

Received: 2010.01.14
Accepted: 2010.02.15
Published: 2010.02.24

Struktura i regulacja białka p73 w komórce – implikacja w terapii przeciwnowotworowej*

The structure and cellular regulation of p73: Their implication in anticancer therapy

Joanna Zawacka-Pankau**, Katarzyna Maleńczyk**, Alicja Sznarkowska

Katedra Biotechnologii, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii,
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Białko p73 z białkiem p63 należy do rodziny białek p53. Jest stosunkowo mało poznany, strukturalnym i funkcjonalnym homologiem dokładnie opisanego supresoru nowotworu - p53, powszechnie uznawanego za strażnika genomu. Białko p73, podobnie jak i p53, ulega aktywacji na skutek uszkodzeń DNA indukowanych m.in. przez chemioterapeutyki i wiąże się do grupy tych samych sekwencji promotorowych, co białko p53. Oba białka biorą udział w szlakach transdukcji sygnału, prowadzących do aktywacji apoptozy bądź zatrzymania cyklu komórkowego. Nad terapiami przeciwnowotworowymi ukierunkowanymi na aktywację białka p53 pracuje się intensywnie od prawie 10 lat. Okazuje się jednak, że podobna strategia może być wykorzystana względem białka p73. W przeciwieństwie do genu *TP53*, gen białka p73 jest bardzo rzadko zmutowany w nowotworach, choć samo białko jest często nieaktywne. Może to być wykorzystane do poszukiwania molekuł, które selektywnie aktywowałyby białko p73 w komórkach nowotworowych, a w konsekwencji indukowały ich śmierć. Celem pracy jest szczegółowy opis struktury, funkcji i regulacji komórkowej białka p73 oraz ukazanie potencjału terapeutycznego, a także możliwości stworzenia terapii celowanej w ten niedoceniony dotąd homolog białka p53.

Słowa kluczowe:

białko supresoru nowotworu p73 • apoptoza • terapia przeciwnowotworowa • związki niskocząsteczkowe

Summary

p73 protein belongs, together with p63, to the p53 family. It is a relatively poorly studied structural and functional homolog of the well-described tumor suppressor protein p53, also known as the guardian of the genome. p73 protein, like p53, becomes activated by, for example, DNA damaging agents and it targets the same promoter sequences as p53. Both proteins participate in pathways of signal transduction whose activation leads to apoptosis induction or cell-cycle arrest. Studies concerning anticancer treatment focusing on the activation of p53 have been carried out extensively for about 10 years. It appears that a similar therapeutic strategy can be successfully applied in p73 activation as well. Unlike the *TP53* gene, the gene encoding p73 protein is rarely mutated in tumors although the protein is found to be inactive. This can become very useful when designing molecules which will selectively activate p73 and consequently induce

* Praca finansowana z grantu na badania własne Uniwersytetu Gdańskiego BW B051-5-0298-9 (J. Z-P) oraz z grantu na badania własne Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr rej. N N405 612638 (J. Z-P).

** Podani autorzy mieli równy udział w powstałej pracy przeglądowej.

cancer-cell death. The aim of the present study was to describe in detail the structure, function, as well as cellular regulation of p73 in light of its therapeutic potential.

Key words: tumor suppressor protein p73 • apoptosis • anticancer therapy • low-molecular-weight molecules

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=905554>

Word count: 4597

Tables: –

Figures: 3

References: 58

Adres autorki: dr Joanna Zawacka-Pankau, Katedra Biotechnologii, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: jzawacka@biotech.ug.gda.pl

Wykaz skrótów: **DBD** – domena wiążąca DNA; **mtp53** – zmutowane białko p53; **p53RE** – sekwencje promotorowe rozpoznawane przez białko p53 (p53 responsive elements); **PKCδ** – białkowa kinaza Cδ (protein kinase Cδ); **PRR** – rejon bogaty w reszty proliny (proline rich region); **SAM** – spiralny motyw alfa (sterile alpha motif); **TA** – domena transaktywacyjna (transactivation domain); **wtp53** – typ dziki białka p53 (wild-type p53); **YAP** – białko powiązane z białkiem Yes (Yes-associated protein).

WPROWADZENIE

Białko p73 zostało odkryte w 1997 r., kiedy to Kaghad i wsp. [21] podczas poszukiwania nowych interleukin przypadkowo trafili na sekwencję kodującą białko podobne do białka p53. Sekwencja ta umiejscowiona w genomie ludzkim na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p36.2-3), często ulegająca delecji w przypadkach nerwiaka płodowego i innych nowotworów, nazwana genem *TP73* (tumor suppressor protein 73).

Ze względu na homologię strukturalną z białkiem p53, a także newralgiczne położenie samego genu, białko p73 początkowo przypisywano rolę klasycznego białka supresora nowotworu działającego wg schematu Knudsona. Oznaczałoby to, iż do utraty właściwości supresorowych, konieczna jest mutacja lub delecja obu alleli. Liczne badania wykazały jednak, iż w przeciwieństwie do genu *TP53*, zmutowanego w ponad 50% przypadków wszystkich nowotworów ludzkich, gen *TP73* leży w rejonie stosunkowo rzadko ulegającym mutacjom. Zaobserwowano je zaledwie w 0,5% przypadków nowotworów u ludzi [42]. Ponadto wstępne analizy genetyczne u myszy pozbawionych genu *TP73* nie wykazały spontanicznego rozwoju nowotworów, jak to się dzieje w przypadku myszy typu *TP53^{-/-}*. Obserwowano natomiast u tych zwierząt ciężkie wady rozwojowe, takie jak wodogłowie, dysgenezyje struktur hipokampa oraz zaburzenia związane z rozpoznawaniem feromonów. Wyniki te sugerowały zatem, że białko p73 *in vivo* może brać udział raczej w regulacji procesów rozwojowych (zwłaszcza rozwoju układu nerwowego), niż supresji nowotworów [55].

Inne doniesienia literaturowe wskazały, iż onkoproteiny wirusowe, takie jak antygen T wirusa SV40, adenowirusowe E1B 55K lub E6 wirusa HPV nie wiążą się do białka p73, mimo iż przyłączają się do białka p53, a miejsca

odpowiedzialne za te interakcje należą do najbardziej konserwowanych regionów między tymi białkami. Wydaje się więc, że p73 raczej promuje niż hamuje rozwój onkogennych wirusów, a w fizjologicznym stężeniu odpowiada za proliferację komórek [31]. Jak niedawno dowiedziano, białko p73 oddziałując z protoonkogennym c-Jun zwiększa aktywność czynnika transkrypcyjnego AP-1 (activator protein 1) i wpływa tym samym na przeżycie i wzrost komórek [52].

Podczas analizy poziomu ekspresji genu *TP73* wykazano, iż w większości zdrowych tkanek poziom zarówno transkryptów, jak i samego białka jest bardzo niski. Natomiast w przypadku tkanek nowotworowych, takich jak rak płuca, prostaty, pęcherza moczowego, piersi, jajnika czy przełyku, poziom p73 był znacznie podwyższony. Wysoki poziom tego białka u pacjentów z nowotworami wiązał się także ze złym rokowaniem klinicznym. Mogłoby to sugerować onkogeny charakter białka p73 [47,49]. Jednocześnie wykazano, że p73 ze względu na strukturalne podobieństwo do białka p53, może się przyłączać do sekwencji DNA wiążących białko p53 (p53RE – p53 responsive elements), aktywując transkrypcję genów, których produkty odpowiadają za zahamowanie cyklu komórkowego na etapie G1/S oraz za indukcję procesu apoptozy [42,46].

