

Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi

The p53 family of genes in development and tumor formation

Arijana Zorić, Anđela Horvat, Neda Slade*

Sažetak. Tumor supresorski gen p53 ima kritičnu ulogu u kontroli staničnog rasta i održavanju genetske stabilnosti. Ove aktivnosti posljedica su činjenice da p53 stvara tetramere koji se vežu za određeni slijed na DNA i aktiviraju transkripciju. Gubitkom tumor supresorske aktivnosti, mutirani proteini p53 dobivaju onkogeni potencijal što rezultira nekontroliranim rastom stanica tumora. Otkrivena su i dva srodnika gena p53 – p63 i p73, koji pokazuju veliku strukturnu sličnost s genom p53, ali funkcionalno velike razlike. Sva tri gena imaju dva promotora, što zajedno s alternativnim izrezivanjem i alternativnim početkom translacije daje brojne izoforme proteina s različitim funkcijama. Tako geni p63 i p73 imaju vrlo složenu strukturu i kodiraju dvije skupine izoformi proteina koje imaju suprotno funkcionalno djelovanje – izoforme s transaktivacijskim područjem (TAp63/73) koje imaju tumor supresorsko djelovanje i izoforme bez transaktivacijskog područja ($\Delta Np63/73$) s potencijalnim onkogenim djelovanjem koje djeluju kao transdominantni inhibitori TAp73 i divljeg tipa p53. Nedavno je utvrđeno da i p53 sadrži još jedan promotor, te da dolazi do sinteze višestrukih izoformi čija funkcija nije još u potpunosti jasna. U ovom preglednom radu opisane su različite izoforme p63, p73 i p53 te njihova uloga u razvoju i tumorigenezi. Istraživanja članova obitelji p53, posebice njihovih međusobnih interakcija, pridonijet će rasvjetljavanju uloge ovih proteina u nastanku i razvoju tumora.

Ključne riječi: diferencijacija, p53, p63, p73, razvoj, tumorigeneza

Abstract. TP53 tumor suppressor protein is crucial in the cell growth control and the maintenance of genomic stability. These activities are due, at least in part, to its ability to form homooligomers that bind to specific DNA sequences and activate transcription. Later discovered p53 homologues, p63 and p73 share remarkable structural and partly functional similarity with p53. All three genes have two promoters and undergo alternative splicing to generate multiple isoforms that might play important roles in carcinogenesis. Both p63 and p73 genes generate two groups of isoforms: transactivating forms (TAp63/73) with tumor suppressor activities as well as a number of N-terminally truncated transactivation-deficient transdominant isoforms (called $\Delta Np63/73$). It was recently discovered that p53, like p73, has a second internal promoter that leads to the synthesis of multiple isoforms whose function is not yet fully clear. In this review different isoforms of p63, p73, p53 and their roles in development and tumorigenesis are described. Defining the interactions between p53/p63/p73 would give a new insight into the roles of these proteins in tumorigenesis.

Key words: development, differentiation, p53, p63, p73, tumorigenesis

Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za molekularnu onkologiju,
Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Primljeno: 30. 12. 2009.
Prihvaćeno: 26. 2. 2010.

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Neda Slade
Zavod za molekularnu medicinu,
Laboratorij za molekularnu onkologiju,
Institut "Ruđer Bošković",
Bijenička 54, 10 000 Zagreb
e-mail: slade@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

OBITELJ GENA P53

Prvi član obitelji p53, gen p53, otkriven je 1979. godine kao stanični protein koji ulazi u interakciju s onkogenim T antigenom virusa SV40^{1,2}. Tumor supresorski gen p53 ima ključnu ulogu u tumorigenezi³ – odgovoran je za regulaciju staničnog ciklusa, programirane stanične smrti i staničnog starenja (senescencije). Kontrolira stanični odgovor na stres potičući apoptozu i zastoj staničnog ciklusa te tako sprječava nastanak tumora. Gubit-

Biološke funkcije izoformi proteina p63 i p73 vrlo su različite i specifične. Izoforme proteina p53 još uvijek imaju nerazjašnjene uloge. Nove spoznaje o ulozi pojedinih izoformi u staničnim procesima vezanim uz nastanak tumora mogle bi pomoći boljem razumijevanju tih procesa i pronalasku novih metoda liječenja bolesnika oboljelih od tumora.

kom tumor supresorske aktivnosti mutirani proteini p53 dobivaju onkogeni potencijal što rezultira nekontroliranim rastom stanica tumora.

