

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

SEMINARSKI RAD

INHIBITORI KINAZA OVISNIH O CIKLINU

CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITORS

Nikolina Jemin

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate Study of Biology

Mentor : doc. dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. STANIČNI CIKLUS.....	2
3. REGULACIJA STANIČNOG CIKLUSA.....	2
3.1. REGULATORI STANIČNOG CIKLUSA.....	3
4. INHIBITORI KINAZA OVISNIH O CIKLINU (CDKI).....	5
4.1. p21 ^{CIP1}	6
4.1.1. ULOGA p21 U STARENJU.....	9
4.1.2. p21 I TERMINALNA DIFERENCIJACIJA KERATINOCITA.....	9
4.2. p27 ^{KIP1}	11
4.3. p57 ^{KIP2}	12
4.4. INK4 obitelj.....	12
4.4.1. INK4a I STARENJE.....	14
4.4.2. ULOGA INK4a U TUMOROGENEZI.....	15
5. ZAKLJUČAK.....	17
6. LITERATURA.....	18
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY.....	22

1. UVOD

Stanični ciklus je jedan od najvažnijih procesa koji se događa u stanicama. Omogućuje prenošenje identičnog genetičkog materijala iz generacije u generaciju i osigurava da isti ostane kompletno očuvan. Diobom stanica stvara sebi jednako potomstvo i tako doprinosi očuvanju vrste. Stanice su odgovorne u za održavanje homeostaze. Zbog ovih izuzetno važnih funkcija, stanični ciklus, a i ostali procesi u stanicama detaljno su i višestruko regulirani. U slučaju nedostatka ili poremećaja regulacije staničnog ciklusa može doći do nekontrolirane proliferacije, što je jedan od bitnih događaja u procesu karcinogeneze.

U ovom radu predstaviti ću osnove staničnog ciklusa, objasniti prijelaz stanica iz jedne faze u drugu. Razjasnit ću principe regulacije stanične proliferacije i mehanizme koji osiguravaju jednosmjerno napredovanje kroz ciklus te mehanizme provjere i popravka mogućih oštećenja. Napredak kroz stanični ciklus je reguliran na više razina. Osim regulacije faktorima rasta, proliferacija je regulirana i različitim signalima koji inhibiraju napredak. Ovakvi signali djeluju preko indukcije specifičnih inhibitora tj. inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu. Pokazat ću strukturu, funkciju, mehaničku ulogu svakog od inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (CDKI) te objasniti mjesto među ostalim CDKI.

2. STANIČNI CIKLUS

Osnovna i jedinstvena funkcija staničnog ciklusa jest samoreprodukcija odnosno nastanak dvije genetički identične stanice kćeri iz jedne stanice majke. Jedna stanica, prolazeći kroz niz ciklusa, ima potencijal za stvaranje velikog broja svojih kopija.

Diobeni ciklus se sastoji od četiriju procesa, a to su stanični rast, replikacija genetičkog materijala, raspodjela udvostručenih kromosoma i konačno, podjela stanica. Kod eukariota se morfološki mogu razlikovati dva glavna dijela, interfaza i mitozu. Interfaza zauzima najveći dio staničnog ciklusa, i to je razdoblje rasta, replikacije DNA i pripreme stanice za diobu. Postoje tri faze: G1 faza, u kojoj je stanica metabolički aktivna i raste, S faza, u kojoj se odvija udvostručenje DNA, i G2 faza, u kojoj se nastavlja rast i sinteza proteina potrebnih za najdramatičniji dio ciklusa, a to je mitozu. Postoji faza Go, odnosno faza mirovanja, kada se stanice prestaju dijeliti, ali su metabolički aktivne, u koju stanica ulazi ovisno o okolišnim uvjetima. U toj fazi ostaju do pojave određenih stimulansa koji ih potaknu na daljnu proliferaciju. U mitozu dolazi do kondenzacije kromatina, raspodjele kromosoma u stanice kćeri te citokineze. (1)

3. REGULACIJA STANIČNOG CIKLUSA

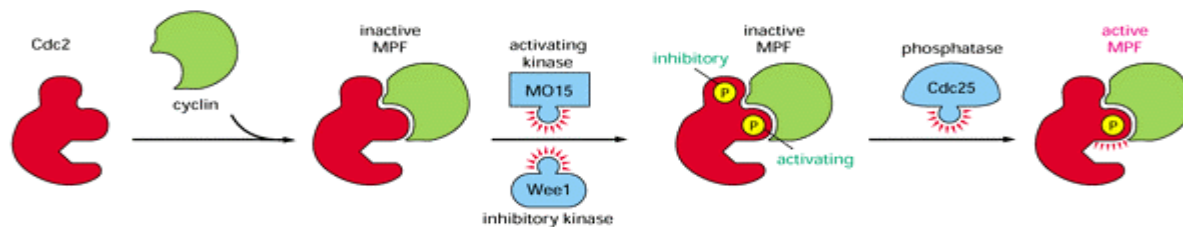
Da bi se osigurala uspješna dioba stanice nužan je jednosmjerni prijelaz iz jedne faze u drugu i to po strogo određenom redosljedu. Stanični procesi moraju biti koordinirani i određeni događaji moraju biti završeni prije nego neki drugi počnu. Ako bi se dogodio početak mitoze prije nego li je replikacija DNA u potpunosti gotova, bilo bi to pogubno za stanicu. Održavanje redosljeda u ciklusu može biti postignuto pomoću različitih mehanizama, npr. kompleksom supstrat-produkt, tako da produkt jedne reakcije služi kao supstrat one iduće (2). Određivanje vremena i redosljeda prijelaza kroz stanični ciklus je pod nadzorom pojedinih pozitivnih i negativnih kontrolnih sklopova. Ovi sklopovi osiguravaju prijelaz kroz kontrolne točke tek nakon dovršetka određenih kritičnih događaja. Dva su tipa kontrolnih sklopova, unutarnji koji su

produkti ekspresije određenih gena, te vanjski koji funkcioniraju kao odgovor na okolišne uvjete npr.faktori rasta (3).

