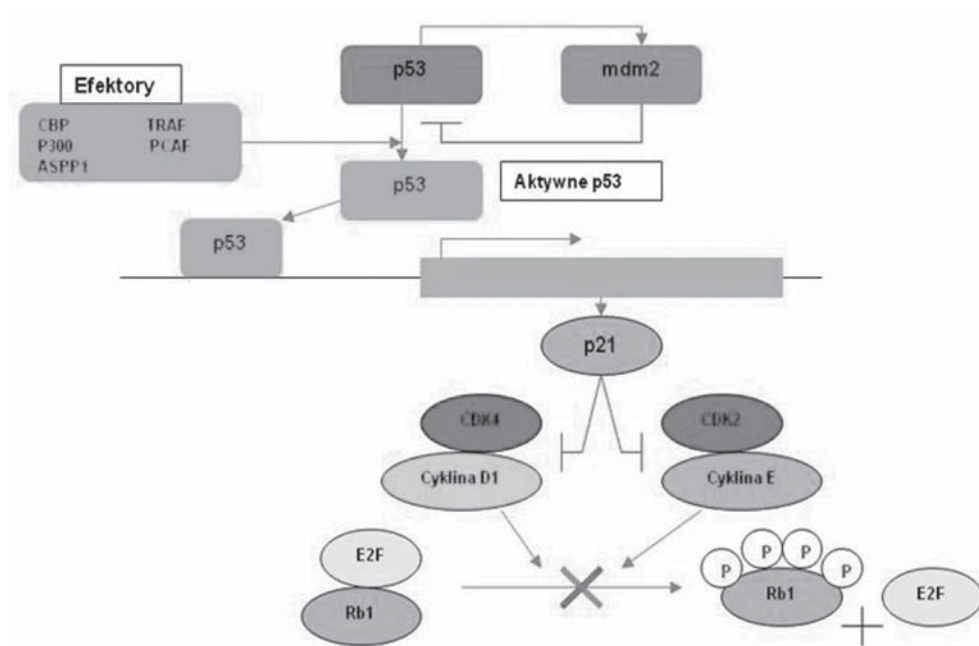
Na proapoptotyczną aktywność p53 ma wpływ szereg czynników. Wspomniane już białko Puma, którego ekspresja jest wynikiem działania aktywnego p53, najprawdopodobniej umożliwia uwolnienie zablokowanego p53 z cytoplazmy i działanie pozatranskrypcyjne przez bezpośrednie interakcje z innymi białkami. P53 tworzy kompleksy z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, m.in. p300/CBP pełniącymi funkcję acetylotransferaz oraz JMY. Ten ostatni czynnik współpracuje wraz z p300 zwiększając zdolność p53 do ekspresji niektórych genów apoptotycznych, np. *Bax* bez równoczesnej indukcji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego (np. *CDKN1A* kodującego p21). Istnieją również białka wiążące się z p53 i bezpośrednio wpływające na jego interakcję z DNA, tzw. koaktywatory transkrypcyjne – ASPP1 i ASPP2. Wzmacniają one przyłączenie się p53 do promotorów genów kodujących białka proapoptotyczne, np.: *Bax*. STAT1 z kolei przyczynia się do zwiększenia ekspresji *Bax*, *Noxa* i *Fas*. E2F1 wiążąc się z p53 bezpośrednio wzmacnia jego aktywność proapoptotyczną, a proces ten regulowany jest przez cyklinę A, która rywalizuje z p53 o związanie E2F1. Czynnik transkrypcyjny NF- κ B bierze udział zarówno w pozytywnej, jak i negatywnej regulacji szlaku apoptozy zależnego od p53: jest m.in. silnym inhibitorem apoptozy w sytuacji związania ligandu (np. z grupy TNF) przez receptory śmierci, potrafi też hamować aktywność p53 wiążąc czynnik p300. Z drugiej strony obecność NF- κ B jest wymagana w procesie indukowanej przez p53 apoptozy. Na zakończenie trzeba wspomnieć o dwóch pozostałych białkach z rodziny p53: p63 i p73, z których obecność przynajmniej jednego jest konieczna do zajścia apoptozy w wyniku aktywacji p53. Wymóg ten można tłumaczyć ich potencjalnym wpływem na aktywację przez p53 transkrypcji genów [35,25,52,41,59].

Rola p53 w regulacji cyklu komórkowego

Cykl komórkowy to proces, podczas którego obserwuje się w komórce wzmoczoną aktywność biosyntetyczną, jej wzrost i podwojenie masy, po której następuje podział całej zawartości komórki, w tym podział jądra komórkowego i równomierny rozdział materiału genetycznego do komórek potomnych [12].

Cykl komórkowy jest regulowany przez kinazy białkowe – Cdk (*cyklin-dependent protein kinases*), które katalizują fosforylację podstawowych białek inicjujących i kontrolujących syntezę DNA, a w efekcie aktywność podziałową komórek. Kinazy te zlokalizowane są w cytoplazmie, zaś ich aktywność objawia się cyklicznie i regulowana jest przez podjednostkę regulatorową cykliny B. Wyróżnia się różne typy kinaz cyklinozależnych regulujące różne fazy cyklu komórkowego. Ich pojawianie się w następujących po sobie kolejno fazach cyklu komórkowego jest wynikiem uruchamiania ekspresji konkretnych genów w ściśle określonej kolejności. Większość genów regulowanych przez kinazy cyklinozależne można podzielić na dwie kategorie: geny wczesnej odpowiedzi, kodujące czynniki transkrypcyjne i geny późnej odpowiedzi, kodujące białka katalizujące ogólne procesy metaboliczne komórki, w tym białka cyklu.