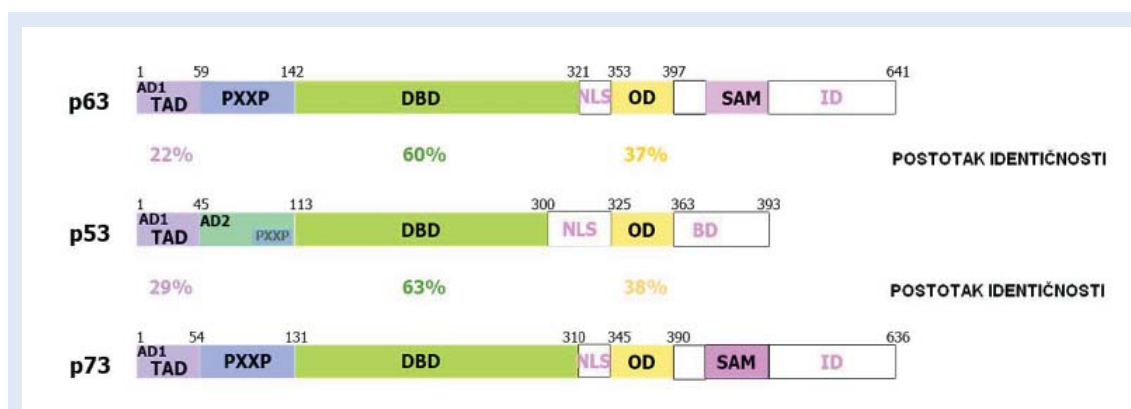
Prvi homolog gena p53, gen p73, otkriven 1997. g., nalazi se na položaju 1p36.2-3, regiji kromosoma koja je često deletirana u neuroblastomima, tumorima kolona, melanomima i tumorima dojke⁴. Godine 1998. otkriven je novi član obitelji

p53, gen p63, smješten na položaju 3q27-29, regiji kromosoma koja je često udvostručena u različitim vrstama tumora, što ukazuje na moguću onkogeni učinak gena p63⁵.

Mutacije gena p73 i p63 u tumorima nisu pronađene, ali postoji važna dominantno-negativna veza između proteina p53, p63 i p73. Ta veza temelji se na stvaranju heterokompleksa između određenih izoformi proteina p53 i p73, pri čemu dolazi do inhibicije njihove funkcije.

STRUKTURA PROTEINA P53/P63/P73

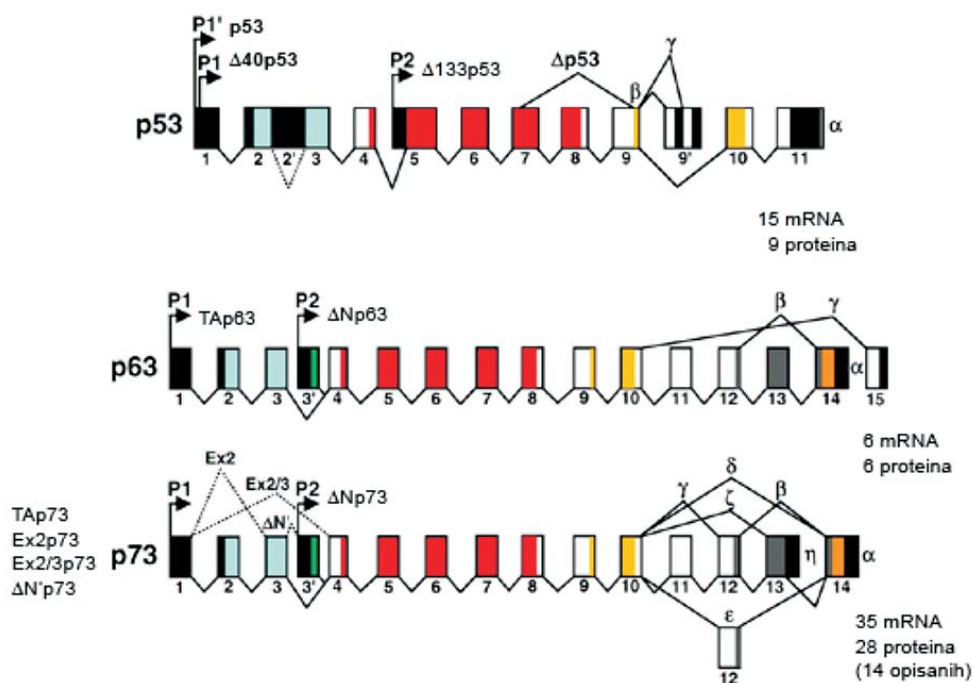
Obitelj gena p53 ima vrlo veliku strukturnu sličnost u organizaciji genoma (slika 1). Sva tri člana obitelji p53 sadrže tri područja karakteristična za transkripcijske faktore. Na N-kraju nalazi se transaktivacijsko područje (TAD; engl. *transactivation domain*), središnje i najveće je DNA-vezno područje (DBD; engl. *DNA-binding domain*), a na C-kraju nalazi se oligomerizacijsko područje (OD; engl. *oligomerization domain*)⁶. Između DNA-veznog područja i oligomerizacijskog područja nalazi se malo područje – signal za smještanje u jezgru (NLS; engl. *nuclear localization signal*). Nadalje, svi predstavnici obitelji p53 sadrže bar jedno područje bogato prolinom (PRD; engl. *proline rich domain*) s motivom PXXP (gdje je P = prolin, a X = bilo koja druga aminokiselina). Na svom C-kraju imaju inhibitorno područje i po-



Slika 1. Usporedna struktura gena p53, p63 i p73.