Kontrolne točke su važna mjesta na kojima se odvija regulacija i provjerava jesu li sve radnje vezane za određenu fazu dovršene (4). Glavna kontrolna točka je restriksijska točka (R) koja se nalazi pri kraju pri kraju G1 faze i kontrolira napredovanje u S fazu. Prolazak kroz ovu točku reguliraju prvenstveno izvanstanični signali tj. faktori rasta koji su signali za daljnu proliferaciju. Kada stanica jednom prijeđe R točku, ona će dovršiti taj ciklus bez obzira na daljne okolišne uvjete. Postoje i kontrolne točke koje osiguravaju replikaciju samo potpunih i neoštećenih kromosoma, i zaustavljaju ciklus ako su neki dijelovi DNA ostali nereplicirani te koordiniraju popravak oštećenja (1).

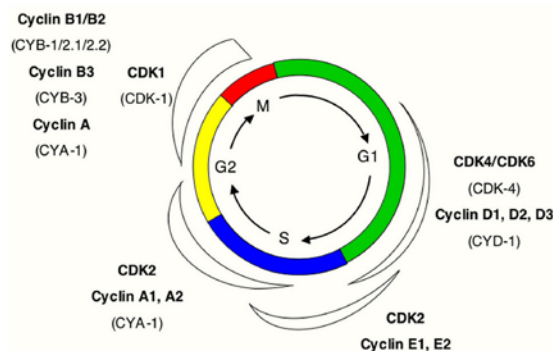
3.1. REGULATORI STANIČNOG CIKLUSA

Do sada je posebna pozornost obraćena na mjesta i redoslijed kontrole, a mehanizmi kontrole su nešto složeniji. Različita istraživanja su omogućila razumijevanje molekularnih mehanizama koji su uključeni u regulaciju staničnog ciklusa. Prolazak kroz kontrolne točke staničnog ciklusa zahtijeva aktivaciju unutarstaničnih enzima poznatih kao protein kinaze ovisne o ciklinu tj. CDK. Ove su molekule vrlo sačuvane kroz evoluciju. Strukturalna i funkcionalna sačuvanost ovih molekula pokazuje kolika je njihova važnost u staničnom ciklusu (2). Prve studije su rađene na oocitama žaba, i dovele su do otkrića faktora promocije sazrijevanja, MPF (maturation promoting factor), koji je uvelike pomogao razumjevanju prijelaza G2/M. Poznavanje ovog mehanizma (slika 1) omogućilo je shvaćanje procesa uključenih u regulaciju drugih kontrolnih točaka. Detaljna istraživanja MPF-a su pokazala da se sastoji od dva proteina, ciklina i i protein kinaze ovisne o ciklinu (CDK) (1).



Slika 1. Molekularni mehanizam regulacije aktivnosti MPF-a. (7)

Ciklini su skupina proteina koja regulira prolazak kroz stanični ciklus u ovisnosti o CDK (5). Samostalni nemaju enzimatsku aktivnost. Koncentracija pojedinih ciklina tijekom ciklusa periodički raste i opada, po čemu su dobili ime (6). U većini slučajeva porast je koncentracije uzrokovan sintezom proteina *de novo*, a pad razgradnjom u proteosomima. Aktivacija specifičnih proteina sljedeće stepenice povratnom spregom regulira njihovu inaktivaciju odnosno razgradnju. Dva su glavna razreda ciklina: ciklini G1/S koji vežu CDK tijekom G1 faze i odgovorni su za kontrolu prijelaza u S fazu, i mitotski ciklini koji se nakupljaju i vežu tijekom G2, a razgrađuju se izlaskom stanica iz mitoze (slika 2) (7).



Slika 2. Shematski prikaz regulatornih kompleksa. Ciklin A je aktivan kroz S, a ciklini D i E u kompleksu s CDK reguliraju G1/S. Ciklin B sudjeluje u regulaciji S/G2 (13).

Kinaze ovisne o ciklinu (CDK) su grupa protein kinaza odgovorna za kontrolu staničnog ciklusa. Postaju aktivne tek kada su u kompleksu sa ciklinima. Induciraju nizvodne procese fosforilacije određenih proteina na serinu i treoninu (7). Budući da je aktivacija CDK ključna za prelazak u sljedeću fazu ciklusa, ona je kontrolirana na nekoliko razina (8). Prvi je stupanj regulacije povezivanje s ciklinima, drugi je fosforilacija treonina na poziciji 160 koju katalizira kinaza-CAK koja aktivira CDK, treći mehanizam je inhibitorna fosforilacija tirozina 15 i treonina 14 katalizirana protein kinazom Wee1. Konačna aktivacija kompleksa CDK/ciklin postiže se defosforilacijom aminokiselina pomoću protein fosfataza iz obitelji Cdc25. Posljednji stupanj kontrole je vezanje specifičnih proteina inhibitora, inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (CKI)(1,9).

Kao što je već naglašeno, ključna točka staničnog ciklusa je prijelaz G1/S, a nju reguliraju izvanstanični signali odnosno faktori rasta zajedno s unutarstaničnim kontrolnim sustavom.

Stimulacija određenim faktorima rasta potiče sintezu ciklina D i ona se nastavlja sve dok su aktivni njihovi signalni putevi (10). Aktivni kompleks ciklina D i CDK 4/6 vodi stanicu kroz restrikciju točku. Važan supstrat kompleksa jest produkt tumor-supresorskog gena *Rb*, protein retinoblastoma (pRB). pRb je glavni negativni regulator staničnog ciklusa (11). Nefosforiliran pRb se veže na transkripcijski faktor E2F i tako koči transkripciju gena. Međutim, kada je pRb fosforiliran pomoću kompleksa CDK4/6/ ciklinD, on oslobađa E2F i omogućuje transkripciju i aktivaciju gena nužnih za S fazu. E2F potiče sintezu ciklina A i E, koji su potrebni za aktivaciju sklopova za prijelaz u S fazu (1, 12).

4. INHIBITORI KINAZA OVISNIH O CIKLINU (CDKI)

Napredak stanice kroz stanični ciklus nije reguliran samo faktorima rasta, već i različitim signalima koji imaju sposobnost inhibiranja daljnje proliferacije. To je veoma bitno u slučaju oštećenja DNA, da bi stanica mogla popraviti štetu. Isto tako međustanični kontakti, ali i različiti drugi izvanstanični faktori ne potiču, nego naprotiv inhibiraju proliferaciju ciljnih stanica. Ovakvi signali djeluju na stanični ciklus najčešće preko indukcije inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu (CDKI) (1).