Mechanizmy naprawcze zapobiegające błędom, do których mogło dojść w trakcie replikacji DNA, działają w trakcie cyklu komórkowego na trzech poziomach: fazy G_1 , S i G_2 . Jako białko odpowiedzialne za utrzymanie integralności DNA, p53 wykrywa błędy w skopiowanej nici DNA w fazie G_1 i przyłącza się do jednego z odcinków DNA, powodując zatrzymanie komórki w tej fazie cyklu komórkowego. P53 inicjuje transkrypcję inhibitorów cyklin, wśród których znajdują się białka należące do rodziny p21 (p21, p27 i p57) oraz specyficzne inhibitory Cdk4 i Cdk6 należące do rodziny białek p15 i p16 [46,6,12,25,63]. Jako uniwersalny inhibitor cyklin białko p21 powoduje również zatrzymanie fosforylacji białka Rb (retinoblastoma) oraz nagromadzenie się nieufosforylowanej formy tego białka w komórce. Rb ulega fosforylacji i defosforylacji w trakcie cyklu, zaś przejście do kolejnego jego etapu uzależnione jest w dużej mierze od ufosforylowania Rb przez kinazy zależne od cyklin, w którego efekcie dochodzi do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F aktywującego ekspresję genów potrzebnych do fazy S. Nieufosforylowana postać Rb pozostaje w kompleksie z E2F utrzymując jego inaktywację, w efekcie uniemożliwiając dalsze fazy cyklu komórkowego (ryc. 2) [5,12,25,55]. Białko p21 aktywowane przez p53 zaangażowane jest ponadto w regulację naprawy DNA, zaś przez hamowanie białka PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) białko pomocnicze dla DNA polimerazy δ i ϵ bezpośrednio blokuje replikację DNA [12].



RYCINA 2. Mechanizmy, za pośrednictwem których p53 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_1 . Aktywowane wskutek uszkodzenia DNA białko p53 inicjuje transkrypcję genów, m.in. *p21*, uniwersalnego inhibitora kinaz zależnych od cyklin (Cdk), który uniemożliwia ufosforylowanie białka Rb i tym samym uwolnienie i aktywację czynnika E2F (opracowanie własne według p53.free.fr/p53_info).

Po usunięciu uszkodzenia p53 odłącza się od DNA i zostaje zdegradowane. Jego brak w komórce powoduje zablokowanie inhibitora cyklin, przywrócona zostaje ich synteza i komórka podejmuje swój cykl.

P53 wykazuje również zdolność do zatrzymania komórki w fazie G₂. Wówczas działa jako represor genów kodujących cyklinę B1 i Cdk1, podjednostki czynnika inicjującego mitozę – MPF (*Mitosis Promoting Factor*) oraz topoizomerazy II-alfa umożliwiającej tymczasowe rozdzielenie siostrzanych chromatyd [6].

3. MECHANIZMY REGULACJI P53

Istnieje wiele mechanizmów regulujących aktywność białka p53. Najprostszym sposobem regulacji jest zmiana jego lokalizacji na terenie komórki. Jako czynnik transkrypcyjny p53 znajduje się na terenie jądra komórkowego, w niektórych przypadkach podlega jednak transportowi do cytoplazmy, w której zostaje unieczynnione i ulega degradacji w proteasomie. Dokładne mechanizmy jego transportu oraz miejsce przechowywania w cytoplazmie nie są jednak znane [66,58].

Do najważniejszych regulatorów p53 należy MDM2 (*Murine Double Minute 2*), również HDM2 (*Human Double Minute*) – białko, którego ekspresję indukuje samo p53, tworząc pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego. W komórkach prawidłowych, których funkcjonowanie nie zostało w żaden sposób zaburzone, MDM2 związane jest z p53 unieczynniając je tym samym w utworzonym kompleksie. MDM2 wiąże się do białka od N-końca, blokując domenę transaktywacyjną i uniemożliwiając interakcje koaktywatorów transkrypcyjnych z p53, blokując aktywność transkrypcyjną tego białka [12,17,55,44,61,59,58,66]. MDM2 pełni ponadto inną ważną rolę w regulacji stabilizacji p53 przyczyniając się do jego ubikwitynacji i degradacji w proteasomie. Niski poziom p53 w prawidłowych komórkach jest wynikiem ciągłej degradacji jego nadmiernych ilości przez enzymatyczne modyfikacje białek w procesie ubikwitynacji. W tej specyficznej formie proteolizy nadrzędną rolę odgrywają enzymy zwane ligazami ubikwityny, które do degradowanego białka przyłączają kilka cząsteczek ubikwityny, po czym powstały kompleks jest wprowadzany do proteasomu. MDM2 jest ligazą ubikwityny (E3) i przeprowadza ubikwitynację zarówno p53, jak i siebie [7,9,30,4,32,55,44,66,67]. Podczas tego procesu MDM2 powoduje eksport p53 z jądra do cytoplazmy, gdzie zachodzi jego degradacja. Proces ten jest kolejnym, istotnym mechanizmem regulacji funkcji p53. W cytoplazmie p53 traci aktywność, wyniki badań wskazują zaś, że w niektórych przypadkach transportu do cytoplazmy obecność MDM2 jest konieczna [7,9,30,26,66]. Pisząc o regulacji funkcji p53 przez MDM2 nie sposób nie wspomnieć o białku L11 i jego udziale w procesie proteasomalnej degradacji p53. L11 jest białkiem rybosomu, wiąże się z MDM2 powodując zmianę jego lokalizacji w obrębie jądra komórkowego i hamując jego zdolność do degradacji p53 – pośrednio więc wpływa na utrzymanie w komórce wyjściowej ilości stabilnego i aktywnego białka p53 [26,59]. Analogiczny wpływ na stabilizację p53 ma białko ARF (inaczej: p14ARF), które po połączeniu z MDM2 hamuje jego

aktywność ligazy E3, upośledzając w ten sposób zdolność kierowania białek do degradacji; utworzenie kompleksu ARF-MDM2 może również powodować relokalizację tego ostatniego na teren jąderka i jego inaktywację [26,44,59].

Kolejnym, istotnym mechanizmem regulacji p53 jest jego fosforylacja. Białko może ulegać fosforylacji od C-końca, co ma związek z jego aktywacją oraz od N-końca, wówczas wpływa na jego stabilizację w sytuacji zadziałania czynników stresowych [66]. P53 jest białkiem często fosforylowanym i w zależności od miejsca fosforylacji proces ten może skierować działanie p53 na drogę apoptozy. Zaobserwowano, iż fosforylacja reszt seryny białka p53 w sytuacji stresu komórkowego wywołanego wystawieniem komórki na działanie promieniowania UV lub jonizującego prowadzi, przy udziale różnych czynników (m.in. kinaz ATM i ATR), do indukcji ekspresji genów proapoptotycznych [58,66].