Figure 1. Comparative gene structure of p53, p63 and p73 genes.

Osnovni elementi strukture gena p53, p63 i p73 obuhvaćaju transaktivacijsko područje (TAD, od engl. *transactivation domain*), područje bogato prolinom (PXXP), DNA vezno područje (DBD; engl. *DNA-binding domain*), signalno područje za smještanje u jezgru (NLS; engl. *nuclear localisation signal*), oligomerizacijsko područje (OD; engl. *oligomerization domain*). Geni p63 i p73 imaju područje sa sterilnim α -motivom (SAM; engl. *sterile α motif*) i inhibitorno područje (engl. *inhibitory domain*), dok p53 ima bazno područje (BD; engl. *basic domain*).



Slika 2. Shematski prikaz izoformi gena p53/p63/p73.

Figure 2. Schematic presentation of p53, p63 and p73 isoforms.

Brojevi ispod kućica prikazuju eksone, crna boja kućica prikazuje nekodirajuće regije. Strelice označavaju različita mjesta početka transkripcije. Izoforme p53 i p73 nastale alternativnim izrezivanjem N-kraja prikazane su iscrtkanim linijama, dok su izoforme koje se razlikuju na svom C-kraju svih članova obitelji p53 prikazane punim linijama i grčkom nomenklaturom.

druče sa sterilnim α -motivom (SAM; engl. *sterile α motif*)⁷, dok protein p53 na svom C-kraju ima bazno područje (BD; engl. *basic domain*).

Svi članovi obitelji p53 imaju dva promotora (slika 2): P1 smješten uzvodno od eksona 1, i P2 smješten unutar eksona 3 (p63 i p73), odnosno eksona 4 (p53). Korištenjem dvaju promotora i alternativnim izrezivanjem sintetiziraju se različite izoforme. Prepisivanjem gena s promotora P1 nastaju izoforme koje imaju transaktivacijsko područje – p53, TAp63, TAp73. Kombiniranim korištenjem alternativnog izrezivanja na 5' kraju te različitih promotora nastaju dodatne izoforme proteina TAp63 i TAp73. Alternativnim izrezivanjem transkripta gena p73 koji se prepisuju s promotora P1 nastaju izoforme Ex2p73, Ex3p73 i Ex2/3p73. Izoformi Ex2p73 nedostaje ekson 2, izoformi Ex2/3p73 eksoni 2 i 3, a izoformi Ex3p73 ekson 3⁷. Prepisivanjem s alternativnog promotora P2 unutar introna 3, odnosno 4, nastaju izoforme bez transaktivacijskog područja kojima nedo-

staje dio N-kraja, a po funkciji su suprotne izoformama TAp63/p73 (Δ Np53, Δ Np63, Δ Np73). Δ Np63 i Δ Np73 imaju dominantno- negativni utjecaj na aktivnost gena p53, p63 i p73⁶, te mogu direktno inaktivirati njihove ciljane gene^{8,9}. Budući da izoforme TAp63/p73 i Δ Np63/p73 djeluju kao tumorski supresori, odnosno onkogeni, često govorimo o strukturi "dva gena u jednom".

Nedavno je utvrđeno da i gen p53 kodira za niz različitih izoformi, još uvijek nerazjašnjenih bioloških funkcija. Izoforme Δ 133p53 prepisuju se s alternativnog promotora P2 unutar introna 4¹⁰, dok se izoforme Δ 40p53 (p47) prepisuju s prvog promotora P1, ali nemaju isto inicijacijsko mjesto kao divilji tip p53; ili pak nastaju alternativnim izrezivanjem introna 2¹¹⁻¹³ (slika 2). Izoforme Δ 133p53 i Δ 40p53 zajednički se nazivaju Δ Np53 jer im nedostaje dio ili cjelovito transaktivacijsko područje.

Većina alternativnog izrezivanja, međutim, događa se na 3' kraju, od eksona 10 do 13, čime nastaju izoforme koje se razlikuju na svom C-kraju⁶.