Dobar primjer za to je indukcija CDK inhibitora p21 pomoću proteina p53 koja dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi zbog oštećenja DNA. Naime, kada dođe do oštećenja DNA, aktiviraju se senzorni proteini koji prepoznaju promjene u kromatinu te aktiviraju protein kinazu ATM koja fosforilira kinazu Chk2, a ona protein p53. p53 se smatra „čuvarom genoma“ koji u nefosforiliranom obliku ima vrlo brz ciklus sinteze i razgradnje. Fosforilacijom protein postaje stabilan i ne degradira se, pa mu se jako brzo povećava količina u stanici. Djeluje kao transkripcijski faktor i potiče sintezu inhibitora p21, koji opet zaustavlja ciklus da bi se omogućio popravak DNA regulacijom aktivnosti CDK/ciklin kompleksa (4,14).

Inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu su također regulatori staničnog ciklusa koji preko blokade aktivnosti CDK kontroliraju prijelaz stanice iz jedne u drugu fazu ciklusa. CDKI se vežu na komplekse ciklina i pripadajućih kinaza. (1).

Postoje dva različita razreda inhibitora. Skupina CIP/KIP proteina može inhibirati različite komplekse ciklin/CDK i njoj pripadaju p21^{CIP}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}. Druga skupina specifično inhibira samo pojedine komplekse ciklina, u principu ciklin D/CDK4,6 i uključuje p16 INK4a, p15 INK4b, p18 INK4c i p19 INK4d. Sinteza, degradacija, kao i aktivnost ovih inhibitora je regulirana kao odgovor na mitogene i antimitogene signale (15,16).

Već je prije rečeno kako određeni faktori rasta potiču proliferaciju, ali postoje i oni koji je inhibiraju. Istraživanja su pokazala da način djelovanja signala na stanicu ponajviše ovisi o prirodi signala, ali i o staničnom mikrookolišu (17). Tako npr. faktor rasta fibroblasta (FGF) inhibira diferencijaciju nekih stanica, a potiče proliferaciju drugih. Faktor rasta TGFβ djeluje stimulatивно na diferencijaciju mezenhimskih stanica, a inhibitorno na proliferaciju epidermalnih stanica. Kasnija istraživanja su pokazala da TGFβ potiče ekspresiju jednog ili više inhibitora CDK koji sprječavaju proliferaciju stanica zaustavljanjem ciklusa (18). TGFβ djeluje putem CDKI, tako da zaustavlja ciklus potičući ekspresiju p15, specifičnog CDKI.

Mutacije na genima koji kodiraju proteine inhibitore CDK su uočene u pojavi karcinoma čovjeka. Gubitak funkcije dovodi do smanjenog kapaciteta te sposobnosti zaustavljanja ciklusa i potiče proliferaciju (19).

4. 1. p21^{CIP1}

p21 je najdulje, a i najbolje poznati inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu. Član je CIP/KIP obitelji inhibitora CDK. Pod kontrolom je tumor supresorskog gena p53, pa zbog toga ima vrlo važnu ulogu u zaustavljanju staničnog ciklusa zbog oštećenja DNA (20). Prekomjerna ekspresija ovog inhibitora vodi ka zaustavljanju ciklusa u G1 i G2 fazi. p21 učinkovito inhibira CDK 2, CDK 4 i CDK 6 (3). U inhibiciji CDK 2 i CDK 4 sudjeluje zajedno s p27 koji ipak pokazuje specijaliziraniju kinaznu aktivnost. Istraživanje koje je provedeno na diploidnim fibroblastima pokazalo je da je velika većina aktivnih CDK 2 vezana za malu količinu p21, dok je za potpunu

inhibiciju kinaze potrebno bilo vezanje više molekula proteina. Dakle, za aktivnost ili neaktivnost kompleksa ciklina i CDK je bitno koliko je vezano p21 proteina (21,30).

Osim što inhibira napredovanje kroz stanični ciklus preko CDK, p21 može i direktno spriječiti replikaciju DNA. Veže se s jezgrinim antigenom proliferirajućih stanica (PCNA) koji je podjedinica DNA-polimeraze δ . Na taj način p21 ima dvojaku ulogu u zaustavljanju ciklusa (21).

Protein p21 je strukturno fleksibilan, pa se njegova konformacija mijenja u ovisnosti s kojom se molekulom ili pak kompleksima veže. Pronađen je kao komponenta u kvartarnom kompleksu zajedno sa ciklinima, CDK, te PCNA, te u binarnom kompleksu sa samim PCNA. Spomenute molekule se vežu na različitim mjestima na p21. PCNA se direktno veže na karboksilni kraj molekule, a interakcija s kompleksom ciklina i odgovarajuće CDK se događa na polovici molekule bliže amino kraju p21. Karboksilni kraj ima dva fosforilacijska mjesta, pa ovisno koja se molekula veže, da li PCNA ili druga, funkcija će biti drugačija. Na ovaj se pričvršćuje i kaspaza (21).

Vezanje proteina p21 na ciklin E/CDK 2 kompleks vodi do akumulacije hipofosforiliranog proteina pRb, koji se tada može vezati na transkripcijski factor E2F i dovesti do zaustavljanja u fazi G1. p21 inhibira i kompleks ciklinD/CDK 4 čija je aktivnost nužna za prijelaz preko restriksijske točke. Ovaj protein inhibira i prolazak kroz druge faze ciklusa, npr. inhibira ciklin A/CDK 2 kompleks potreban za prolaz kroz S fazu (22).

Regulacija napretka kroz G1 prema S je pod nekoliko razina kontrole, koju obavlja p21. On ima negativne i pozitivne učinke na progresiju. S jedne strane, mala količina je potrebna za aktivnost kompleksa ciklin/CDK. Visoka razina dovodi do blokade i zaustavljanja CDK aktivnosti. Inhibitorni učinci su dominantni jer uslijed pojačane ekspresije p21 dolazi do inhibicije kompleksa ciklina, naročito kompleksa ciklin E/CDK 2. Osim toga, p21 može reagirati transkripcijskim faktorom E2F te blokirati transkripciju s promotora ciklina A. Tako p21 ima i direktan utjecaj na transkripciju gena potrebnih za S fazu. p21 također ima utjecaj na blokadu u S fazi budući da ima sposobnost vezanja PCNA. Inhibitorna se aktivnost očituje i u interakciji PCNA i DNA-metiltransferaze tako da bi p21 mogao regulirati afinitet DNA-metiltransferaze prema mjestima novo sintetiziranih DNA.

Kao što je i prije spomenuto, p21 je vrlo važan u zaustavljanju staničnog ciklusa u G1 i S, ako je došlo do oštećenja. U tom slučaju može inhibirati aktivnost CDK, pa i replikacijsku aktivnost PCNA.