Białko p73 w wyniku ogromnej strukturalnej homologii do p53 wykazuje wiele podobnych aktywności komórkowych. Jednocześnie jest jednak strukturalnie bardziej skomplikowane, a duża liczba izoform, w których może występować sprawia, że zakres jego biologicznych funkcji wydaje się szerszy. Sieć oddziaływań, w którą białko p73 jest zaangażowane, a także ich regulacja, to tematy wciąż wymagające wielu badań [41]. Znaczenie terapeutyczne regulacji funkcji białka p73 w komórkach nowotworowych to temat niniejszej pracy przeglądowej.

1.1. BUDOWA BIAŁKA p73

Białko p73 jest jądrową fosfoproteiną o masie 69,623 kDa i długości 636 aminokwasów (dla izoformy TAp73 α ; transcriptionally active). Może ono ulegać ekspresji z dwóch promotorów – P1 i P2. Ekspresja z promotora P1 (znajdującego się powyżej eksonu 1) powoduje powstanie aktywnego transkrypcyjnie białka TAp73. Ekspresja z promotora P2 (w obrębie 3 intronu) daje pozbawioną domeny N-terminalnej skróconą wersję białka – Δ Np73. Tak duża liczba izoform, w których może występować białko p73 jest związana także z możliwością alternatywnego składania transkryptów. Może on zachodzić w pre-mRNA zarówno na końcu 3' jak i 5'. Brak eksonu 2, 3 lub obu, daje postaci białka p73 różniące się na N-końcu, wspólnie określane jako Δ TAp73 (ex2 Δ p73, ex3 Δ p73, ex2/3 Δ p73). Natomiast alternatywne składanie eksonów 10–14 generuje izoformy α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , η_1 i ϕ różniące się na C-końcu [35].

Białko p73 należąc do rodziny białek p53 wykazuje względem niego znaczną strukturalną homologię. Budowa obu tych białek jest typowa dla aktywatorów transkrypcji. W ich skład wchodzi domena N-terminalna, rdzeń oraz domena C-terminalna (ryc. 1).

W obrębie domeny N-terminalnej (aminokwasy 1–54), tak jak w przypadku białek p53 i p63, znajduje się domena transaktywacyjna (TA – transactivation). Aminokwasy 84–116 wchodzi w skład regionu bogatego w reszty proliny (PR – proline rich domain). Jest to domena obecna we wszystkich białkach z rodziny p53, o strukturze złożonej z motywów PXXP, gdzie P to prolina, a X jest dowolnym aminokwasem [38].

Rdzeniem (aminokwasy 131–310) jest najbardziej konserwowana w tej rodzinie domena wiążąca się swoiście do DNA (DBD – DNA binding domain). W białkach p73 i p53 w domenach wiążących DNA aż 63% wszystkich aminokwasów jest identycznych [33,38].

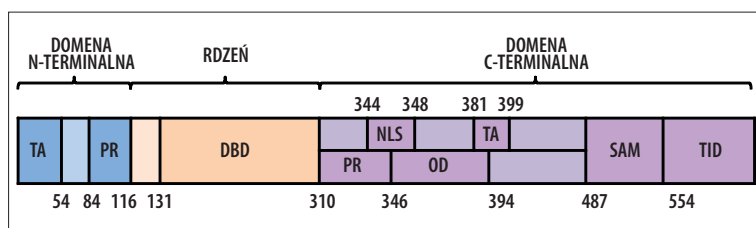
W obrębie bardzo rozbudowanej w przypadku białka p73 domeny C-terminalnej (aminokwasy 346–394) występuje domena odpowiedzialna za oligomeryzację (OD – oligomerization domain). Sekwencje aminokwasowe domen oligomeryzacyjnych białek p53 i p73 charakteryzują się 43% identycznością. Dużo większa homologia (60%) występuje jednak między OD p73 i p63. Ostatnio w strukturze trzeciorzędowej domeny OD obu tych białek (ale nie p53) wykazano obecność dodatkowej α -helisy (w p73 aminokwasy 383–395). Może to tłumaczyć to, iż białko p73 tworzące homotetramery lub heterotetramery może oligomeryzować z bliższym mu strukturalnie białkiem p63. Nie wykazano natomiast takich interakcji z białkiem p53 typu niezmutowanego. Wydaje się nawet, iż heterotetramer p73–p63,

składający się z dwóch homodimerów jest preferowaną, bardziej stabilną postacią strukturalną [12]. Dodatkowo w obrębie domeny oligomeryzacyjnej znajduje się region (344–348) odpowiedzialny za jądrowe umiejscowienie białka p73 (NLS – nuclear localisation signal) [38].

Domena oligomeryzacyjna pokrywa się częściowo z drugą domeną aktywującą transkrypcję (aminokwasy 381–399). W jej skład wchodzi druga α -helisa obecna w domenie OD. C-terminalna domena transkrypcyjna reguluje ekspresję genów zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego, a jej aktywność zmienia się zależnie od etapu cyklu i fosforylacji Ser-388 przez białko PKC (protein kinase C) [39]. Ponieważ C-koniec białka p73 jest znacznie wydłużony, zawiera także domeny niewystępujące w białku p53. W obrębie aminokwasów 310–345 znajduje się dodatkowo, nieobecny w p53 region bogaty w reszty proliny [38]. Kolejną domeną znajdującą się na C-końcu (aminokwasy 487–554) obecną w izoformach p73 α jest część alfa z motywem SAM (sterile alpha motif). SAM jest globularną domeną składającą się z czterech α -helis oraz małej helisy 3₁₀, występującą w wielu białkach zaangażowanych w rozwój organizmu. Jest odpowiedzialna za interakcje z innymi białkami oraz za wiązanie do błon lipidowych [4,13].

Domena leżąca na C-końcu w obrębie aminokwasów 555–636 jest domeną hamującą transkrypcję (TID – transcription inhibitory domain). W ostatnich badaniach wykazano, że zarówno SAM jak i TID są niezbędne do hamowania aktywności domeny TA. Inhibicja nie zachodzi jednak w wyniku bezpośredniej interakcji tych domen. Domeny C-terminalne nie zaburzają także zdolności domeny DBD do wiązania DNA. Hamowanie transkrypcji następuje w wyniku uniemożliwienia przez SAM i TID białku p73 oddziaływania z koaktywatorami transkrypcji białkami p300/CBP, niezbędnymi do inicjacji tego procesu [26]. C-końcowa domena TID może ulegać proteolitycznemu cięciu przez proteazę serynową HtrA (high temperature requirement A). Generuje to bliższą strukturalnie białku p53 skróconą postać TAp73 o zwiększonej aktywności. Cięcie takie jest jednak możliwe dopiero, gdy mitochondrialna proteaza HtrA w wyniku proapoptotycznych sygnałów znajdzie się w cytoplazmie [30].