Tako u zdravim stanicama postoji najmanje šest izoformi proteina p73 (α - ζ)¹⁴. Izoforme β i δ su krnje forme p73 α koje nastaju kao posljedica alternativnog okvira čitanja. Izoforma δ najsličnija je proteinu p53 jer joj nedostaje većina C-kraja. Izoforma γ sadrži dugi alternativni okvir čitanja koji rezultira stvaranjem C-kraja od dodatnih 75 aminokiselina. Izoforma ε sadrži C-kraj od dijelova okvira čitanja izoformi γ i α , dok izoforma ζ ima deleciju od 96 aminokiselina. Izoforme se razlikuju i u svojim biokemijskim funkcijama. Izoforma TAp73 β ima najjaču transkripcijsku aktivnost i sprječava stanični rast transformiranih stanica. Za razliku od TAp73 β , izoforme TAp73 α , δ i η imaju slabiju transkripcijsku aktivnost i nemaju toliko velik utjecaj na stanični rast, dok ga izoforme TAp73 γ i TAp73 ε uopće nemaju^{14,15}.

Protein TAp63 ima tri varijante nastale alternativnim izrezivanjem koje se razlikuju na svom C-kraju. Izoforma α ima punu duljinu, β nema dio iza eksona 12, a γ nema eksone 12 do 14, ali ima dodatni ekson 15¹⁶.

Alternativnim izrezivanjem introna 9 gena p53 nastaju tri različite izoforme: p53, p53 β i p53 γ , od kojih p53 β i p53 γ nemaju oligomerizacijsko područje. Za sada je poznato devet varijanti proteina p53: p53, p53 β , p53 γ , Δ 133p53, Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 40p53, Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ .

ULOGA GENA P63 I P73 U RAZVOJU I DIFERENCIJACIJI

Geni p63 i p73, unatoč svojoj strukturnoj sličnosti, imaju vrlo važnu i jedinstvenu ulogu u razvoju. Ta uloga nađena je kod p63 i p73 *knock out* miša¹⁷⁻¹⁹. Za razliku od p53 *knock out* miša, koji spontano višestruko razvija tumore u dobi do 6 mjeseci starosti, p63, odnosno p73 *knock out* miš ne razvija tumore, ali zato ima niz regulacijskih poremećaja: poremećena diferencijacija ektoderma i neurogeneze, promijenjena dinamika protoka cerebrospinalnog likvora i respiratorne sluzi, pojava hidrocefalusa, disgeneza hipokampusa, kronične infekcije i upale, te poremećaj feromonskih receptora¹⁹. Činjenicu da p53 *knock out* miš nema problema u razvoju možda možemo objasniti nadomjesnom ulogom gena p63 i p73.

p63 presudan je za stvaranje udova i morfogenezu gornjeg sloja kože, uključujući i stvaranje ad-

nekse. Životinje koje nemaju p63 pokazuju abnormalnosti ili čak odsustvo udova, kao i kraniofacijalne malformacije, u nemogućnosti su razviti kožu, prostatu i mliječne žlijezde, a žive tek nekoliko dana. Nasljedne mutacije p63 kod ljudi izazivaju rijedak autosomalno dominantni razvojni poremećaj EEC (engl. *ectrodactyly, ectodermal dysplasia and facial clefting*) i AEC (engl. *ankyloblepharon, ectodermal defects and clefting*). Ove mutacije inhibiraju vezanje izoformi TAp63 na molekulu DNA, dok mutacije sindroma EEC u proteinu Δ Np63 uzrokuju gubitak njegove dominantno-negativne uloge prema p53 i TAp63 γ ²⁰.

Važno je napomenuti da bazalne stanice normalnog epitela imaju visoku ekspresiju izoforme Δ Np63⁵. Njegova ekspresija, međutim, smanjuje se diferencijacijom keratinocita²¹⁻²⁴, a ekspresija p21 i 14-3-3 θ (ciljni geni p53) pojačava. Visoka ekspresija p63 zabilježena je pri diferencijaciji prijelaznog urotela²⁵, dok je kod invazivnih tumora mjehura jako smanjena.

p73 ima vrlo jasnu ulogu u procesu razvoja. Ekspresija p73 važna je za neurogenezu hipokampusa, prijenos signala kod receptora feromona, te za normalan protok i dinamiku cerebrospinalnog likvora i respiratorne sluzi¹⁹. Osnova poremećaja u razvoju hipokampusa u p73 *knock out* miševa je selektivni gubitak velikih bipolarnih neurona, takozvanih Cajal-Retzius (CR) stanica. CR neuroni imaju koekspresiju p73 i sekretornog glikoproteina reelina koji je nužan za migraciju neurona u korteks¹⁹.