Važna uloga p21 u napredovanju kroz stanični ciklus zahtijeva preciznu regulaciju ekspresije. Na transkripcijskoj razini p21 je reguliran proteinom p53. S druge strane, faktori rasta, citokini, TGF- β , glukokortikoidi i retinoidi pozitivno reguliraju razinu p21 neovisno o p53. Ekspresija p21 može biti inhibirana na razini mRNA prekomjernom ekspresijom onkogenog *c-myc* (31). Razina p21 je regulirana i post-transkripcijski. Stabilnost p21 proteina se može mijenjati fosforilacijom, a proteinski kompleksi p21-CDK i p21-PCNA se regulirano degradiraju u proteosomu. (23).

Već je prije naglašeno kako je p21 značajan zbog svojih inhibitornih funkcija koje zaustavljaju stanični ciklus, no vrlo malo se zna o njegovim funkcijama koje djeluju pozitivno na proliferaciju stanice. p21 ima sposobnost vezanja i translokacije ciklina D i CDK 4,6 unutar jezgre, te djeluje na njihovo zadržavanje u jezgri. Posljedica toga je povećanje fosforilacije pRb zbog veće razine kompleksa ciklin D/CDK4 i 6.

p21 ima ulogu u odgovoru na apoptotske stimulanse, budući da je njegova ekspresija potaknuta kao odgovor na oštećenje DNA. Supstrat je kaspazi 3 u terminalnoj točki apoptoze.

Protein p21 može formirati komplekse s inaktivnim prokaspazama-3. Fosforilacija p21 putem protein kinaze A potiče formiranje tog kompleksa koji bi djelovao antiapoptotski. Ako je, međutim, smanjena proizvodnja ATP-a kod nefunkcionalnih mitohondrija, inhibira se fosforilacija p21 i njegovo vezanje na prokaspazu 3. Prokaspaza se tada može aktivirati, a nastala kaspaza cijepa p21. Tako se omogućuje aktivacija kaspaza i kaskada apoptotskih reakcija, a sprječava daljnja inhibicija ciklusa (23).

4. 1. 1. ULOGA p21 U STARENJU

Nakon određenog broja diobe u kulturi stanice sisavaca dosegnu tzv. Hayflick-ov limit, odnosno stanje trajnog zaustavljanja rasta nazvanog replikativna starost. Tijekom starenja, između ostalog, dolazi do akumulacije oštećenih molekula kao što su DNA, proteini, lipidi... Skraćivanje telomera odnosno gubitak telomernih ponavljanja je posljedica nemogućnosti DNA polimeraze da replicira krajeve kromosoma i obrade telomera u fazu S. Kada telomere dosegnu kritičnu dužinu i više ne mogu štititi krajeve kromosoma, aktiviraju se signalni putevi koji dovode do replikativne starosti. U stanica sisavaca, replikativno starenje je povezano s dva signalna puta: p53/p21 i p16/pRb.

p21 djeluje na signalnom putu proteina p53 i inducira zaustavljanje staničnog ciklusa zbog zračenja, ili oštećenja DNA uzrokovanog skraćenim telomerama. Kulture humanih stanica pokazuju povišenu ekspresiju p21 u starim stanicama. Pojačana aktivnost prvi je korak tijekom indukcije replikativne starosti. Drugi markeri starosti mogu biti aktivirani nakon početka zaustavljanja staničnog ciklusa (31). Poremećena ekspresija p21 može izazvati zaustavljanje ciklusa slično starenju u mladim humanim diploidnim fibroblastima (HDF). Ulogu p21 u starenju još više pojašnjava studija koja pokazuje da stanice kojima nedostaje ovaj gen odgađaju starenje.

Ekspresija p21 je potaknuta tijekom ireverzibilnog procesa zaustavljanja rasta stanica i čini se kao važan regulator procesa starenja u humanim fibroblastima (24). Prekomjerna ekspresija je povezana i s ekspresijom niza gena povezanih s bolestima vezanih za starost (25).

4. 1. 2. p21 I TERMINALNA DIFERENCIJACIJA KERATINOCITA

Ekspresija CDK inhibitora p21 povezana je s diferencijacijom nekih tipova stanica npr. diferencijacijom epitelnih stanica kože. Terminalna diferencijacija u mnogoslojnom pločastom epitelu je složen proces koji uključuje ireverzibilno zaustavljanje rasta i uzastopne promjene u genskoj ekspresiji koje prate migraciju stanica iz bazalnih djelova prema površini. Čvrsto koordinirani program genske ekspresije u normalnoj koži može biti oponašan *in vitro*.

Manipulacijom koncentracije kalcija u mediju mogu se npr. mišje stanice u kulturi usmjeravati prema diferencijaciji ili održavati u proliferativnom stanju. Keratinociti u uvjetima niske koncentracije kalcija imaju kuboidan izgled i proliferiraju, a kad se ekstracelularna koncentracija kalcija poveća od 0.05 do 0.1 mM stanice prestaju proliferirati i unutar 4-8 sati počinju diferencirati, proizvoditi specifične citokeratine i promijene oblik. To je popraćeno promjenama u ekspresiji diferencijacijskih markerskih gena, uključujući i povećanje razine p21. S druge strane, odvajanje keratinocita od bazalne membrane, odnosno specifičnog matriksa u kulturi, također je diferencijacijski signal. Keratinociti mogu biti potaknuti na diferencijaciju u staničnoj kulturi izlaganjem i raznim drugim faktorima, kao što su npr. forbolski esteri i interferon γ . Svi oni također induciraju p21 i ireverzibilno se zaustavlja stanični rast.

Kinetika CDKI može biti različita kod diferencijacije inducirane kalcijem i ostalim faktorima, ali kod normalnih keratinocita *in vitro* diferencijacija je povezana uzastopnom indukcijom p21, p27 i p16. Indukcija p21 je kratkotrajna, doseže maksimum 4-12 sati nakon što je diferencijacija potaknuta i onda se vraća u osnovno stanje. Indukcija p27 i p16 je odgođena, ali progresivna što pokazuje da ovi CDKI mogu biti odgovorni za zadržavanje terminalno diferenciranih stanica u postmitotičkom stanju. Primijećeno je dramatično smanjenje ekspresije diferencijacijskih markera: kreatina1, lorikrina, i involukrina, ali ne i filigrina u keratinocita kojima nedostaje p21. Faktori rasta prisutni u mediju i i signalni putevi koje induciraju, npr. epidermani faktor rasta (EGF), u ovisnosti o koncentraciji kalcija, također utječu na diferencijacijski program keratinocita i indukciju p21.