P53 jest przedmiotem wielu potranslacyjnych modyfikacji, wśród których można wyróżnić acetylację i SUMO-lację. Acetylacja C-końca prowadzi do aktywacji zdolności wiązania się p53 do DNA. Za pośrednictwem tego mechanizmu na p53 oddziałują również koaktywatory transkrypcji, m.in. p300. Zahamowanie acetylacji osłabia aktywność transkrypcyjną p53 [58,66]. Podobne do ubikwityny białka SUMO mają zdolność wiązania się do jednej z reszt lizyny p53, która to modyfikacja prowadzi do zwiększenia aktywności transkrypcyjnej tego białka [44,20,23,58,66]. Funkcję regulatorów p53 mogą ponadto pełnić inne białka, z którymi wchodzi ono w interakcje. Wcześniej opisano liczne czynniki białkowe regulujące aktywność p53 w procesie apoptozy. Interakcje z Ref-1 i HMG-1 prowadzą do aktywacji p53, nie wymagającej prawdopodobnie dodatkowych modyfikacji białka, zaś supresory nowotworzenia WT1, BRCA1 WRN, E2F1 i pRb wzmacniają jego działanie poprzez jego stabilizację lub uruchomienie aktywności transkrypcyjnej [66,20,55].

Regulacja tak istotnego dla prawidłowego funkcjonowania komórki składnika jak p53 jest złożona, wieloetapowa i angażuje wiele czynników, które bądź współdziałają ze sobą w jego regulacji bądź oddziałują z białkiem bezpośrednio. Dokładne mechanizmy ich działania są wciąż przedmiotem badań i jak dotąd nie zostały opisane.

4. BIAŁKO P53 I ZAKAŻENIE WIRUSOWE

W komórce zakażonej wirusem dochodzi do pewnego rodzaju walki o przesunięcie istniejącej równowagi sił na jedną ze stron. Komórka dąży do uniemożliwienia wirusowi ekspresji genów i replikacji uruchamiając szlak apoptozy, gdyż jej śmierć może przynieść korzyść organizmowi. W interesie wirusa leży jak najszybsze powielenie swojego genomu i w tym celu stara się maksymalnie odroczyć apoptozę, dąży również do aktywacji cyklu komórkowego. Różne wirusy w toku koewolucji ze swoim gospodarzem wykształciły szereg zaskakująco złożonych mechanizmów modyfikacji komórkowych szlaków biochemicznych zmierzających ku autodestrukcji [2,19,50]. Niniejszy podrozdział koncentruje się na omówieniu tych z nich, w których podstawowym celem wirusa jest białko p53.

Opóźnianie procesu apoptozy

Po wnikięciu do komórki wirus nie tylko zagraża stabilności jej genomu, ale również prawidłowemu przebiegowi metabolizmu, stwarzając ryzyko transformacji nowotworowej. Większość wirusów aktywuje białko p53 w dwojaki sposób: indukując jego odpowiedź na uszkodzenie DNA spowodowaną replikacją wirusowego genomu oraz za pośrednictwem kodowanych przez siebie białek, modyfikujących wewnętrzne szlaki sygnalizacyjne [19,39,21,28]. Zatrzymanie cyklu komórkowego bądź indukcja apoptozy przez aktywowane p53 może uniemożliwić powielanie genomu wirusa. Z tego też powodu wirusy wykształciły szereg strategii inaktywacji lub obejścia mechanizmów działania białka p53.

Wirus Epsteina-Barr (EBV), należący do DNA wirusów z podrodziny γ -herpeswirusów, jest zdolny do zakażenia i transformacji ludzkich limfocytów B, przyczyniając się do powstawania m.in. chłoniaka Burkitta. Jak wskazują dane z eksperymentów *in vitro*, w zakażonych komórkach dochodzi do zatrzymania apoptozy, aktywacji cyklu komórkowego na etapie faz G_0/G_1 oraz G_2/M oraz mutacji w genie p53 [49,37,38,24,64]. Jednym z kodowanych przez EBV onkogenów jest późne białko LMP1, uznawane za główną przyczynę obserwowanego wzrostu poziomu p53 w komórce, do którego dochodzi na skutek aktywacji przez LMP1 jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. EBV, w przeciwieństwie do innych onkogennych wirusów DNA, nie powoduje bezpośredniej degradacji p53. Aktywacja NF- κ B przez LMP1 prowadzi do indukcji białka A20, zapobiegającego indukcji apoptozy przez TNF- α , działając supresyjnie na apoptozę przebiegającą drogą p53-zależną. Ponadto LMP1 aktywuje sygnały wzrostowe drogą TNFR-zależną, a jego najbardziej wyraźną rolą w supresji apoptozy jest zaś wzrost ekspresji Bcl-2 – białka o działaniu antyapoptotycznym, jak również innego białka o podobnym działaniu – Mcl-1 [49,64]. Supresję indukowanej przez p53 apoptozy powoduje również kodowane przez EBV białko BHRF-1 będące homologiem funkcjonalnym Bcl-2 [29,21].

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) wkrótce po wnikięciu do komórki powoduje wzrost ilości aktywnych cyklin E i B, białka pRb w stanie hiperfosforylacji oraz białka p53. Zakażenia HCMV w okresie embriogenezy są główną przyczyną powstawania wrodzonych defektów, takich jak: głuchota, ślepotą, upośledzenie umysłowe i mikroencefalia. Coraz częściej podkreśla się również rolę tego wirusa w procesie powstawania nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem raka prostaty i raka jelita grubego [8]. Wirus cytomegalii koduje dwa białka wczesne, przyczyniające się do zahamowania procesu apoptozy – IE1 i IE2, działające jak czynniki transkrypcyjne. IE2 łączy się z białkami wiążącymi się z TATA-box (czyli z pRb i p53) i hamuje aktywność transkrypcyjną p53. Białko IE2 uniemożliwia p53 transaktywację m.in. p21, jednego z głównych docelowych białek [8,57]. Zaobserwowano ponadto, iż pod wpływem HCMV i EBV następuje gromadzenie się białka p53 w określonych miejscach cytoplazmy – może być to jednym ze sposobów jego inaktywacji [8,57,42].