p73 *knock out* miševi ne razvijaju tumore ni nakon dvije godine starosti¹⁹, ali imaju hidrocefalus, pokazuju nenormalno reproduktivno i socijalno ponašanje koje je kod glodavaca regulirano putem feromona i vomeronazalnim organima. Predominatna forma u razvoju mozga kod miša je Δ Np73²⁶ i zapravo je jedina pronađena u mozgu i simpatičkom gangliju u neonatalnim miševima.

p73 ima ulogu i u diferencijaciji. Dodatak retinoične kiseline uzrokuje pojačanu ekspresiju p73 što rezultira spontanom diferencijacijom neuroblastičnih stanica²⁷. Ekspresija izoformi proteina p73 nastalih prepisivanjem s C-kraja korelira s normalnom diferencijacijom mijeloidnih stanica. Tako se izoforme p73 α i β povezuju s normalnom diferencijacijom mijeloidnih stanica, dok se izo-

forme p73 γ , δ , ϵ i θ povezuju s nastankom leukemijskih stanica²⁸. Ovo ukazuje na specifičnu ulogu gena p73 u diferencijaciji koja ne korelira s ulogom p53, odnosno p63.

Gen p53 ima važnu ulogu tijekom embriogeneze. To su pokazala dosadašnja istraživanja ukidanjem autoregulatornog mehanizma povratna sprege s MDM2 čime je narušena količina p53 u stanicima^{29,30}. S obzirom na to da p63 i p73 *knock out* miševi ne razvijaju tumore, možemo pretpostaviti da se njihova složena uloga u tumorigenezi ne može objasniti samo ukidanjem cijelog gena, već se radi o nizu interakcija između različitih proteina i promijenjene ekspresije pojedinih izoformi.

ULOGA ČLANOVA OBITELJI P53 U REGULACIJI TRANSKRIPCije

Mnoge funkcionalne paralele nalazimo između p53, TAp73 i TAp63 s jedne strane te između Δ Np73 i Δ Np63 s druge strane. Protein p53 transkripcijski je faktor – veže se na više od 300 različitih promotora i na taj način potiče ekspresiju različitih gena. Činjenica da je najveća homologija između članova obitelji p53 pronađena u DNA-veznom području upućuje na činjenicu da članovi obitelji vežu iste sljedove DNA i aktiviraju iste promotore. Uz velika preklapanja, postoji određen stupanj selektivnosti u ulozi pojedinih članova obitelji vezanih uz regulaciju transkripcije različitih gena¹⁶. Protein TAp73 aktivira transkripciju niza istih ciljnih gena kao i p53, premda ne jednako učinkovito: tako učinkovitije aktivira 14-3-3 σ i Gadd45, a slabije p21^{Waf1/Cip1}. Nedavno su otkrivena specifična vezna mjesta u promotoru gena EVPL i SMARCD3 specifična samo za p63³¹. Gene mdm2, Bax, PUMA, ciklin G i IGFBP podjednako aktiviraju svi članovi obitelji gena p53.

Za transkripcijsku aktivnost obitelji p53 odgovoran je C-kraj³². U različitim stresnim uvjetima, C-kraj proteina p53 odgovoran je za selekciju posttranslacijskih modifikacija i direktnih interakcija protein-protein. Ulogu C-kraja u posttranslacijskim modifikacijama i interakcijama proteina TAp63 i TAp73 potrebno je istražiti, premda je poznato da se većina alternativnog izrezivanja događa na ovom dijelu. Iz ovoga zaključujemo da raznolikost i regulacija C-kraja ima vrlo važnu ulogu u transkripcijskoj aktivnosti različitih izoformi obitelji p53.

ULOGA GENA P53, P63 I P73 U TUMORIGENEZI

p53 je transkripcijski faktor koji se specifično i izravno veže kao tetramer na ciljno mjesto molekule DNA (engl. *p53 – responsive elements* (pRE))^{33,34}. Tumor supresorska uloga gena p53 važna je za sprječavanje nastanka i rasta tumora. Ta uloga ostvaruje se usklađivanjem ili mijenjanjem ekspresije različitih ciljnih gena odgovornih za nastanak tumora. Otkriće inhibitora ciklin ovi-

Članovi obitelji p53 mogu regulirati ekspresiju brojnih gena koji sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa, apoptoze, staničnog starenja, ali i samih sebe.

sne kinaze, gena p21/Waf1, objasnilo je na koji način p53 zaustavlja stanični ciklus³⁵. Tumor supresorski protein p53 može izazvati staničnu smrt neovisno o svojoj transkripcijskoj aktivnosti, npr. translokacijom i aktivacijom obitelji gena bcl-2, odgovornih za poticanje apoptoze³⁶ U većini tumora ljudi gen p53 nije funkcionalan. Razlog tome su brojne mutacije, gubitak aktivatora transkripcije p14^{ARF}, utišavanje ili prekomjerna ekspresija mdm2, odnosno amplifikacija antagonista gena p53. Kao posljedica mutacija p53 u germinalnoj liniji javlja se Li Fraumeni sindrom koji uključuje razvoj niza tumora u ranoj dobi³⁷. Osim gubitka tumor supresorskih aktivnosti (zastoj rasta i apoptoza), neki mutirani proteini p53 stječu onkogeno svojstvo³⁸. Uloga mutiranih proteina p53, koji su većinom izgubili tumor supresorsku aktivnost te stekli inhibitornu aktivnost, može se objasniti interakcijama između onkogenih i tumor supresorskih izoformi.