Kako p21 ima dvojaku ulogu u prolasku stanica kroz kontrolnu točku u G1, i pretjerana ekspresija i nedostatak ekspresije p21 proteina može zaustaviti stanice u R točki. Ta je pojava pokazana kod stanica koje prekomjerno ekspimiraju p21 i onih kojima nedostaje. p21 je uključen i u proces zaustavljanja rasta signalnim putevima NF-kB i Notch1. Ektopična ekspresija NF-kB podjedinice u bazalnom dijelu mišje epiderme zaustavlja ciklus putem p21. Prekomjerna ekspresija transkripcijskog faktora NF-kB nije utjecala na p27, p57 ili p16 pokazujući da je upravo CDK inhibitor p21 bio odgovoran za zaustavljanje rasta (23).

Budući da ovaj protein ima mnogostruke funkcije, njegova se stabilnost, kao i pojedine funkcije mijenjaju ovisno na kojem se mjestu u stanici nalazi, vezivanju na pojedine proteine, te

o stanju fosforilacije. Fosforilacija proteina je ključni regulatorni mehanizam koji omogućava različite procese promjenom svojstava npr. stabilnosti, afiniteta vezivanja drugih molekula i katalitičke aktivnosti. Upravo fosforilacija p21 na treoninu 145 putem serinske treoninske kinaze može dovesti do promjene svojstava i objasniti neke kontraditorne funkcije ovog proteina (27).

4. 2. p27^{KIP1}

p27 je inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu i kodira protein koji pripada obitelji inhibitora CIP/KIP. Kao i drugi inhibitori CDK, blokira aktivnost kompleksa ciklina i njihovih partnerskih kinaza. Uglavnom je uključen u inhibiciju kompleksa ciklinE/CDK 2 i ciklinD/CDK4, što ga čini još jednim od regulatora progresije kroz G1 fazu staničnog ciklusa.

p27 je strukturno sličan proteinu koji je do sada bio spominjan, p21. Iz te strukturne sličnosti proizlazi i funkcionalna. p27 pokazuje homologiju s p21 na amino-terminalnom kraju.

Ova dva proteina, p21 i p27, dijele slične sposobnosti inhibicije CDK 2 i CDK 4, ali p27 pokazuje nešto drugačije kinazne specijalnosti. Kao i p21, djeluje na kontrolu kinaze CAK, i ima mogućnost kontrole vezanja ciklin/CDK kompleksa u određenom stehiometrijskom omjeru (19,23). Ima ulogu u karcinogenezi.

Glavne razlike koje razlikuju p27 od p21 jesu nedostatak ovisnosti o p53, tj. njegov promotor nije pod kontrolom ovog tumor supresorskog proteina. Protein p27 nema sposobnost vezanja PCNA, niti direktne inhibicije replikacije DNA. Tako vjerojatno regulira dio ciklusa na kojemu se ne nalaze prijelazne točke. Razlikuje se i u regulaciji mitogenim signalima: dok oni induciraju protein p21, u prisustvu tih signala razina p27 se smanjuje (23).

p27 kao regulator staničnog ciklusa bitan je kod inhibicije proliferacije kontaktnom inhibicijom. Isto tako, inhibitor je ciklusa na signalnom putu transformirajućeg faktora rasta (TGF- β). Djelovanjem na komplekse ciklin/CDK sprječava daljnju proliferaciju i zaustavlja ciklus u fazi G1 (16).

4. 3. p57^{KIP2}

p57 je posljednji po redu inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu iz obitelji CIP/KIP. To je snažni inhibitor koji veže nekoliko CDK koje su odgovorne za prolazak kroz G1 fazu, a time je i negativni regulator stanične proliferacije.

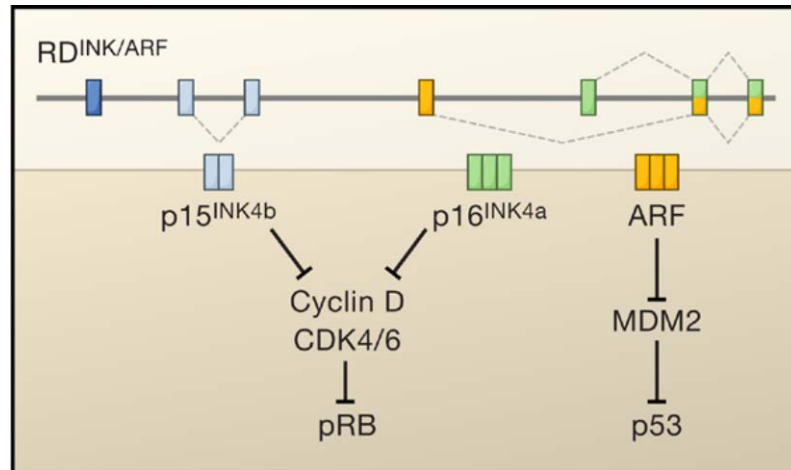
Kao i ostali članovi ove obitelji, p57 sadrži visoko konzerviranu amino-terminalnu domenu koja stupa u interakciju s CDK. Mutacija ovog gena može kao posljedicu imati gubitak kontrole staničnog ciklusa i nekontroliranu proliferaciju. Te mutacije su se pojavile u nekim tumorima, pa bi se p57 mogao smatrati jednim od tumor supresorskih gena (28).

Ekspresija proteina p57 u keratinocitima regulirana je posebnim mehanizmom tijekom diferencijacije inducivne kalcijem (23).

4. 4. INK4 obitelj

Obitelj INK4 inhibitora CDK je sastavljena od p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}. Oni su homologni inhibitori CDK4 i CDK6 koje potiču prolaz kroz fazu G1 ciklusa. p15 i p16 su slični 85% na aminokiselinskoj razini (29). Predpostavlja se da je *INK4a* nastao duplikacijom gena *INK4b*.

Vežanje INK4 proteina na CDK4 i CDK6 potiče alosteričku promjenu koja prekida vežanje ovih kinaza za ciklin D, blokirajući tako fosforilaciju retinoblastoma pRb. Dakle, ekspresija p15 i p16 ostavlja pRb protein u hipofosforiliranom stanju i omogućuje vežanje faktora E2F te zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi (slika3)(29).