Ludzki herpeswirus 6 (HHV-6), należący do podrodziny β -herpeswirusów atakuje głównie limfocyty B, może również pozostawać w stanie utajonym w monocytach. HHV-6 koduje białka wchodzące w interakcje z p53 w celu uruchomienia cyklu komórkowego lub zahamowania apoptozy. Dane uzyskane z obserwacji prowadzonych *in vitro* wskazują, że wirus ten koduje białko otwartej ramki odczytu ORF-1 (U14), potencjalnie zdolne do supresji aktywności transkrypcyjnej p53 przez jego związanie [40,53]. U14 nie tylko wiąże p53 i uniemożliwia jego przedostanie się do jądra komórkowego, ale obserwowano także obecność związanego w ten sposób p53 w obrębie nowopowstałych cząstek wirusowych. Nie uzyskano jak dotąd jednoznacznego potwierdzenia supresyjnego wpływu kompleksu z U14 na aktywność p53, stąd możliwy jest udział jeszcze innego, nie wykrytego dotychczas czynnika wirusowego [53].

Adenowirusy (Ad) należą do onkogennych DNA wirusów i choć nie są związane z procesem nowotworzenia u ludzi, ich ludzkie serotypy wywołują powstawanie guzów u szczurów i chomików, zaś wszystkie serotypy adenowirusów powodują transformację nowotworową komórek gryzoni [48,39]. Genom tych wirusów ma złożoną budowę i tworzy go kilka regionów kodujących białka wczesne, wśród których wyróżnić należy E1A, E1B, E2A, E2B, E3 i E4orf6 [42]. Między białkami kodowanymi przez te geny dochodzi do złożonych interakcji, przekierowujących wewnątrzkomórkowe procesy biochemiczne w stronę jej śmierci lub przeżycia. Zdolność do unieśmiertelniania i transformacji wywołwana przez białka regionu E1 wyraża się tylko wtedy, gdy zablokują one śmierć komórki. Jeśli geny kodowane w tym regionie nie ulegną ekspresji, transformowane komórki bardzo szybko giną. Ekspresja genu E1A prowadzi do aktywacji apoptozy, ale dzieje się tak jedynie w przypadku równoległej ekspresji genu p53, którego produkt stabilizowany jest przez obecność białek kodowanych przez E1A. Apoptoza wywołana przez białka E1A za pośrednictwem p53 może być zablokowana przez produkty wirusowych genów z regionu E1B – białka E1B-19K i E1B-55K, które w kooperacji z białkiem E1A mogą doprowadzić do stanu transformacji komórkowej. Białko E1B o masie 19 kDa hamuje apoptozę podobnie jak Bcl-2 powodując zablokowanie oligomeryzacji proapoptotycznych białek Bak i Bax i uwolnienie cytochromu c z mitochondrium; E1B-55K bezpośrednio wiąże się z p53 od N-końca, nie blokując jego wiązania E4orf6 z DNA, oraz ma zdolność tworzenia kompleksów z białkiem E4orf6 – oba te białka blokują aktywność transkrypcyjną p53. E4orf6 to białko kodowane przez region E4 genomu adenowirusów, które blokuje apoptozę indukowaną przez p53 przez bezpośrednie związanie z nim od strony C-końca, co zapobiega gromadzeniu się na terenie komórki białka p53 [56,1,16,14,48,47,42,51,21]. Powyższe mechanizmy wskazują, że w komórce zakażonej przez adenowirusy mogą działać różne sposoby stabilizowania i utrzymywania na niskim poziomie białka p53.

Wiązanie i degradacja p53

W toku rozważań nad białkiem p53 i jego rolą w funkcjonowaniu zarówno prawidłowej, jak i zakażonej komórki warto przybliżyć odkrycie na początku lat 60.

XX wieku małego DNA wirusa, znanego jako Simian Virus 40 (SV40). Obecnie uważa się go za czynnik indukujący u zwierząt laboratoryjnych nowotwory o typie zależnym od drogi inokulacji (białaczki, mięsaki, chłoniaki) [13]. Jednym z produktów kodowanych przez wczesne geny SV40 jest duży antygen T (Tag, inaczej LT) – białko uważane za główny i najbardziej wszechstronny onkogen tego wirusa. Tag odpowiedzialny jest za zainicjowanie replikacji i transkrypcji genomu wirusa, zaś dzięki aktywności zależnej od ATP helikazy umożliwia utworzenie widełek replikacyjnych. Ze względu na swoje kompetencje Tag przyłącza się do komórkowych czynników transkrypcyjnych oraz koaktywatorów transkrypcji, w tym także do p53 to właśnie w kompleksie z białkiem wirusowym Tag pierwszy raz zidentyfikowano je w komórce [13,39,21]. Wkrótce po związaniu z p53 Tag inaktywuje jego zdolność do łączenia się z DNA i funkcjonowania w charakterze czynnika transkrypcyjnego [13,27,31,39,63]. Bez względu na mechanizm działania Tag, nie ma obecnie wątpliwości odnośnie jego zdolności wiązania p53 i inicjowania procesu transformacji nowotworowej zainfekowanych przez SV40 komórek [13].

Działanie adenowirusów w zakażonych komórkach zostało opisane wcześniej, w tym miejscu należy jednak przypomnieć kodowane przez różne regiony genomu tych wirusów białka E1B-55K oraz E4orf6, z których każde z osobna lub oba razem wiążą p53, unieczynniając je w charakterze czynnika transkrypcyjnego. Białka te tworzą kompleks i razem z komórkowymi białkami biorącymi udział w ubikwitynacji wiążą i degradują p53 [56,16,1,25,31,24,53].