Ryc 1. Schemat struktury pierwszorzędowej białka p73 z uwzględnieniem podziału na domeny na przykładzie TAp73. Białko p73 składa się z domeny N-terminalnej, rdzenia oraz domeny C-terminalnej. W obrębie domeny N-terminalnej znajdują się: domena transaktywacyjna (TA; 1–54 aa), domena bogata w reszty proliny (PR; 84–116 aa). W skład rdzenia wchodzi domena wiążąca DNA (DBD; 131–310 aa). Domena C-terminalna składa się z domeny bogatej w reszty prolin (PR; 310–345 aa), oligomeryzacyjnej (OD; 346–394 aa), transaktywacyjnej (TA; 381–399 aa), motywu alfa (SAM; 487–554 aa) oraz domeny hamującej transkrypcję (TID; 554–636 aa). W obrębie domeny C-terminalnej znajduje się sygnał kierujący białko p73 do jądra komórkowego (NLS; 344–348 aa)



1.2. DOMENA N-TERMINALNA BIAŁKA p73

Domena N-terminalna białka p73 jest kwaśnym, bogatym w kwas asparaginowy i glutaminowy fragmentem o długości 116 aminokwasów. Ze względu na dużą labilność domeny N-terminalnej w roztworach, dotąd nie udało się jej skryształizować. Jest ważnym regionem zarówno do regulacji funkcji białka p73, jak i jego proapoptotycznej aktywności. Domena N-terminalna jest miejscem licznych modyfikacji potranslacyjnych (fosforylacja Ser-8, 47, 97, 110, Thr-86, Tyr-99; omówione szerzej w dalszej części pracy) oraz regionem oddziaływania z innymi białkami [35].

Jak już wspomniano, w obrębie N-końca można wyróżnić dwie funkcjonalne domeny. Pierwszą z nich jest domena TA (1–54 aa), będąca w 29% homologiczną do domeny transaktywacyjnej białka p53 [33]. Burge i wsp. [8] wykazali, iż można wyodrębnić dwie składające się na nią subdomeny – TAD1 (10–31 aa) i TAD2 (46–67 aa) połączone odcinkiem linkerowym. TAD1 w białkach p53 i p73 jest regionem bardziej konserwowanym, podczas gdy między subdomenami TAD2 obu tych białek obserwuje się dużo więcej różnic w sekwencji aminokwasowej. Każda z nich charakteryzuje się także nieco inną reaktywnością.

W skład domeny N-terminalnej białka p73 wchodzi region bogaty w prolinę (84–116 aa). Jest on obecny u wszystkich znanych przedstawicieli rodziny białek p53. W przypadku białka p73 w jego obrębie można wyróżnić dwa motywy PXXP (84–88 aa oraz 112–116 aa). Ich obecność wiąże się z formowaniem w tym rejonie struktur lewoskrętnych poliprolinowych helis typu II (PPII). Tworzą one miejsce wiązania dla domen SH3 obecnych w wielu białkach związanych z transdukcją sygnału [11], stając się miejscem oddziaływania m.in. z kompleksami białkowymi cyklina-kinaza zależna od cykliny (CDK – cyclin-dependent kinase), c-Abl (cellular Abelson leukemia) oraz JNK (c-Jun N-terminal kinase) [35].

2. ROLA BIAŁKA p73 W KOMÓRCE

Jak już wspomniano, p73 podobnie jak białko p53 odgrywa ważną rolę zarówno w regulacji cyklu komórkowego, jak i procesu apoptozy. Ostateczny efekt aktywności białka p73 w komórce zależy od przewagi ilościowej i funkcjonalnej którejś z jego izoform, a współpraca między nimi gwarantuje równowagę między proliferacją, różnicowaniem, a śmiercią komórki. Zaburzenie równowagi między izoformami TAp73 i ΔNp73 wiąże się natomiast m.in. z występowaniem nowotworów tarczycy, płuca, piersi, jajnika czy też okrężnicy [28].

Postacie TAp73, wykazując strukturalne podobieństwo do p53 są głównymi, działającymi jak białka supresoru nowotworu izoformami aktywującymi transkrypcję wybranej grupy genów [24]. Przewaga TAp73 jest związana zwykle z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1. Aktywowana jest także transkrypcja ważnych dla regulacji cyklu komórkowego i apoptozy genów, będących pod kontrolą białka p53, takich jak *MDM2*, *CCNG* (cyklina G), *CD95/FAS*, kodujący receptor śmierci, a także 14-3-3σ, *PIG3* (p53-inducible gene 3), *p53AIP1* (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) i *IGF-BP3* (insulin-like growth factor binding protein 3). Innymi indukowanymi przez postać

TAp73 genami są *WAF/CIP*, którego produkt białkowy – p21 jest inhibitorem kinazy CDK, *GADD45* (growth arrest and DNA-damage-inducible) kodujący białko, które pod wpływem stresu komórkowego bierze udział w aktywacji szlaku p38/JNK zaangażowanego w odpowiedź na sygnały zewnętrzne dochodzące do komórki (mitogeny). TAp73, wiążąc się do rejonów p53RE indukuje też ekspresję z genów kodujących proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, takie jak Bax (Bcl-2-associated X protein), PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) oraz NOXA [44,53].

Wiązanie białka p73 (ale także p63) do promotorów zawierających sekwencje p53RE oraz aktywacja transkrypcji genów znajdujących się pod ich kontrolą wydaje się niezmiennie istotne. Wykazano bowiem, iż w odpowiedzi na uszkodzenia DNA białko p53 nie może samodzielnie indukować apoptozy. W komórkach p63/p73^{-/-} białko p53 nie wiązało się do promotorów genów, takich jak *NOXA* i *PUMA*. Co sugeruje, że białka p73 i p63, przynajmniej częściowo, są niezbędne do prawidłowego działania p53 jako białka supresoru nowotworu [36].

Znaleziono także wiele genów, niemających sekwencji p53RE, dla których białko TAp73 odgrywa rolę unikalnego aktywatora transkrypcji. Produkty białkowe tych genów pełnią różne funkcje komórkowe. Na przykład białko CaN19 jest wiążącym Ca²⁺ potencjalnym białkiem supresoru nowotworu, związanym z cyklem komórkowym i różnicowaniem. α1-antitrypsyna jest białkiem ostrej fazy i silnym inhibitorem proteaz serynowych. Odgrywa ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Geny *JAG1* i *JAG2* (jagged) kodują natomiast transbłonowe białka będące ligandami receptorów Notch. Wiadomo, że mutacje w tych genach są związane z wadami rozwojowymi [14]. ANXA8 (anneksyna A8) jest wiążącym fosfolipidy zależnym od wapnia białkiem z rodziny anneksyn, a nadekspresję jej genu stwierdzono w przypadkach ostrej białaczki mielocytarnej [9]. p57Kip to zależny od cyklin inhibitor kinazy p57. Jego indukcja przez TAp73β może się wiązać z zatrzymaniem cyklu komórkowego [3]. Regulacja ekspresji wszystkich wymienionych genów jest właśnie regulowana przez białko p73.