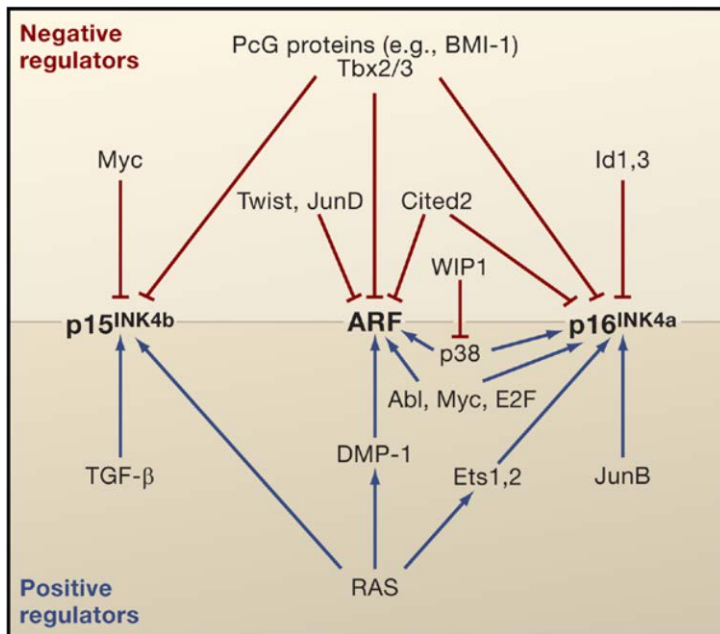


Slika 3. Lokus INK4a/ARF/INK4b. p15, 16 se vežu i inhibiraju CDK 4/6, dok ARF inhibira MDM2 protein što rezultira stabilizacijom p53 proteina. (29)

INK4a/ARF/INK4b je lokus koji kodira neke od inhibitora INK. Nalazi se na kromosomu 9p21 i složene je građe. Alternativnim prekrajanjem mogu nastati tri proteina, CDKI p15 i p16 te ARF koji ne djeluje na CDK već se nalazi na putu p53. p15 ima svoj zasebni okvir čitanja, koji je fizički odvojen i razlikuje se od p16 i ARF. p16 i ARF imaju različite prve eksone, a zajednički drugi i treći ekson. Međutim, proteini su kodirani u drugačijim okvirima čitanja, tako da uopće nemaju homologiju na razini proteina (29). Lokus INK4a/ARF/INK4b ima dvije iznimno važne uloge: djeluje kao induktor stanične starosti, te ima bitnu ulogu u sprječavanju nastanka karcinoma (33).

Sukladno važnosti ovog lokusa, njegova je aktivnost stogo regulirana. Poznato je da neki stimulansi selektivno reguliraju INK4a, ali ne i ARF, ili obrnuto. Istraživanjima na stanicama glodavaca pokazala su da su ovi geni koregulirani, dok koregulacija nije uočena u ljudskim stanicama. Kod starenja ljudskih stanica uočeno je samo povećanje ekspresije INK4a. Poznato je nekoliko pozitivnih i negativnih regulatora odnosno signalnih puteva koji utječu na ekspresiju INK4a/ARF/INK4b lokusa (slika 4). Onkoprotein Ras jedan je od pozitivnih regulatora na signalnom putu faktora rasta. Aktivacija Ras djeluje na kaskadu Raf-MEK-ERK kinaza koja utječe na ekspresiju INK4a fosforilacijom ključnih transkripcijskih faktora. Identificirano je i nekoliko represora tj. negativnih regulatora lokusa INK4, npr. T-box i proteini kompleksi polikombne grupe proteina (PcG) (29). Ektopična ekspresija kompleksa CBX-8, koji je jedan od

kompleksa PcG, inhibira INK4a/ARF, usmjerava stanicu prema imortalizaciji i odgađa starenje (34).



Slika 4. Regulacija lokusa *INK4a/ARF/INK4b*. Pozitivni i negativni regulatori ekspresije p15INK4b, ARF, and p16INK4a. Neki proteini specifično djeluju na ekspresiju jednog lokusa, dok drugi djeluju na sve gene lokusa. Negativni regulatori su prikazani u gornjem dijelu slike, a pozitivni u donjem. (29).

4. 4. 1. INK4a I STARENJE

Stanice nakon određenog broja djeljenja dostižu, kao što je već spomenuto, Hayflickov limit. Tri su glavna svojstva starih stanica: telomerno skraćenje, akumulacija DNA oštećenja te pojačana transkripcija INK4a/ARF lokusa. Ekspresija ovog lokusa je smanjena kod većine tkiva u mladih organizama, te se progresivno povećava daljnom proliferacijom stanica. Istraživanja na ljudskim tkivima su pokazala povećanje razine ovisno o starenju u tkivima bubrega i kože. Tako je otkriven INK4a kao izvrstan molekularni marker starenja. Molekularni mehanizam nije do

kraja razjašnjen. Ipak su poznati načini regulacije nekih proteina, pa se tako razina transkripcijskog faktora Ets1, koji je pozitivan regulator INK4a, povećava tijekom starenja mišjih stanica. Slično se razina Bmi1, odnosno člana PcG kompleksa, koji je moćan represor INK4a, smanjuje tijekom starenja.

Drugi važan mehanizam koji povezuje razinu INK4a sa starenjem je oksidativno oštećenje i p38/MAPK signalni put. Na hematopoietskim stanicama je uočeno da oksidativno oštećenje aktivira ekspresiju INK4a/ARF lokusa preko p38/MAPK, što na koncu dovodi do ograničene funkcionalnosti ovih stanica. Budući da se oksidativna oštećenja nakupljaju tijekom godina, mogli bi pridonijeti pozitivnoj regulaciji lokusa (33).

4. 4. 2. ULOGA INK4a U TUMORIGENEZI

U širokom spektru tumora (npr. melanomu, karcinomu pluća, nekim oblicima leukemija) lokus INK4a/ARF je deletiran ili metiliran, tj. utišan, tako da ne dolazi do proizvodnje proteina p16 i ARF (3). Neobična genetička struktura INK4a/ARF/INK4b lokusa je slabost u anti-tumorskoj obrani, jer okuplja tri važna gena regulatora pRb i p53 tumor supresora u istoj točki, čineći ih osjetljivim i na najmanju deleciju. U ranom je stadiju tumorigeneze nađeno povećanje INK4a/ARF ekspresije, tako da se smatra da do ubrzanog rasta tumora dolazi kad stanice postanu sposobne zaobići intrinzične obrambene mehanizme. Središnju ulogu u obrani imaju pRb, p53, INK4a i INK4b (29).