Ludzkie wirusy brodawczaków, HPV, to 16 serotypów DNA wirusów, z których niemal wszystkie są odpowiedzialne za powstawanie nowotworów u ludzi. Na czoło wysuwa się z tej grupy niewątpliwie HPV-16, odpowiedzialny za ok. 50% wszystkich raków szyjki macicy [27,52]. W procesie nowotworzenia indukowanym przewlekłym zakażeniem jednym z wirusów HPV nadrzędną rolę przypisuje się dwóm produktom wczesnych genów wirusowych – białkom E6 i E7, zaangażowanym w proces regulacji transkrypcji genów. Podlegają one wspólnej ekspresji, a w zakażonej komórce wykazują funkcjonalną współpracę. E7 wiąże pRb i uruchamia wstrzymany cykl komórkowy, E6 zaś utrzymuje ten proces w czasie zapobiegając apoptozie poprzez związanie p53 i pośredniczenie w jego ubikwitynacji i degradacji w proteasomie. Ze względu na fakt, iż obecność E6 w komórce wiąże się z niskim poziomem aktywnego p53, dochodzi do nagromadzenia w genomie komórki mutacji i błędów, prowadzących do dalszych zmian związanych z transformacją. W procesie całkowitej degradacji p53, oprócz E6, bierze udział jeszcze białko komórkowe E6AP, które w połączeniu z aktywną ubikwityną działa wraz z E6 jako ligaza ubikwityny (E3). E6 łączy się z E6AP i wspólnie przyłączają ubikwitynę do p53, które włączone do tego kompleksu ulega degradacji. E6 przyłącza się również do p53 samodzielnie, wtedy jednak jego oddziaływanie na to białko jest mniej skuteczne niż w obecności E6AP [24,4,32,27,53].

Herpeswirus 4 (HHV 4) koduje dwa białka wiążące p53. Są nimi BZLF1 i EBNA-5. W ten sposób powoduje zablokowanie apoptozy w komórkach, a EBNA-5 dodatkowo wzmacnia ten efekt wiążąc pRb i zatrzymując cykl komórkowy [42]. Wirus hepatitis typu

C (HCV) należy do wirusów o genomie ssRNA(+), zakaża ponad 170 milionów ludzi rocznie i jest główną przyczyną zapalenia wątroby oraz nowotworów tego narządu. Interakcję z białkiem p53 wykazują dwa kodowane przez niego białka – NS3 i NS5A, jednak udział p53 w procesie zakażenia komórki przez HCV nie został w pełni poznany. Najprawdopodobniej jest głównym regulatorem replikacji genomu wirusa, pełni również najpewniej funkcję w procesie obrony komórki przed zakażeniem pośrednicząc w odpowiedzi przeciwwirusowej regulowanej przez interferony (IFN). Wykazano zaangażowanie p53 w zapobiegające proliferacji procesy odpowiedzi na IFN, mechanizmy jego aktywności nie są jednak jasne. Zaobserwowano powstawanie kompleksów złożonych z p53 i czynnika regulacji interferonów 9 (IRF9) w zakażonych komórkach, co pozwala przypuszczać, że białko to bierze udział w regulacji IFN w trakcie zakażenia. W świetle powyższych informacji nie dziwi kodowanie przez HCV białek wiążących p53, jest to strategia obronna wirusa mająca na celu możliwie jak najdłuższe przetrwanie w komórce [11].

Wirus hepatitis B (HBV) jest wirusem DNA wykorzystującym odwrotną transkryptazę i uważa się go za jedną z głównych przyczyn nowotworów wątroby. HBV koduje wielofunkcyjne białko HBx, biorące udział w regulacji transkrypcji, odpowiedzi komórki na stresy, degradacji białek oraz regulacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, a co za tym idzie ma swój wpływ także na przebieg i procesy kontroli cyklu komórkowego, śmierć komórki i jej transformację. Jako czynnik transkrypcyjny HBx reguluje aktywność szeregu genów komórkowych, w tym p53, ekspresja tego białka jest blokowana przez HBx za pośrednictwem regulatorowego elementu jego promotora określanego jako E-box. Wirusowy onkogen wiąże p53 blokując jego funkcję transaktywacyjną, w tworzonym kompleksie zyskuje możliwość modyfikacji jego wpływu na procesy biochemiczne zachodzące w komórce. Co więcej, HBx reguluje również poziom ekspresji p53, białko to jest nie tylko inhibitorem p53 działającym w bezpośredniej interakcji, ale ma także zdolność blokowania ekspresji jego genu [33].

Mutacje w genie p53

Mutacje punktowe w obrębie genu p53 są zjawiskiem powszechnym w większości nowotworów [24,5,34,39]. Unieczynnione w ten sposób białko traci swoją aktywność, umożliwiając modyfikację wewnątrzkomórkowych szlaków regulacyjnych w kierunku transformacji. Do podobnych mutacji może również dochodzić wskutek obecności w komórce wirusa, mutacje w p53 w komórkach zakażonych EBV są regułą, a interakcja pomiędzy p53 a adenowirusowym białkiem E1B-55Kd może powodować ekspresję zmutowanej, nieaktywnej transkrypcyjnie postaci p53 [24,1,23]. Nie wszystkie wirusy powodujące powstawanie nowotworów stosują ten sposób inaktywacji białka, w komórkach zakażonych HPV zmutowana postać p53 należy do rzadkości. Wynika to z faktu stosowania przez wirus alternatywnej strategii supresji, polegającej na wiązaniu p53 i kierowaniu na drogę szybkiej proteolitycznej degradacji. Zawartość białek kodowanych przez HPV w zakażonych komórkach koreluje ujemnie z zawartością aktywnego p53, dzięki czemu wirus ma otwartą drogę do transformacji komórki [24,5,43].

Zmiany regulacji p53

Wirusy kodują białka wpływające na wewnątrzkomórkowe szlaki regulacyjne, umożliwiając w ten sposób replikację genomu wirusa. Modyfikacja szlaków regulacyjnych p53 jest jednym ze skutecznych mechanizmów obrony cząstek wirusowych przed supresyjnym działaniem tego białka. Wirus Polioma (Py), należący do małych wirusów DNA, powoduje różne nowotwory u myszy, szczurów, chomików i królików. Jego genom koduje 3 wczesne białka, duży antygen T (PyLT), średni antygen T (PyMT) i mały antygen T (PyST), z których koekspresja PyMT i PyST wpływa hamująco na indukowane przez p53 zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę na szlaku ARF-p53. ARF jest czynnikiem wiążącym MDM2 i hamującym jego aktywność ligazy, co zapobiega skierowaniu p53 na drogę proteolitycznej degradacji. Wykazano, że wpływ PyMT i PyST na ARF jest przeciwstawny, podczas gdy PyMT stymuluje aktywność ARF przyczyniając się tym samym do zwiększenia stężenia p53 w komórce, PyST działa na ARF hamująco. PyMT działa pośrednio modulując aktywność i przylączając się do różnych białek komórkowych o istotnym udziale w procesie regulacji szlaków wzrostowych aktywuje m.in. kinazę PI3 oraz kinazy Ras-Raf-MAP rozpoczynając transformację komórki. Nieprawidłowości szlaków sygnalizacyjnych prowadzą do aktywacji ARF i w konsekwencji do zwiększenia stężenia aktywnego p53 w komórce. Pomimo iż PyMT działa zapobiegawczo wobec procesu transformacji, wspólnie z PyST mogą do niej doprowadzić, gdyż białko to zapobiega nagromadzeniu p53 w komórce za pośrednictwem ARF za pomocą niewyjaśnionego jak dotąd mechanizmu, w którym ważną rolę odgrywa domena PP2A małego antygeny T [39,24,20].