Za tumor supresorsku ulogu gena p53 odgovorno je DNA-vezno područje i više od 80 % svih mutacija ovog gena nalazi se upravo u ovom području⁷. Mutirani p53 je stabilan, međutim ne veže se na DNA i ne potiče transkripciju nekih gena (npr. p21 i mdm2).

Iako su p63 i p73 rijetko mutirani u tumorima²⁷, posljedica nasljednih mutacija p63 su sindromi EEC i AEC. Sve osim jedne, missense mutacije gena p63 u sindromu EEC smještene su u DNA-veznom području. Ovo ukazuje na važnu ulogu

DNA-veznog područja u funkciji obitelji p53 u sprječavanju nastanka i razvoja tumora. Do danas nije pronađen niti jedan sindrom u ljudi koji bi se mogao povezati s mutacijama gena p73³⁷.

Unatoč sličnosti s p53, gen p73 ne podliježe klasičnoj Knudsonovoj hipotezi "dva hica" karakterističnoj za tumor supresorske gene. Već je spomenuto da je gen p73 smješten u regiji 1p36 koja je često deletirana u tumorima. Gubitak heterozigotnosti gena p73 prisutan je u različitim tumorima: neuroblastomima³⁹, tumorima pluća⁴⁰ i jajnika⁴¹; dok je u tumorima prostate⁴² i jednjaka⁴³ njegova učestalost vrlo niska. Za razliku od p53 *knock out* miša, koji spontano višestruko razvija tumore u dobi do 6 mjeseci starosti, p63 i p73 *knock out* miševi ne razvijaju tumore, ali zato imaju niz razvojnih poremećaja⁴⁹. Prema tome, p73 nije klasičan tumor supresorski gen.

Zabilježena je, međutim, viša razina ekspresije proteina p73 u različitim tumorima (neuroblastom, tumor pluća, debelog crijeva, dojki, mjehura, jetre, jajnika) nego u tkivima iz kojih potječu, što upućuje na lošiju prognozu za bolesnika^{16,44}. Naime, istraživanja koja se temelje na mjerenju ekspresije p73 u različitim stadijima razvoja tumora debelog crijeva pokazala su kako je prekomjerna ekspresija p73 povezana s lošijim ishodom bolesti⁴⁵. Rezultati opsežnih istraživanja velikog broja različitih tumora doveli su do otkrića malobrojnih missense mutacija gena p73. Budući da pronađene mutacije nisu imale značajan utjecaj na transkripcijsku aktivnost p73, može se zaključiti da je za proces tumorigeneze važnija promijenjena ekspresija od gubitka funkcije gena p73⁶. Naime, i TAp73 i ΔNp73 prekomjerno su ekspimirani u mnogim tumorima^{44,46,47}. U različitim tumorima ljudi i staničnim linijama izvedenim iz tumora uočene su nenormalne varijante izrezivanja introna gena p73. Budući da u različitim dijelovima istog tumora mogu biti prisutne različite varijante proteina p73, heterogenost p73 odražava biološku heterogenost tumora¹⁶.

p53 je kratkoživući protein čija stabilnost ovisi o autoregulatornoj negativnoj povratnoj spregi⁴⁸ nekoliko ciljnih gena kao što su Mdm2, Pirh2 i COP1 koji imaju ubikvitinsku ligaznu aktivnost i razgrađuju p53. Mutirani p53 nesposoban je aktivirati mdm2, što rezultira nefunkcionalnim auto-

regulatornim mehanizmom povratne sprege i nakupljanjem mutiranog proteina⁴⁹. Gen mdm2 ne razgrađuje p73 iako ima mogućnost vezivanja za njega što ukazuje na drugačiji mehanizam razgradnje ovog proteina^{50,51}. Dosadašnja istraživanja pokazala su da u razgradnji p73 sudjeluju proteini PMS2, tirozin kinaza c-Abl, Itch, p300, NEDL1, PML i ciklin G^{52,53}.