Homozigotne delecije promatrane na kromosomu 9p21 često pogađaju sva tri gena ovog lokusa, a manji dio specifično pogađa samo INK4a. Velika većina točkastih mutacija i intragenskih promjena u lokusu koje se pojavljuju u slučajnim ili nasljednim karcinomima, pogađa INK4a, a ne INK4b ili ARFa (32).

Specifični somatski gubitak INK4a, kroz točkastu mutaciju ili manju deleciju, uočen je kod velikog broja karcinoma. INK4a je jedan od prvih gena kod kojeg je nađeno utišanje metilacijom promotora odnosno epigenetskim promjenama. Jedan od najvažnijih tumor supresora ljudskih karcinoma (29). Djelovanje INK4a na zajedničkom INK4a/pRb tumor supresorskom putu daje

mu toliku važnost. Poremećaj funkcije pRb, INK4a ili prekomjerne ekspresije ciklina D i CDK često dovodi do pojave malignosti. Njegovu ulogu još više podupiru podaci o identifikaciji specifičnih tipova mutacija INK4a koje su povezane s pojavom nasljednog melanoma i adenokarcinoma gušterače. Nasljedni atipični višestruki melanom (FAMMM) je nasljedna autosomalna bolest koju karakterizira pojava malignih melanoma kože i višestrukih atipičnih lezija. Kod nasljednih melanoma, u više od 50% slučajeva je otkriven poremećaj na lokusu 9p21, a u 70% ljudi s mutacijim lokusa INK4a razvio se neki oblik melanoma (35).

Mutacije INK4a su značajne i za proliferaciju ljudskih keranocita. Istraživanja bazirana na usporedbi normalnih keratinocita i njihovih malignih kopija, pokazala su da je nužan gubitak INK4a da bi se zaobišlo stanje starosti i stanice postale besmrtno (35).

Nedavne studije su pokazale novu antikancerogenu funkciju INK4a. Istraživanjem kulture primarnih ljudskih epitelnih stanica (HMEC) znanstvenici su otkrili da inaktivacija INK4a rezultira duplikacijom centrosoma i vodi prema genomskoj nestabilnosti. Prekid aktivnosti INK4a u stanicama HMEC tretiranim hidroksiureom (HU) tj. reverzibilnim inhibitorom staničnog ciklusa u fazi S rezultira prekobrojnim centromerama i genomskim abnormalnostima u metafazi. Ponovna ekspresija INK4a u HMEC tretiranim HU popravlja stanice s prekobrojnim centrosomima. Ova studija pokazuje dodatni mehanizam djelovanja INK4a u inhibiciji kancerogeneze u proliferirajućim i nescenescentnim stanicama.(29).

U rijetkim slučajevima karcinoma pokazano je specifično utišavanje INK4b kao posljedice hipermetilacije. Zbog preklapanja biokemijskih funkcija, delecija obaju gena, i INK4a i INK4b, djeluje onkogeno više nego što bi djelovao gubitak svakog gena zasebno. INK4b je također važan tumor supresor, pogotovo u hematopoietskom sustavu (29).

5. ZAKLJUČAK

Za pravilno funkcioniranje staničnog ciklusa potrebno je strogo usklađeno djelovanje mnoštva signalnih puteva, koji omogućuju prolaz kroz ciklus, i s druge strane, kontrolne točke koje omogućuju zaustavljanje ciklusa u slučaju poremećaja pravilnog odvijanja procesa duplikacije genetskog materijala i njegove raspodjele na stanice kćeri. Cilj je kontrolnih točaka onemogućiti da oštećeni genetski materijal uđe u diobeni proces i osigurati popravak da se ne oštećenje ne bi prenijelo na stanice kćeri. Posebnu ulogu u kontroli ciklusa imaju specifični proteini, inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu koji preko kočenja aktivnosti CDK zaustavljaju ciklus i odvođe oštećenu stanicu u stanje mirovanja da bi omogućili procese reparacije oštećenja.

Koliko važnu ulogu imaju CDKI u regulaciji proliferacije pokazalo se tek gubitkom njihove funkcije zbog pojave različitih oštećenja, mutacija ili epigenetskih promjena. Gubitak funkcije rezultira nemogućnošću zaustavljanja staničnog ciklusa, popravka oštećenja te poticanjem nekontrolirane proliferacije. Sve to dovodi do pojave mnogih, često veoma teških bolesti.

CDKI se dijele u dvije skupine. Jedni imaju sposobnost inhibicije raznih kompleksa ciklina i njihovih kinaza, kao npr. p21, p27 i p57, dok su drugi specifični za ciklin D i cdk 4/6, kao npr p15, p16, p18 i p19. Najkarakterističnija sposobnost inhibitora CDK upravo je zaustavljanje staničnog ciklusa, kao posljedice aktivacije specifičnih signalnih puteva. Pojedini CDKI imaju i neke specifične uloge. p27 zaustavlja rast stanica kao odgovor na međustanični kontakt (kontaktna inhibicija). Neki CDKI imaju ulogu u starenju. Razina p21 i p16 raste kod starih stanica i njihova ekspresija omogućava ulazak stanice u ireverzibilno stanje mirovanja iz kojeg se ne mogu ponovno vratiti u ciklus.

Inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu važan su obrambeni čimbenik stanica u borbi protiv oštećenja izazvanog bilo raznim agensima, kemijskim i fizičkim, bilo spontano nastalih u stanici, kao i mehanizam zaštite od prokarcinogenih posljedica oštećenih kratkih telomera.