Infekcja komórek ludzkim wirusem opryszczki – HSV (*Herpes Simplex Virus*) prowadzi do apoptozy. Proces ten przebiega jednak nieco odmiennie niż w zdrowych komórkach ze względu na fakt, iż zaangażowane są białka wirusowe mające na celu zahamowanie śmierci komórkowej. Wiele genów wczesnych, średnich i późnych genomu HSV-1 włącza się czynnie w modulację przebiegu procesu apoptozy w zakażonej komórce, w dużej mierze jest to jednak proces niezależny od p53 [36,3]. Jedno z kodowanych przez wirus białek ICP0 wykazuje jednak zdolność interakcji z p53 i modyfikacji jego regulacji. Zaobserwowano, że łączy się ono z p53 stymulując jego ubikwitynację i degradację, chroniąc komórki przed apoptozą indukowaną promieniowaniem UV. ICP0 reguluje ekspresję i szlaki działania p53 za pośrednictwem ligazy E3 oraz interakcji z USP7, istnieją również niejednoznaczne dane wskazujące, iż wpływa bezpośrednio na stabilizację tego białka [3].

Kodowane przez wirus Epsteina-Barr (EBV) białko BZLF-1, wiążące się z DNA komórki gospodarza i warunkujące ekspresję genów wirusowych, może wpływać bezpośrednio na modyfikacje posttranslacyjne p53, w tym fosforylację N-końca i acetylację C-końca [3]. Zaobserwowano ponadto, że infekcja EBV wiąże się ze zwiększonym stężeniem MDM2 w komórce. Obecności dużej ilości MDM2 towarzyszy również podwyższona ilość p53 nie ulegającego związaniu i degradacji, co sugeruje, że w tym szczególnym przypadku MDM2 wywiera na nie inny wpływ. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego nietypowego zachowania jest zaobserwowana niezdolność p53 do

transaktywacji p21 w komórkach zakażonych, a co za tym idzie do indukcji apoptozy – w ten sposób zwiększona obecność tego niebezpiecznego dla wirusa białka jest tolerowana, zarazem jednak pozbawione jest ono części swoich kompetencji.

Wspomniane już adenowirusy kodują wiele białek wpływających na komórkowe p53 w różny sposób. E1B-156R, białko podlegające ekspresji nieco później niż E1B-55K, wykazuje zdolność wiązania białka Daxx, wykazującego m.in. aktywność czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję innych czynników transkrypcyjnych oddziałujących bezpośrednio z DNA, w tym p53. Dzięki temu mechanizmowi E1B-156R potrafi transformować komórkę [51]. Niebezpieczne dla p53 są ponadto białka E1B-55K oraz E4orf6, mające zdolność wiązania się kolejno do jego domeny N- i C-końcowej, co wpływa na procesy jego regulacji [1,39,47].

Zakażenie niektórymi RNA wirusami, np. wirusem zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) i ludzkim wirusem parainfluenzy 3 (HPIV3), prowadzi do obniżenia poziomu p53 w komórce przez zahamowanie jego translacji. Dochodzi do niego za sprawą pośredniej formy replikacyjnej dsRNA pojawiającego się podczas zakażenia. Jego obecność aktywuje kinazę białkową PKR o działaniu przeciwwirusowym, prowadząc na dalszych etapach szlaków sygnalizacyjnych do apoptozy. Mechanizm, w którym obniżenie poziomu p53 zamiast umożliwienia replikacji genomu wirusa prowadzi do śmierci komórki, jest rezultatem działania PKR indukowanego pojawieniem się wirusowego RNA w komórce. Eksperymentalne zablokowanie aktywności kinazy prowadzi do przewlekłej infekcji wirusowej przy ciągłej ekspresji p53 [27].

PODSUMOWANIE

Jako strażnik genomu p53 chroni komórkę przed różnego typu stresorami komórkowymi, m.in. promieniowaniem gamma, UV, hipoksją, niedoborem czynników troficznych, zmianami temperatury i potencjału oksydoredukcyjnego, delecjami nukleotydów oraz zmianami w budowie mikrotubul. Przyczynia się do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁ oraz do indukcji apoptozy, jako czynnik transkrypcyjny bierze udział w regulacji transkrypcji genów, w procesie różnicowania się komórek, jest inhibitorem angiogenezy, uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA. Niezbędne w sytuacjach stresu komórkowego p53 ma również właściwości przeciwnowotworowe. W ponad połowie wszystkich ludzkich chorób nowotworowych występują mutacje punktowe jego genu prowadzące do utraty funkcji przez to białko.