ULOGA ČLANOVA OBITELJI P53 U REGULACIJI APOPTOZE

Gen p53 kontrolira stanični odgovor na stres pri oštećenjima DNA, u stanju hipoksije ili pak aktivacije onkogena, potiče apoptozu ili zastoj staničnog ciklusa i na taj način sprječava nastanak tumora. Postoji više signalnih puteva koji stanicu vode u apoptozu. Izbor puta ovisi o nizu ciljnih gena koji mogu biti aktivirani pomoću p53. Značajno je da se p53 brzo nakuplja kao odgovor na oštećenje DNA¹⁶. Za indukciju apoptoze potrebno je područje AD2 koje stupa u interakciju s komponentama transkripcijskog sustava i koaktivatorom p300/CBP⁷.

Dva najbolje proučena apoptotska puta su: 1) izvanstanični put – izvanstanični ligand veže se na površini stanice za *death receptor* i time pokreće signal za aktivaciju kaspaze 8; i 2) unutarstanični ili mitohondrijski put – uključuje promjenu potencijala na mitohondrijskoj membrani ubrzavajući otpuštanje citokroma c i aktivaciju kaspaze 9. U ovom putu važnu ulogu imaju geni Bax i p53A-IP1 (od engl. *p53 apoptosis inducing factor 1*)^{54,55}. Postoje dvije skupine gena odgovornih za apoptozu koje aktivira p53: 1) mdm2 i p21 koji su regulirani neovisno o prisustvu TAp63 i TAp73 i 2) PARP, Bax i NOXA koji su regulirani samo u prisustvu TAp63 i TAp73. Istraživanja na modelu fibroblasta dovela su do zaključka da i proces apoptoze ovisan o p53 zahtijeva funkcionalnost TAp63 i TAp73. Na taj bi se način mogla objasniti visoka razina TAp73 i TAp63 u stanicama tumora čovjeka, čak i onda kada nisu prisutne mutacije p63/p73⁶.

Protein TAp73 nakuplja se i fosforilira na poziciji Tyr99 kao odgovor na stanični stres⁵⁶. Akumulacija i fosforilacija tirozina proteina TAp73 ovisi o aktivaciji tirozin kinaze c-Abl u jezgri^{56,57}. Dosadašnja istraživanja pokazala su da različiti štetni agensi

koji uzrokuju stanični stres na različite načine djeluju na aktivnost gena p73. Tako cisplatin i taksol induciraju nakupljanje TAp73⁵⁸ i povećavaju njegovu vrijeme poluživota, dok aktinomycin D, ionizirajuće zračenje i metil-metan-sulfonat ne pokazuju isti učinak. Istraživanja su pokazala kako c-Abl može, ovisno o vrsti stanice i oštećenju DNA, stabilizirati ili fosforilirati TAp73¹⁶.

Proteini s transaktivacijskim područjem (TAp73) mogu oponašati funkciju p53 transaktivirajući mnoge ciljane gene p53 i na taj način potaknuti apoptozu, dok proteini bez transaktivirajućeg područja (Δ Np73) inhibiraju apoptozu i pokazuju dominantno-negativni učinak prema p53 i TAp73.

MEĐUDJELOVANJE ČLANOVA OBITELJI P53

Fizičko i funkcionalno međudjelovanje članova obitelji p53 opisano je u tumorima, a ostvaruje se na dva načina.

Prvi način je kooperacijom i kompeticijom konzerviranih regija u promotorima gena koje aktivira obitelj gena p53 i samih gena obitelji p53⁵⁹⁻⁶¹. DNA-vezno područje ključno je za interakcije kod p53, a oligomerizacijsko područje kod p63/p73⁶². Istraživanja su pokazala da polimorfizam na položaju 72 mutiranog p53 utječe na vezivanje za TAp73. Varijanta 72Arg stvara jaču interakciju s drugim proteinima nego polimorfizam 72Pro⁶³. Također je pokazano da arginin na položaju 72 ima veliku selektivnu prednost kada je mutirani p53 recesivan, tj. kada ne može inaktivirati p53 protein divljeg tipa⁶⁴. Ove dvije varijante aktiviraju iste ciljane gene (p21, mdm2, Fas i pIG3), ali je varijanta 72Arg mnogo učinkovitija u aktiviranju transkripcije od varijante 72Pro⁶⁵.