6. LITERATURA

1. Cooper GM.: The Cell, a molecular approach. 2. izd. ASM Press, Washington DC, 2000
2. Hartwell W: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246, 629-634, 1989.
3. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB: Cell proliferation, differentiation, and apoptosis. U Cancer Medicine, Holland JF, Frei E (ur.) 17–32, Hamilton: BC Decker Inc, 2000.
4. Elledge SJ: Cell Cycle Checpoints: Preventing an Identity Crisis. Science 274 (5293): 1664-1672, 1996.
5. Galderisi U, Jori FP, Giordano A: Cell cycle regulation and neural differentiation. Oncogene 22 (33): 5208–19, 2003.
6. Bai C, Richman R, Elledge SJ: Human cyclin F. Embo J. 13 (24): 6087–98, 1994.
7. Alberts B,Johnson A, Lewis G, Raff M, Roberts K, Walter P : Molecular Biology of the Cell. 4. izd. Garland science, 2002.
8. Morgan DO: Cyclin-dependent kinases:engines, clocks, and microprocessors. Ann Rev Cell Dev Biol 13: 261-291, 1997.
9. Eich A. Nigg: Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eucariotic cell cycle. BioEssays 17 (6): 471-480, 1995.
10. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherrn CJ: Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phaseof the cell cycle. Cell 65: 701-713, 1991.
11. Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH: The retinoblastoma gene product regulates progression throught the G1 phase of the cell cycle. Cell 67: 293-302, 1991.
12. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB: Cell proliferation, differentiation, and apoptosis. U Cancer Medicine, Holland JF, Frei E (ur.) 17–32, Hamilton: BC Decker Inc, 2000.
13. van den Heuvel S: Cell-cycle regulation. WormBook, izd. The *C. elegans* Research Community , WormBook,doi/10.1895/wormbook.1.28.1, <http://www.wormbook.org>. 2005.
14. Sherr CJ: Cancer Cell Cycles. Science 274: 1672-1677, 1996.

15. Poylak K, Lee M, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Masague J: Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and apotencial mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66, 1994.
16. Poylak K, Kato JY, Solomon, Sherr MJ, Koff A, Roberts JM, Masague J: p27Kip1 a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Gene Dev* 8: 9-22, 1994.
17. Varticovski L, Druker B, Morrison D, Cantely L, Roberts T: The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature* 342:699-702, 1989.
18. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA: TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 63:245-247, 1990.
19. Kamb A: Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *CurrTopicsMicrobiolImmunol* 227: 139-148, 1998.
20. Maddika S, Ande S, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda K, Wiechec E, Los M: Cell survival, cell death and cell pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Update* 10: 13-29, 2007.
21. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, Fox MP, II: Inhibition of Cyclin-dependent Kinases by p21. *Mol. Biol. Cell.* 6 (4): 387-400, 1995.
22. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM: Prognostic implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis, biomarkers in non-small cell lung cancer: A review. *Clin Cancer Res* 11: 3974, 2005.
23. Wendy WC, Denning MF: p21^{WAF1} control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(6):453-464, 2002.
24. Brown JP, Wei W., and Sedivy JM: Bypass of senescence after disruption of *p21CIP1/WAF1* gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277: 831–834, 1997
25. Chang BD., Watanab K, Broude EV, Fang J, Poole J, C.,Kalinichenko TV, and Roninson IB: Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 oncellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence,and age-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4291–4296, 2000.

26. Andrei L, Gartel AL, Tyner AL: The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 1, 639–649, 2002.
27. Child ES, Mann DJ: The intricacies of p21 phosphorylation, protein-protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 5: 1313-1319, 2006.
28. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ: p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9 (6): 650–62, 1995.
29. Kim WY, Sharpless NE: The Regulation of INK/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 126, 2006.
30. Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and regulators of G1-phase progression *Genes Dev.* 13: 1501-1512, 1999.
31. Zhenyu JU, Chondhury AR, Lenard Rudolph K: A Dual Role of p21 in stem cell aging. *Annals of NY Academy of Science* 1100: 330-344, 2007.
32. Gil J, Peters G: Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus : all for one or one for all. *Mol. Cell Biol.* 7: 667-677, 2006.
33. Collado M, Blasco MA, Serrano M: Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130: 223-234, 2007.
34. Dietrich N, Bracken AP, Trinh E, Schjerling CK, KosekiH, Rappsilber J, Helin K, Hansen KH: Bypass of scenescence by the Polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4a-ARF locus. *EMBO J.* 26, 1637–1648, 2007.
35. Rocco JW, Sidransky D:n p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 264, 42–55 , 2001.

7. SAŽETAK

Stanični ciklus je jedan od najvažnijih procesa koji se događa u stanicama. Omogućuje prenošenje identičnog genetičkog materijala iz generacije u generaciju i osigurava da isti ostane kompletno očuvan. Ciklus je višestruko reguliran različitim signalima i odgovarajućim signalnim putevima. U slučaju nedostatka ili poremećaja regulacije staničnog ciklusa može doći do nekontrolirane proliferacije, oštećenja genoma i na koncu pojave tumora.

U ovom radu predstavljene su osnove staničnog ciklusa, kao i mehanizmi koji ga reguliraju. Poseban je osvrt na inhibiciju stanične proliferacije uz pomoć specifičnih proteina inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu. Prikazana je struktura, funkcija, mehanička uloga svakog od inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu i njegov efektorni put.

Gubitak funkcije CDKI zbog pojave različitih oštećenja, mutacija ili epigenetskih promjena ima katastrofalne posljedice na stanicu, pa i čitav organizam. Inhibitori CDK imaju ulogu i u procesu starenja. p21 i p16 imaju sposobnost ireverzibilnog zaustavljanja ciklusa kod starih stanica.

Inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu važan su obrambeni čimbenik stanica u borbi protiv oštećenja izazvanog bilo raznim agensima, kemijskim i fizičkim, bilo spontano nastalih u stanici, kao i mehanizam zaštite od prokarcinogenih posljedica oštećenih i skraćenih telomera.

8. SUMMARY

The cell cycle is one of the most important processes in the cell. It enables the transfer of identical genetic material between generations and assures its complete preservation. The cycle is regulated by multiple signals and corresponding signaling pathways. Defect or lack of the cell cycle regulators could lead to uncontrolled proliferation and genome damage, resulting in carcinogenic processes.

In this paper the basics of the cell cycle is presented, as well as the mechanisms that regulates it. The main topic is the cell proliferation inhibition and specific protein cyclin dependent kinase inhibitors. It shows structure, function and mechanical role of each of the cyclin dependent kinases inhibitors, as well as their effectors pathway.

DNA damage, mutation or epigenetic alteration could lead to loss of CDKI functions and could have catastrophic consequences on the cell and the entire organism. CDK inhibitors are also involved in a number of other cell mechanisms. p21 and p16 are the main factors of the irreversible cell cycle arrest in senescence.

CDKI are an important cell defense response in the fight against damage caused by various chemical and physical agents, or spontaneous arisen in the cell, as well as a defense mechanism against procarcinogenic effects of shortened and damaged telomeres.