Biorąc pod uwagę wielofunkcyjność p53 oraz ogromną rolę, jaką pełni w zapewnieniu komórce stabilności genetycznej oraz prawidłowego funkcjonowania, nie dziwi fakt, iż jest ono jednym z głównych celów działań zakażających ją wirusów zwierzęcych. Patogeny te, po wnikięciu do komórki, dążą do jak najszybszego powielenia swojego genomu. W przeciwnym wypadku z komórkowego agresora mogą stać się ofiarą, głównie za sprawą p53. Większość wirusów aktywuje białko p53 w dwojaki sposób: indukując jego odpowiedź na uszkodzenie DNA spowodowane replikacją wirusa oraz za pośrednictwem kodowanych przez siebie białek, mody-

fikujących wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Zatrzymanie cyklu komórkowego bądź indukcja apoptozy przez aktywowane p53 mogą uniemożliwić replikację wirusa. Wirusy ewoluowały równoległe z zakażanymi przez siebie organizmami, jako pasożyty wewnątrzkomórkowe poznały mechanizmy funkcjonowania i obrony komórki oraz wykształciły własne, dostosowane do gospodarza sposoby przetrwania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BERK AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 2005; **24**(52): 7673–7685.
- [2] BEST SM. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol* 2008; **62**: 171–192.
- [3] BOUTELL CI, EVERETT RD. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Induces the Stabilization of p53 in a USP7- and ATM-Independent Manner. *J Virol* 2004; **78**(15): 8068–8077.
- [4] BROOKS CL, GU W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 2006; **21**(3): 307–315.
- [5] BROWN C, KOWALCZYK AM, TAYLOR ER, MORGAN IM, GASTON K. P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virol J* 2008; **5**: 5.
- [6] CAO F, ZHOU T, SIMPSON D, ZHOU Y, BOYER J, CHEN B, JIN T, CORDEIRO-STONE MI, KAUFMANN W. p53-dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G₂ arrest in cadmium-treated fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **218**: 174–185.
- [7] CARTER S, BISCHOF O, DEJEAN AI, VOUSDEN KH. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 2007; **9**(4): 428–435.
- [8] CASAVANT NC, LUO MH, ROSENKE K, WINEGARDNER T, ZURAWSKA AI, FORTUNADO EA. Potential Role for p53 in the Permissive Life Cycle of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 2006; **80**(17): 8390–8401.
- [9] CLEGG HV, ITAHANA K, ZHANG Y. Unlocking the Mdm2-p53 loop: ubiquitin is the key. *Cell Cycle* 2008; **7**(3): 287–292.
- [10] CYMERYŚ J, NIEMIAŁTOWSKI M. Białka szoku cieplnego – molekularne perpetuum mobile. *Post Biol Kom* 2004; **31**(2): 331–352.
- [11] DHARELN, KATO N, MUROYAMAR, TANIGUCHI H, OTSUKA M, WANG Y, JAZAGA, SHAO RX, CHANG JH, ADLER MK, KAWABE T, OMATA M. Potential Contribution of Tumor Suppressor p53 in the Host Defense Against Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2008; **47**: 1136–1149.
- [12] DWORAKOWSKA D. Rola białka p53, pRb, p21, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy. *Onkologia Polska* 2005; **8**(4): 223–228.
- [13] ELIASZ S, CARBONE M, BOCCHETTA M. Simian virus 40 and cancer. *Oncol Rev* 2007; **1**: 131–140.
- [14] HERSHKO T, CHAUSSEPIED M, OREN M, GINSBERG D. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* 2005; **12**(4): 377–383.
- [15] HILL R, BODZAK E, BLOUDH MD, LEE PW. p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* 2008; **7**(16): 2535–2543.
- [16] HOBOM U, DOBBELSTEIN M. E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection. *J Virol* 2004; **78**(14): 7685–7697.
- [17] HSU HL, CHOY CO, KASIAPPAN R, SHIH HJ, SAWYER JR, SHU CL, CHU KL, CHEN YR, HSU HF, GARTENHAUS RB. MGT-1 oncogene downregulates p53 and destabilizes genome structure in the response to DNA double-strand damage. *DNA Repair* 2007; **6**: 1319–1332.
- [18] IAQUINTA PJ, LEES JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**: 649–657.
- [19] KOYAMA AH, FUKUMORI T, FUJITA M, IRIE H, ADACHI A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect* 2000; **2**: 1111–1117.
- [20] KRUSE JP, GU W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009; **137**(4): 609–622.
- [21] KRZYŻOWSKA M, NIEMIAŁTOWSKI M. Supresja apoptozy w zakażeniach chodopokswirusami. *Post Biol Kom* 2003; **30**(2): 273–291.
- [22] KURIBAYASHI K, EL-DEIRY WS. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol* 2008; **615**: 201–221.