Wielokrotnie wykazano, iż postać ΔNp73 jest dominującym negatywnym regulatorem białka TAp73 (ale także TAp63 i p53) [53]. Mechanizm tej regulacji może być dwójaki. Hamowanie aktywności białek z rodziny p53 mających domenę TA może się odbywać w wyniku oddziaływania ich domen OD z domeną oligomeryzacyjną białka ΔNp73 (zazwyczaj z izoformą α) i tworzenie transkrypcyjnie nieaktywnych heterooligomerów. Jakkolwiek nie potwierdzono zdolności białka p73 do tworzenia heterotetramerów z białkiem 53, hipoteza ta nie została odrzucona. Drugim potencjalnym mechanizmem jest kompetycyjne wiązanie ΔNp73 do p53RE i uniemożliwianie efektywnej transkrypcji [47,53]. Istotnym wydaje się to, iż TAp73 a także białko p53 mogą regulować poziom białka ΔNp73 przez bezpośrednią aktywację transkrypcji z promotora P2. Świadczy to o istnieniu mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego regulującego aktywność transkrypcyjną białek TAp73 i p53 [37]. Jako negatywny regulator postaci TA, postać ΔNp73 wykazuje antyapoptotyczny, onkogeny charakter. Ma jednak także inne funkcje. Wraz z białkiem ΔNp63, dzięki obecności dodatkowej C-terminalnej

domeny aktywacyjnej, realizuje własny, odmienny program aktywacji transkrypcji. W komórkach pozbawionych białka p53 indukuje ekspresję onkogennych białek EGR-1 (early growth response protein 1) i c-Myc. Ponadto pozbawione domeny N-terminalnej białko p73 odpowiada za hiperfosforylację białka retinoblastomy pRb i w efekcie aktywację czynnika transkrypcyjnego E2F, promując tym samym proliferację komórek [7]. Białko ΔNp73 pełni także istotną rolę w rozwoju układu nerwowego. Jest główną postacią występującą w rozwijającym się mózgu u myszy. Podczas tworzenia układu nerwowego przeciwdziała indukowanej przez białko p53 śmierci neuronów. Pełni także rolę w regulującej przeżycie komórek nerwowych ścieżce sygnałowej zależnej od czynnika wzrostu nerwu (NGF – nerve growth factor) [35].

Jednak założenie, iż wszystkie izoformy ΔNp73 działają jako dominujące negatywne regulatory TAp73 o właściwościach antyapoptotycznych wydaje się błędne. Marazzo i wsp. [32] uzyskali wyniki podważające powszechnie przyjętą onkogenną funkcję pozbawionej domeny N-terminalnej izoformy p73. Wykazali oni, iż przewaga postaci ΔNp73 nie wpływa na wzrost komórek ani na ich wrażliwość na chemioterapię zarówno w liniach pozbawionych białka p53, jak i zawierających typ dziki tego białka. Co więcej, Liu i wsp. [27] dowiedli, iż ekspresja ΔNp73β na poziomie fizjologicznym prowadzi do supresji wzrostu komórek nowotworowych H1299 i MCF-7, niezależnie od statusu białka p53. Być może wyjaśnieniem tego nieoczekiwanego rezultatu jest obecność w izoformach ΔNp73 domeny aktywującej transkrypcję, która nie występuje w postaciach TAp73. Domenę tę tworzy trzynasty aminokwas eksonu 3' ΔNp73 wraz z rejonem bogatym w reszty prolin kodowanym przez ekson 4. Interesujące jest to, że izoforma ΔNp73α, mimo iż ma tę domenę, nie powoduje supresji wzrostu. Wskazuje to, iż również sekwencje kodujące domeny C-terminalne białka mogą wpływać na końcowy fenotyp generowany przez nadmierną ilość postaci ΔNp73. Wydaje się, że w różnych sytuacjach różne izoformy ΔNp73 mogą zachowywać się odmiennie. Irwin uważa, iż istotny wpływ na odpowiedź komórek na wytwarzanie postaci ΔNp73 ma stadium i poziom nadekspresji tego białka [19]. Być może jeśli postać ΔNp73α ulega ekspresji we wczesnej fazie nowotworzenia w relatywnie niezmiennionych jeszcze komórkach, skutkuje to promocją wzrostu. I tak okazuje się, iż egzogenne wytwarzanie białka ΔNp73 powoduje transformację nowotworową pierwotnych fibroblastów *in vitro* i *in vivo*, lecz nadmiar tego białka w nowotworowych komórkach linii HCT116 i H1299 nie powoduje ich wzmożonej proliferacji *in vitro*, ani też bardziej agresywnego fenotypu ksenograftów u myszy. Jak większość komórek nowotworowych, linie HCT116 i H1299 nagromadziły wiele zmian w genomach i możliwe jest, że klony te mogą tolerować ekspresję ΔNp73. Mają one najprawdopodobniej zmienione szlaki regulacji onkogenów i supresorów nowotworów, a także różne poziomy białek regulatorowych biorących udział w procesie apoptozy zależnej od białka p73. Co więcej, możliwe jest, że różne C-terminalne izoformy białka ΔNp73 mają odmiennie aktywności w wielu typach nowotworów. Większość badań opisujących białko ΔNp73 jako negatywny czynnik prognostyczny nie rozróżnia które izoformy C-końca ulegają ekspresji w nowotworach pierwotnych. Być może, izoformy α, β, γ, itd. wpływają odmiennie na wzrost i różnie regulują

odpowiedź na chemioterapię, prawdopodobnie ze względu na różnice w wiązaniu się do białek regulatorowych [19].

3. RÓŻNE POZIOMY REGULACJI BIAŁKA p73

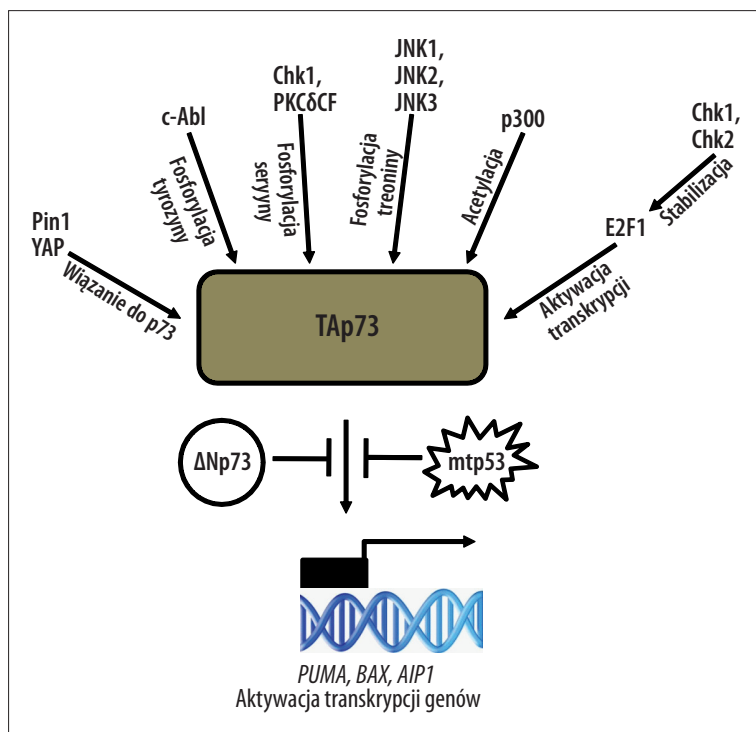
Regulacja białka p73 w komórce zachodzi na kilku poziomach. Przede wszystkim jest ono regulowane na poziomie transkrypcji. Ekspresja genu kodującego TAp73 z promotora P1 jest związana z aktywnością czynnika transkrypcyjnego E2F-1. Zarówno białko p53, jak i TAp73 indukują z kolei ekspresję postaci ΔNp73 z promotora P2. W obrębie pierwszego intronu genu *TP73* znajduje się miejsce wiązania dla inhibitora transkrypcji ZEB (zinc finger enhancer binding protein), który hamuje ekspresję TAp73 w komórkach nieodróżnionych [57]. Dodatkowym mechanizmem regulującym poziom transkrypcji białka p73 jest metylacja jego promotora. Hipermetylacja hamująca ekspresję genu *TP73* jest częsta w ostrej białaczce limfoblastycznej i chłoniaku Burkitta. Nie wykazano jednak jej wpływu na ekspresję białka p73 w innych rodzajach nowotworów czy zdrowych limfoblastach. Wydaje się więc, iż modyfikacja ta jest swoista jedynie dla nowotworów hematologicznych [10].

Duża ilość wykazujących odmienne funkcje izoform białka p73 sugeruje, iż alternatywny splicing jest kolejnym istotnym etapem jego regulacji. W różnych liniach komórkowych izoformy białka p73 występują w różnych proporcjach. Zauważalna jest jednak tendencja, iż w większości z nich przeważają izoformy powstałe w wyniku omijania eksonów. Regulacja alternatywnego składania transkryptów nie jest jednak jeszcze wyjaśniona [50].

Bardzo ważne dla regulacji aktywności białka p73 wydaje się również modyfikacje potranslacyjne. Podstawowe dla działania p73 wydaje się oddziaływanie z niereceptorową kinazą tyrozynową c-Abl indukowane stresem związanym z promieniowaniem jonizującym lub w odpowiedzi na cisplatynę. Jego zahamowanie wiąże się z obniżeniem poziomu zależnej od białka p73 transkrypcji genów oraz indukcji procesu apoptozy. W wyniku interakcji domeny SH3 (Src homology 3) obecnej w c-Abl oraz domeny PR białka p73, następuje fosforylacja Tyr-99, Tyr-121 i Tyr-240. Tworzy się wówczas dodatkowy motyw niezbędny do wiązania domeny SH2 kinazy c-Abl, co zapewnia białku p73 większą stabilność [50].

Zwiększona aktywność c-Abl i kinazy MAP (mitogen activated kinase) – p38 stymuluje wiązanie białka p73 przez białko Pin1. Jest to izomeraza peptydyloprolylowa katalizująca izomeryzację cis-trans w Ser/Thr-Pro fosforylowanych peptydach. Wykazano, iż zmiana konformacji, zachodząca w wyniku jej działania, indukuje zależną od białek p300/CBP acetylację białka p73 (Lys-321, 327, 331). Zachodząca w wyniku uszkodzeń DNA acetylacja białek z rodziny białek p53 zwiększa ich stabilność i aktywność transkrypcyjną, co w znacznej mierze wpływa na ich funkcje proapoptotyczne [29].

Na wspomnianą modyfikację białka p73 oprócz Pin1 i p38 mają wpływ także białka z rodziny YAP (Yes-associated protein). Białka te mają globularną domenę WW (nazwa pochodzi od dwóch konserwowanych reszt tryptofanu), biorącą udział w aktywacji transkrypcji. Aktywne, fosforylowane



Ryc 2. Regulacja białka p73 w komórce. Aktywność oraz stabilność białka p73 jest regulowana zarówno przez bezpośrednie interakcje białkowe, jak również modyfikacje potranslacyjne. Transkrypcję genu *P73* reguluje czynnik transkrypcyjny E2F1, aktywowany przez kinazę Chk1. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA dochodzi do aktywacji p73 poprzez fosforylację przez kinazy c-Abl, Chk1, PKCδCF, JNK oraz acetylację przez białko p300. Na białko p73 wpływają również oddziaływania z białkami YAP-1 i Pin-1. Białko Pin-1 po związaniu do p73 zmienia jego konformację w ten sposób, że ułatwia acetylację przez białko p300. Koaktywator transkrypcji białko YAP-1 aktywuje transkrypcję genu *P73*, a także genów zależnych od p73. Co więcej, YAP-1 stabilizuje p73, wiążąc się do białka i zapobiegając jego ubikwitinacji. Aktywacja transkrypcji genów p73-zależnych hamowana jest poprzez interakcję p73 ze zmutowaną postacią p53 (mtp53) oraz poprzez aktywność dominującej negatywnej izoformy ΔNp73

przez c-Abl (Tyr-357) YAP1 wiąże się domeną WW z motywem PPXY (prolina-prolina-dowolny aminokwas-tyrozyna), znajdującym się w białku TAp73. Działając jako selektywny koaktywator transkrypcji genu kodującego białko p73, wpływa na jego akumulację w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Ponadto ułatwia zależną od białka TAp73 aktywację proapoptotycznych genów przez wiązanie się do ich promotorów. Koaktywacja ta jest jednak możliwa tylko w przypadku wybranych izoform – p73α, p73β oraz p63α. Nie wpływa natomiast na izoformę p73γ oraz białko p53. Białko YAP1, wiążąc się do motywu PPXY, konkuruje o miejsce wiązania z Itch (ligazą ubikwityny E3) i zapobiegając ubikwitinacji odpowiada za stabilizację p73 [23,48].

Proapoptotyczna i transkrypcyjna aktywność białka TAp73 jest także indukowana przez następującą w wyniku uszkodzeń DNA fosforylację Ser-47 przez kinazę CHK1 (checkpoint kinase 1). CHK1 wraz z CHK2 stabilizują również białko E2F wpływając przez to na wzrost transkrypcji *TP73* [16]. Zwiększoną aktywność proapoptotyczną oraz transkrypcyjną białko p73 zyskuje również w wyniku fosforylacji Ser-8, 97, 110, 330, 412, a także Thr-442 i 482 przez JNK1, JNK2 i JNK3 [20]. W wyniku stresu komórkowego kinaza PKCδ (protein kinase Cδ) ulega proteolitycznemu cięciu przez kaspazę 3 generując fragment katalityczny PKCδCF. Fosforyluje on Ser-289 białka p73, przez co także zwiększa jego aktywność transkrypcyjną [53]. Modyfikacje potranslacyjne aktywujące białko p73 przedstawia rycina 2.

Indukowana czynnikami stresowymi fosforylacja białka p73 nie zawsze wiąże się jednak z jego aktywacją. Wykazano, iż w przeciwieństwie do białka p53, p73 w czasie cyklu komórkowego podlega regulacji przez kinazy zależne od cyklin. Kompleksy mitotyczne cyklin A/CDK1/2, B/CDK1/2 oraz E/CDK2 fosforylują p73 (Thr-86) zmniejszając jego zdolność do wiązania DNA i indukcji transkrypcji

w komórkach mitotycznych, co wydaje się szczególnie ważne dla prawidłowego przebiegu mitozy i przekraczania jej punktów kontrolnych [15]. Również kinazy z rodziny Src (sarcoma), HCK (hemopoietic cell kinase), PKA (protein kinase A), Plk1 (polo-like kinase 1) poprzez fosforylację p73 hamują jego aktywność [53].

Kolejnym rodzajem modyfikacji potranslacyjnych wpływających na regulację funkcji p73 jest przyłączenie białka SUMO (small ubiquitin-like modifier) do Lys-627 w obrębie domeny hamującej transkrypcję TID. Modyfikacja ta zarówno w przypadku izoformy p73α, jak i p63α powoduje zahamowanie ich aktywności transkrypcyjnej. Jeszcze nie wiadomo czy dzieje się tak wskutek blokowania wiązania zmodyfikowanych białek do DNA, czy też w wyniku przyłączania inhibitorów transkrypcji do białek już związanych. Ciekawym wydaje się to, iż przyłączenie białka SUMO do p53 może mieć dwojaki wpływ na jego aktywność. Aktywujący lub też hamujący charakter tej modyfikacji zależy prawdopodobnie od liczby przyłączonych do białka cząsteczek. Przypuszcza się, iż modyfikacja SUMO wpływa na zwiększoną degradację białek p73 i p63 [45].