- [23] LEVINE AJ, HU WF. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1027–1036.
- [24] LEVINE AJ. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* 2009; **384**(2): 285–293.
- [25] LIEBERMANN DA, HOFFMAN B, VESELY D. p53 Induced Growth Arrest versus Apoptosis and its Modulation by Survival Cytokines. *Cell Cycle* 2007; **6**(2): 166–170.
- [26] LOHRUM MAE, LUDWIG RL, KUBBUTAT MHG, HANTON M, VOUSDEN KH. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 2003; **3**: 577–587.
- [27] MARQUES JT, REBOUILLAT D, RAMANA CV, MURAKAMI J, HILL JE, GUDKOVA, SILVERMAN RH, STARK GR, WILLIAMS BR. Down-Regulation of p53 by Double-Stranded RNA Modulates the Antiviral Response. *J Virol* 2005; **79**(17): 11105–11114.
- [28] MARTIN AG. Molecular biology of cervical cancer. *Clinical & Translational Oncol* 2007; **9**: 347–354.
- [29] McLEAN JE, RUCK A, SHIRAZIAN A, POOYAEI-MEHR F, ZAKERI ZF. Viral manipulation of cell death. *Curr Pharm Des* 2008; **14**(3): 198–220.
- [30] MEULMEESTER E, FRENK R, STAD R, de GRAAF P, MARINE JC, VOUSDEN KH, JOCHEMSEN AG. Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(14): 4929–4938.
- [31] MIYATA Y, YAHARA I. p53-independent association between SV40 large T antigen and the major cytosolic heat shock protein, HSP90. *Oncogene* 2000; **19** (11): 1477–1484.
- [32] MOLL UM, PETRENKO O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 2003; **1**(14): 1001–1008.
- [33] MURAKAMI S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001; **36**: 651–660.
- [34] NARISAWA-SAITO M, KIYONO T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1505–1511.
- [35] NAYAK SK, PANESAR PS, KUMAR H. p53-Induced Apoptosis and Inhibitors of p53. *Curr Med Chem* 2009; **16**(21): 2627–2640.
- [36] NGUYEN ML, BLAHO JA. Apoptosis during herpes simplex virus infection. *Adv Virus Res* 2007; **69**: 67–97.
- [37] O'NIONS J, ALLDAY MJ. Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2. *Oncogene* 2003; **22**: 7181–7191.
- [38] O'NIONS J, TURNER A, CRAIG R, ALLDAY M.J. Epstein-Barr Virus Selectively Deregulates DNA Damage Responses in Normal B Cells but Has No Detectable Effect on Regulation of the Tumor Suppressor p53. *J Virol* 2006; **80** (24): 12408–12413.
- [39] O'SHEA CC, FRIED M. Modulation of ARF-p53 Pathway by the Small DNA Tumor Viruses. *Cell Cycle* 2005; **4**(3): 449–452.
- [40] OSTER B, KASPERSEN MD, KOFOD-OLSEN E, BUNDGAARD, HOLLSBERG P. Human herpesvirus 6B inhibits cell proliferation by a p53-independent pathway. *J Clinical Virol* 2006; **37**(1): 63–68.
- [41] PHILLIPS AC, VOUSDEN KH. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; **7**(3): 173–182.
- [42] PIEKAROWICZ A. Podstawy wirusologii molekularnej. PWN, Warszawa 2004.
- [43] PIETSCH EC, MURPHY ME. Low risk HPV-E6 traps p53 in the cytoplasm and induced p53-dependent apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2008; **7**(12): 1916–1918.
- [44] PIETSCH EC, SYKES SM, McMAHON SB, MURPHY ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; **27**(50): 6507–6521.
- [45] QIAN W, WITMAN KG. Polyoma Virus Middle T and Small t Antigens Cooperate to Antagonize p53-induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Cell Growth Differ* 2000; **11**: 31–39.
- [46] ROOS WP, KAINA B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; **12**(9): 440–450.
- [47] ROYDS JA, HIBMA M, DIX BR, HANANEIA L, RUSSELL IA, WILES A, WYNFORD-THOMAS D, BRAIHTWAITE AW. p53 promotes adenoviral replication and increases late viral gene expression. *Oncogene* 2006; **25**(10): 1509–1520.
- [48] SAMUELSON AV, NARITA M, CHAN HM, JIN J, de STANCHINA E, McCURRACH ME, NARITA M, FUCHS M, LIVINGSTON DM, LOWE SW. p400 is required for E1A to promote apoptosis. *J Biol Chem* 2005; **280**(23): 21915–21923.
- [49] SATO Y, SHIRATA N, KUDOH A, IWAHORI S, NAKAYAMA S, MURATA T, ISOMURA H, NISHIYAMA Y, TSURUMI T. Expression of Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early protein induced p53 degradation independent of MDM2, leading to repression of p53-mediated transcription. *Virology* 2009; **388**: 204–211.

- [50] SHADAN FF. Circadian model of viral persistence. *Medical Hypotheses* 2007; **68**: 546–553.
- [51] SIEBER T, DOBNER T. Adenovirus Type 5 Early Region 1B 156R Protein Promotes Cell Transformation Independently of Repression of p53-Stimulated Transcription. *J Virol* 2007; **81**(1): 95–105.
- [52] STANELLE J, PUTZER BM. E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* 2006; **12**(4): 177–185.
- [53] TAKEMOTO M, KOIKE M, MORI Y, YONEMOTO S, SASAMOTO Y, KONDO K, UCHIYAMA Y, YAMANISHI K. Human Herpesvirus 6 Open Reading Frame U14 Protein and Cellular p53 Interact with Each Other and Are Contained in the Virion. *J Virol* 2005; **79** (20): 13037–13046.
- [54] TOLEDO F, WAHL GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(7-8): 1476–1482.
- [55] TOLEDO F, WAHL GM. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**(12): 909–923.
- [56] TOMITA Y, MARCHENKO N, ERSTER S, NEMAJEROWAA, DEHNERA, KLEIN C. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl-2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8600–8606.
- [57] UTAMA B, SHEN YH, MITCHELL BM, MAKAGIANSAR IT, GAN Y, MUTHUSWAMY R, DURAISAMY S, MARTIN D, WANG X, ZHANG MX, WANG J, VERCELLOTTI GM, GU W, WANG XL. Mechanisms for human cytomegalovirus-induced cytoplasmic p53 sequestration in endothelial cells. *J Cell Sci* 2006; **119**(Pt 12): 2457–2467.
- [58] VOUSDEN KH, LU X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev: Cancer* 2002; **2**: 594–604.
- [59] VOUSDEN KH, LANE DP. p53 in health and disease. *Nature Rev: Mol Cell Biol* 2007; **8**: 275–283.
- [60] VOUSDEN KH, PRIVES C. P53 and Prognosis: New Insights and Further Complexity. *Cell* 2005; **120**: 7–10.
- [61] VOUSDEN KH. Outcomes of p53 activation – spoil for choice. *J Cell Sci* 2006; **119**: 5015–5020.
- [62] VOUSDEN KH. P53 and PUMA: A Deadly Duo. *Science* 2005; **309**: 1685–1686.
- [63] VOUSDEN KH. Switching from life to death: The Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer Cell* 2002; **3**: 351–352.
- [64] WADE M, ALLDAY MJ. Epstein-Barr Virus Suppresses a G₂/M Checkpoint Activated by Genotoxins. *Mol Cell Biol* 2000; **20**(4): 1344–1360.
- [65] WATSON IR, IRWIN MS. Ubiquitin and ubiquitin-like modifications of the p53 family. *Neoplasia* 2006; **8**(8): 655–666.
- [66] WOODS DB, VOUSDEN KH. Regulation of p53 Function. *Exp Cell Res* 2001; **264**: 56–66.
- [67] YANG Y, LUDWIG RL, JENSEN JP, PIERRE SA, MEDAGLIA MV, DAVYDOV IV, SAFIRAN YJ, OBERAJ P, KENTEN JH, PHILLIPS AC, WEISSMAN AM, VOUSDEN KH. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* 2005; **7**: 547–559.
- [68] YU J, ZHANG L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**(3): 851–858.
- [69] YU X, HARRISS L, LEVINE AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; **66**(9): 4795–4801.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 06.05. 2009 r.

Przyjęto: 30.07. 2009 r.

Dr Joanna Cymeryś

Zakład Wirusologii, Katedra Nauk Przedklinicznych,

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW,

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa,

E-mail: jcymerys@op.pl