Na degradację białek z rodziny p53 niewątpliwie ma wpływ ubikwitinacja. Proces przyłączania reszt ubikwityny jest zależny od działania trzech kolejnych enzymów – aktywującego ubikwitynę (E1), enzymu koniugującego (E2) oraz swoistej względem substratów ligazy ubikwityny (E3). Wykazano, że za ubikwitinację i proteasomalną degradację zarówno izoformy TAp73, jak i ΔNp73 odpowiadają ligazy, takie jak Itch (wiąże się do izoform p63 i p73 mających na C-końcu domenę PR) oraz ligazy zawierające białko FBXO45. W fizjologicznych warunkach modyfikacja przez ubikwitinację jest jednym ze sposobów utrzymywania obu postaci białka p73 na stosunkowo niskim poziomie. W odpowiedzi na stres związany z uszkodzeniem

DNA ligazy ubikwityny podlegają deregulacji odpowiadając za zwiększoną stabilność p73. Ponieważ jednak żadna z wyżej wymienionych ligaz nie wykazuje większej swoistości wobec transkrypcyjnie aktywnych lub też pozbawionych domeny N-terminalnej izoform p73, inny mechanizm musi być odpowiedzialny za przeważającą aktywność postaci TAp73 w warunkach stresu [43]. NEDL2 (NEDD4-like ubiquitin protein ligase 2), podobnie jak Itch i ligazy zawierające FBXO45, reguluje aktywność białka p73 poprzez ubikwitinację. Efekt tej modyfikacji jest jednak w tym przypadku odmienny. Ubikwitinacja zachodząca w obrębie C-terminalnej domeny bogatej w prolinę nie kieruje białka p73 do degradacji, a wręcz przeciwnie, zwiększa jego aktywność transkrypcyjną [34].

W przeciwieństwie do białka p53, białka p63 i p73 nie podlegają ubikwitinacji przez ligazę ubikwityny E3 – MDM2 (mouse double minute 2). MDM2, a także jego ludzki homolog HDM2 oraz DMX oddziałują z białkami TAp63 i TAp73 w sposób analogiczny do oddziaływania z p53, wiążąc się do hydrofobowego regionu na N-końcu. Prawdopodobnie jednak skutek braku sekwencji (w p53 aminokwasy 92–112) odpowiadającej za kierowanie białka p53 przez MDM2 do degradacji, w białkach p73 i p63 oddziaływanie jest zgoła odmienne. Wykazano, iż oddziaływanie z białkiem MDM2 stabilizuje p73. Wydaje się również, że p53 i p73 konkurują o wiązanie do MDM2. Mimo iż białko p53 wykazuje wyższe powinowactwo do MDM2, przy nadekspresji p73 obserwuje się wzrastającą liczbę kompleksów MDM2-p73 i zmniejszającą się liczbę kompleksów MDM2-p53 [40,54,58]. Taki skutek interakcji białka p73 z ligazą ubikwityny, może mieć więc znaczenie dla stabilizacji i ochrony białka p53 przed degradacją [2]. Dane literaturowe donoszą również, że MDM2 zmniejsza aktywność transkrypcyjną TAp73. Jednocześnie jednak w obecności MDM2 obserwuje się zwiększoną zdolność p73 do hamowania wzrostu komórek [53].

Poza MDM2 wykazano, że również inne białka mogą oddziaływać z p73 wpływając w ten sposób na regulację jego aktywności i stabilności komórkowej. Zarówno p73, jak p63 i p53 oddziałują z białkami z rodziny ASPP (ankyrin-rich, Src holomogy 3 domain, proline-rich proteins). Dane literaturowe wskazują, iż interakcja z ASPP1 i ASPP2 stymuluje proapoptotyczne funkcje wspomnianych białek. Wiążąc się do DBD wzmacniają aktywność transkrypcyjną białek z rodziny p53, wpływając na ekspresję genów, takich jak *PIG3*, *BAX* i *PUMA*. Białka ASPP nie wpływają jednak na indukcję transkrypcji genów *MDM2* i *p21*. Oddziaływanie p53 i p73 z trzecim przedstawicielem rodziny ASPP, białkiem inhibitorowym iASPP (inhibitory member of the ASPP family), warunkuje z kolei obniżenie aktywności transkrypcyjnej tych białek. Białko iASPP wiąże się do domeny wiążącej DNA oraz rejonu bogatego w reszty prolin białek p53 i p73, przez co uniemożliwia im wiązanie się do DNA [6].

Kolejne, interesujące w kontekście regulacji funkcji p73 białko to NQO1 (NADH quinine oxidoreductase 1), które reguluje proteasomalną, niezależną od znakowania ubikwityną degradację TAp73 α , ale nie TAp73 β , które nie wiąże się do NQO1). W odpowiedzi na uszkodzenia DNA białko to chroni przed kierowaniem izoformy TAp73, a także białka p53 do podjednostki 20S proteasomu [1]. Z kolei białko

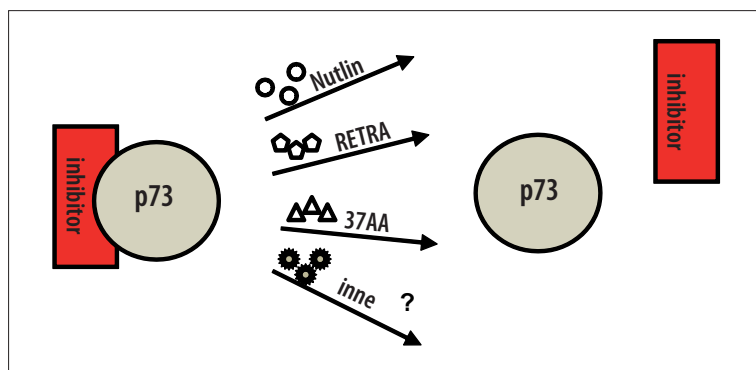
UFD2a (ubiquitin fusion degradation protein 2a), wiążąc się do motywu SAM w białku p73 α odpowiada za jego niezależną od ubikwityny degradację. Jednak w przypadku wystąpienia sygnałów proapoptotycznych (np. w odpowiedzi na cisplatinę) poziom białka UFD2a spada, pozwalając na akumulację p73 i wzrost jego aktywności [17]. Sposób regulacji białka p73 w komórce przedstawia rycina. 2.

4. BIAŁKO P73 POTENCJALNYM CELEM W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Biorąc pod uwagę, iż w ponad 50% wszystkich przypadków nowotworów u ludzi obserwuje się mutacje w genie bardzo istotnego białka supresora nowotworu – p53, alternatywna ścieżka indukcji śmierci komórek zmienionych nowotworowo jest głównym celem terapii przeciwnowotworowej. Białko p73, jak już wielokrotnie wykazano, jest ważnym regulatorem przeżycia i apoptozy komórek. W komórkach nowotworowych gen tego białka stosunkowo rzadko ulega mutacjom, a w przypadku braku aktywnego białka p53, jako strukturalny i funkcjonalny homolog, częściowo przejmując jego supresorowe funkcje. Wydaje się zatem obiecującym celem w terapii przeciwnowotworowej. Zwiększenie aktywności transkrypcyjnej lub stabilności postaci TAp73 w komórkach nowotworowych uruchamia łańcuch zdarzeń prowadzących do apoptozy (także niezależnej od poziomu i funkcji białka p53). Z tego też powodu, szczególnie ważne stają się badania koncentrujące się na poszukiwaniu i badaniu potencjalnych cząsteczek oddziałujących z białkiem p73 lub jego białkami regulatorowymi. Większość skupia się na identyfikacji niskocząsteczkowych związków, które oddziałując bądź z białkiem p73, bądź z jego inhibitorami, odwracają skutki hamowania, prowadzą do akumulacji białka p73 w komórce i aktywacji transkrypcji zależnych od niego genów [28,53].

W 2004 roku Vassilev i wsp. [51] zidentyfikowali grupę związków o nazwie nutliny i wykazali, iż działają one jako inhibitory interakcji MDM2-p53. Dzięki obecności grupy bromofenylowej mimikującej trzy reszty aminokwasowe p53, nutliny wiążą się do hydrofobowej kieszeni białka MDM2, uwalniając tym samym białko p53 od jego inhibicji. W 2003 roku Lau i wsp. [23] wykazali, iż nutlina3a blokuje również interakcję między białkiem p73 a ludzkim białkiem MDM2 (human double minute 2, HDM2) w komórkach ludzkiej linii nowotworu jelita grubego pozbawionych białka p53 HCT116 p53^{-/-}, a także w linii neuroblastoma (SKNBE2). Powoduje to akumulację postaci TAp73 w komórce i jego wzmoczoną aktywność transkrypcyjną, co wykazano analizując ekspresję proapoptotycznych genów *NOXA* i *PUMA*, a także *CDKN1A* kodującego białko p21. Nutlina 3a aktywuje i stabilizuje białka p73. Ponadto nutlina 3 wzmacnia cytotoksyczność doksorubicyny, inhibitora topoizomazy II i induktora uszkodzeń DNA. W komórkach neuroblastoma LA155N p53^{-/-} opornych na doksorubicynę pod wpływem działania nutliny 3 obserwowano wzrost aktywności TAp73 i aktywację czynnika transkrypcyjnego E2F-1, zależną od uszkodzeń DNA.

Jak wspomniano wcześniej, inhibitorowe białko z rodziny ASPP – iASPP, wiążąc się do p53 i p73 powoduje hamowanie transkrypcji zależnych od nich genów. W 2007 roku Bell i wsp. [5] donieśli o syntezie, w oparciu o sekwencję białka p53 typu niezmutowanego krótkiego, złożonego z 37



Ryc 3. Strategie aktywacji białka p73 ujawniają jego ukryty potencjał terapeutyczny.

Związki niskocząsteczkowe, a także krótkie peptydy aktywują białko p73 w komórkach nowotworowych, co prowadzi do ich selektywnej eliminacji za pośrednictwem p73-zależnej apoptozy. Aktywatory białka p73, oddziałując bądź z białkiem p73, bądź z jego inhibitorem, odwracają skutki inhibicji i prowadzą do akumulacji białka p73 w komórce i aktywacji transkrypcji zależnych od niego genów. Udokumentowanymi aktywatorami białka p73 są RETRA, nutlina 3 oraz krótki peptyd 37 AA

aminokwasów peptydu (37 AA), który wiążąc się z białkiem iASPP zapobiega wiązaniu białek p53 i p73 do iASPP. Peptyd 37 AA działa więc jak derepresor, prowadząc do aktywacji transkrypcji zależnych od p53 i p73 genów.

Istotną postacią inaktywacji białka p73 w komórkach nowotworowych jest tworzenie heterodimerów między p73 a zmutowanym białkiem p53, prowadzące do zahamowania aktywności transkrypcyjnej białka p73. Za formowanie kompleksu odpowiedzialna jest domena wiążąca DNA oraz domena tetrameryzacyjna białek. Czynnikiem predestynującym do utworzenia heterodimeru jest polimorfizm kodonu 72 białka p53 [57]. Kravchenko i wsp. [22] zidentyfikowali niskocząsteczkowy związek RETRA, który uwalnia białko p73 z kompleksu ze zmutowanym p73 i aktywuje transkrypcję genów, których produkty biorą udział w zatrzymaniu cyklu komórkowego i w indukcji apoptozy.

W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, iż także wykorzystywana w terapii fotodynamicznej protoporfiryna IX wiąże się do białka p53 i zaburza tworzenie kompleksu p53-HDM2 [56]. Powoduje to akumulację p53 i indukcję proapoptotycznych białek Bak oraz PUMA. Zauważono również wzrost fosforylacji białka p53 w pozycji Ser-15, co ułatwia

interakcje z koaktywatorami transkrypcji. PpIX indukowała także wzrost ekspresji genów zależnych od p53, takich jak *PUMA*, oraz co ciekawe, apoptozę w komórkach HCT116 p53^{-/-}. Ponieważ transkrypcja tych genów może być aktywowana przez TAp73 jest możliwe, że PpIX może wiązać i aktywować również ten homolog białka p53. Związki uwalniające p73 spod działania inhibitorów przedstawia rycina 3.

WNIOSKI

Uszkodzenie DNA w odpowiedzi na chemioterapię w wyniku transdukcji sygnału powoduje śmierć komórek. Ważne w tym procesie jest nie tyle samo białko p53, co współpraca między białkami p53 i p73, a może również p63. Zdolność proapoptotycznej izoformy TAp73 do indukcji apoptozy modulowana jest przez interakcje z innymi izoformami p73, a także ze zmutowanym p53. Inaktywacja białka p73 przez zmutowane p53 wskazuje na istotny mechanizm oporności komórek nowotworowych na chemioterapię. Dlatego też aktywacja białka p73 w komórkach nowotworowych z użyciem niskocząsteczkowych molekuł to bardzo obiecująca metoda indukowania wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapię.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Asher G., Tsvetkov P., Kahana C., Shaul Y.: A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.*, 2005; 19: 316–321
- [2] Bálint E., Bates S., Vousden K.H.: Mdm2 binds p73α without targeting degradation. *Oncogene*, 1999; 18: 3923–3929
- [3] Bálint E., Phillips A.C., Kozlov S., Stewart C.L., Vousden K.H.: Induction of p57KIP2 expression by p73β. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3529–3534
- [4] Barrera F.N., Poveda J.A., Gonzalez-Ros J.M., Neira J.L.: Binding of the C-terminal sterile α motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 46878–46885
- [5] Bell H.S., Dufes C., O'Prey J., Crighton D., Bergamaschi D., Lu X., Schätzlein A.G., Vousden K.H., Ryan K.M.: A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 1008–1018
- [6] Bergamaschi D., Samuels Y., Jin B., Duraisingham S., Crook T., Lu X.: ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 1341–1350
- [7] Blandino G., Dobbelstein M.: p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*, 2004; 3: 886–894
- [8] Burge S., Teufel D.P., Townsley F.M., Freund S.M., Bycroft M., Fersht A.R.: Molecular basis of the interactions between the p73 N terminus and p300: effects on transactivation and modulation by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 3142–3147
- [9] Chen X., Liu G., Zhu J., Jiang J., Nozell S., Willis A.: Isolation and characterization of fourteen novel putative and nine known target genes of the p53 family. *Cancer Biol. Ther.*, 2003; 2: 55–62
- [10] Corn P.G., Kuerbitz S.J., van Noesel M.M., Esteller M., Compitello N., Baylin S.B., Herman J.G.: Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.*, 1999; 59: 3352–3356
- [11] Courtois S., de Fromental C.C., Hainaut P.: p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene*, 2004; 23: 631–638
- [12] Coutandin D., Löhr F., Niesen F.H., Ikeya T., Weber T.A., Schäfer B., Zielonka E.M., Bullock A.N., Yang A., Güntert P., Knapp S., McKeon F., Ou H.D., Dötsch V.: Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 1582–1589
- [13] De Laurenzi V., Melino G.: Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 926: 90–100
- [14] Fontemaggi G., Kela I., Amariglio N., Rechavi G., Krishnamurthy J., Strano S., Sacchi A., Givol D., Blandino G.: Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 43359–43368
- [15] Gaidon C., Lokshin M., Gross I., Levasseur D., Taya Y., Loeffler J.P., Prives C.: Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27421–27431

- [16] Gonzalez S., Prives C., Cordon-Cardo C.: p73 α regulation by Chk1 in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 8161–8171
- [17] Hosoda M., Ozaki T., Miyazaki K., Hayashi S., Furuya K., Watanabe K., Nakagawa T., Hanamoto T., Todo S., Nakagawara A.: UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene*, 2005; 24: 7156–7169
- [18] Irwin M.S.: Family feud in chemosensitivity: p73 and mutant p53. *Cell Cycle*, 2004; 3: 319–323
- [19] Irwin M.S.: Δ Np73: misunderstood protein? *Cancer Biol. Ther.*, 2006; 5: 804–807
- [20] Jones E.V., Dickman M.J., Whitmarsh A.J.: Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. J.*, 2007; 405: 617–623
- [21] Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalou P., Lelias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D.: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 1997; 90: 809–819
- [22] Kravchenko J.E., Ilyinskaya G.V., Komarov P.G., Agapova L.S., Kochetkov D.V., Strom E., Frolova E.I., Kovriga I., Gudkov A.V., Feinstein E., Chumakov P.M.: Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 6302–6307
- [23] Lau L.M., Nugent J.K., Zhao X., Irwin M.S.: HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene*, 2008; 27: 997–1003
- [24] Levy D., Adamovich Y., Reuven N., Shaul Y.: The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ.*, 2007; 14: 743–751
- [25] Lin Y.L., Sengupta S., Gurdziel K., Bell G.W., Jacks T., Flores E.R.: p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000680
- [26] Liu G., Chen X.: The C-terminal sterile α motif and the extreme C terminus regulate the transcriptional activity of the α isoform of p73. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20111–20119
- [27] Liu G., Nozell S., Xiao H., Chen X.: Δ Np73 β is active in transactivation and growth suppression. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 487–501
- [28] Lunghi P., Costanzo A., Mazzera L., Rizzoli V., Levrero M., Bonati A.: The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 6495–6502
- [29] Mantovani F., Piazza S., Gostissa M., Strano S., Zacchi P., Mantovani R., Blandino G., Del Sal G.: Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol. Cell*, 2004; 14: 625–636
- [30] Marabese M., Mazzeletti M., Vikhanskaya F., Brogginini M.: HtrA2 enhances the apoptotic functions of p73 on bax. *Cell Death. Differ.*, 2008; 15: 849–858
- [31] Marin M.C., Jost C.A., Irwin M.S., DeCaprio J.A., Caput D., Kaelin K.G.Jr.: Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 6316–6324
- [32] Marrazzo E., Marchini S., Previti S., Brogginini M.: Questioning the oncogenic role of Δ Np73 α in different cell lines expressing p53 or not. *Cancer Biol. Ther.*, 2006; 5: 794–803
- [33] Melino G., De Laurenzi V., Vousden K.H.: p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 605–615
- [34] Miyazaki K., Ozaki T., Kato C., Hanamoto T., Fujita T., Irino S., Watanabe K., Nakagawa T., Nakagawara A.: A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 308: 106–113
- [35] Moll U.M., Slade N.: p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res.*, 2004; 2: 371–386
- [36] Murray-Zmijewski F., Lane D.P., Bourdon J.C.: p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.*, 2006; 13: 962–972
- [37] Nakagawa T., Takahashi M., Ozaki T., Watanabe K., Todo S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawara A.: Autoinhibitory regulation of p73 by Δ Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Δ Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 2575–2585
- [38] Nozell S., Wu Y., McNaughton K., Liu G., Willis A., Paik J.C., Chen X.: Characterization of p73 functional domains necessary for transactivation and growth suppression. *Oncogene*, 2003; 22: 4333–4347
- [39] Nyman U., Vlachos P., Cascante A., Hermanson O., Zhivotovskiy B., Joseph B.: Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 1814–1825
- [40] Ongkeko W.M., Wang X.Q., Siu W.Y., Lau A.W., Yamashita K., Harris A.L., Cox L.S., Poon R.Y.: MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 829–832
- [41] Oswald C., Stiewe T.: In good times and bad: p73 in cancer. *Cell Cycle*, 2008; 7: 1726–1731
- [42] Ozaki T., Nakagawara A.: p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.*, 2005; 96: 729–737
- [43] Peschiaroli A., Scialpi F., Bernassola F., Pagano M., Melino G.: The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene*, 2009; 28: 3157–3166
- [44] Ramadan S., Terrinoni A., Catani M.V., Sayan A.E., Knight R.A., Mueller M., Krammer P.H., Melino G., Candi E.: p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 331: 713–717
- [45] Stehmeier P., Muller S.: Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. *DNA Repair*, 2009; 8: 491–498
- [46] Stiewe T., Pützer B.M.: p73 in apoptosis. *Apoptosis*, 2001; 6: 447–452
- [47] Stiewe T., Theseling C.C., Pützer B.M.: Transactivation-deficient Δ TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 14177–14185
- [48] Strano S., Monti O., Pediconi N., Baccarini A., Fontemaggi G., Lapi E., Mantovani F., Damalas A., Citro G., Sacchi A., Del Sal G., Levrero M., Blandino G.: The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA damage. *Mol. Cell*, 2005; 18: 447–459
- [49] Tomkova K., Tomka M., Zajac V.: Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasia*, 2008; 55: 177–181
- [50] Tsai K.K., Yuan Z.M.: c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res.*, 2003; 63: 3418–3424
- [51] Vassilev L.T., Vu B.T., Graves B., Carvajal D., Podlaski F., Filipovic Z., Kong N., Kammlott U., Lukacs C., Klein C., Fotouhi N., Liu E.A.: *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 2004; 303: 844–848
- [52] Vikhanskaya F., Toh W.H., Dulloo I., Wu Q., Boominathan L., Ng H.H., Vousden K.H., Sabapathy K.: p73 supports cellular growth through c-Jun-dependent AP-1 transactivation. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 698–705
- [53] Vilgelm A., El-Rifai W., Zaika A.: Therapeutic prospects for p73 and p63: rising from the shadow of p53. *Drug Resist. Updat.*, 2008; 11: 152–163
- [54] Wang X.Q., Ongkeko W.M., Lau A.W., Leung K.M., Poon R.Y.: A possible role of p73 on the modulation of p53 level through MDM2. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1598–1603
- [55] Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., McKeon F., Caput D.: p73-deficient mice have neurological, phenomonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 2000; 404: 99–103
- [56] Zawacka-Pankau J., Issaeva N., Hossain S., Pramanik A., Selivanova G., Podhajski A. J.: Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein *in vitro* and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 2466–2472
- [57] Zawacka-Pankau J., Kostecka A., Sznarkowska A., Hedström E., Kawiak A.: p73 tumor suppressor protein – a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach. *Cell Cycle*, 2010; 9: 720–728
- [58] Zeng X., Chen L., Jost C.A., Maya R., Keller D., Wang X., Kaelin W.G. Jr., Oren M., Chen J., Lu H.: MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 3257–3266

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.