Drugi način je kada direktnim fizičkim interakcijama izoformi proteina p63/p73 dolazi do promjene funkcije heterotetramera koji se veže na DNA i njegove transkripcijske aktivnosti⁶⁶. Dakle, heterotetrameri koji nastaju između TAp63/p73 i Δ Np63/p73 imaju slabiji učinak na aktivnost transkripcije nego homotetrameri TAp63/p73. Nedavno je pokazano da izoforma TAp73 izravno aktivira transkripciju endogenog Δ Np73 vezivanjem na dva specifična ciljna mjesta za p73 smještena u P2 te kako p53 inducira Δ Np73 na razini mRNA i proteina direktnom aktivacijom P2. Ovo je primjer negativne povratne sprege i ukazuje na po-

stojanje autoregulatornog mehanizma koji regulira funkciju p53 i TAp73⁶⁷. Također je pokazano kako izoforme Δ Np73 stabiliziraju TAp73 uzrokujući njihovo nakupljanje uz istodobnu inaktivaciju⁶⁸. Inhibicija p53 postiže se kompeticijom za vezivanje na DNA, a inhibicija TAp73 direktnim proteinskim interakcijama⁶⁰. Ovakva struktura ukazuje na ideju o poremećenoj ravnoteži između pojedinih proteina pri razvoju tumora.

Interakcija među proteinima p53 obitelji važna je i u modulaciji citotoksičnosti kemoterapeutika te ishodu same kemoterapije. Povećana ekspresija određenih mutiranih p53 može dovesti do sprječavanja poticanja apoptoze pomoću proteina p73 u liječenju kemoterapijom^{69,70}.

ZAKLJUČAK

Otkriće homologa gena p53 – p63 i p73 izazvalo je velika očekivanja u istraživanju njihove biološke uloge. Danas je jasno da, bez obzira koliko su slični, članovi obitelji p53 imaju vlastiti identitet. Nedavno je utvrđeno da, poput p63 i p73, i gen p53 sadrži još jedan promotor te da dolazi do alternativnog izrezivanja i sinteze višestrukih izoformi kojima nedostaje dio N- ili C-kraja. Ukratko, p53/p63/p73, odnosno njihove izoforme, imaju različite uloge u tumorigenezi, i upitno je možemo li ih smatrati klasičnim tumor supresorskim genima. Proteini p63 i p73 imaju važne uloge u razvoju, potpuno nezavisne o p53. Svi su ovi proteini uključeni u kompleksnu mrežu interakcija koje određuju sudbinu stanice, stoga su daljnja istraživanja međusobnog djelovanja proteina p53/p63/p73 neophodna za razumijevanje njihove individualne i kolektivne uloge.

LITERATURA

1. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
2. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;278:261-3.
3. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
4. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-19.
5. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-16.

6. Benard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* 2003;21:182-91.
7. Scoumanne A, Harms KL, Chen X. Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1178-85.
8. Wu G, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee CC et al. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res* 2003;63:2351-7.
9. Liu G, Nozell S, Xiao H, Chen X. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol* 2004;24:487-501.
10. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005;19:2122-37.
11. Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U et al. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* 2002;21:6722-8.
12. Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 2002;4:462-7.
13. Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2004;24:7987-97.
14. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K. New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* 1999;18:4993-8.
15. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M et al. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* 1998;188:1763-8.
16. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000;113:1661-70.
17. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398:708-13.
18. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000;404:99-103.
19. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714-8.
20. Celli J, Duijff P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999;99:143-53.
21. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3156-61.
22. Nylander K, Coates PJ, Hall PA. Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer* 2000;87:368-72.
23. Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;113:1099-105.
24. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol* 2003;23:2264-76.
25. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 2002;161:1199-206.
26. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000;289:304-6.
27. Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M, Moll UM. Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ* 1998;9:897-903.
28. Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA et al. Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:62-5.
29. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995;378:206-8.
30. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 1995;378:203-6.
31. Osada M, Park HL, Nagakawa Y, Yamashita K, Fomenkov A, Kim MS et al. Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol* 2005;25:6077-89.
32. Harms KL, Chen X. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol* 2005;25:2014-30.
33. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992;1:45-9.
34. Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B et al. Further characterisation of the p53 responsive element—identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 1997;14:85-94.
35. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
36. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:631-6.
37. Harms K, Nozell S, Chen X. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:822-42.
38. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
39. Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, Takada N, Sunahara M, Shishikura T et al. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 1999;18:1061-6.

40. Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 1998;58:1380-3.
41. Imyanitov EN, Birrell GW, Filipovich I, Sorokina N, Arnold J, Mould MA et al. Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. *Oncogene* 1999;18:4640-2.
42. Takahashi H, Ichimiya S, Nimura Y, Watanabe M, Furusato M, Wakui S et al. Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:2076-7.
43. Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, Sakiyama S, Seki N, Ohira M et al. p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998;78:437-40.
44. Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H et al. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004;64:2449-60.
45. Sun XF. p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:165-70.
46. Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND, Moll UM. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res* 1999;59:3257-63.
47. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M et al. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002;196:765-80.
48. Yang Y, Li CC, Weissman AM. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* 2004;23:2096-106.
49. Zauberman A, Barak Y, Ragimov N, Levy N, Oren M. Sequence-specific DNA binding by p53: identification of target sites and lack of binding to p53 – MDM2 complexes. *Embo J* 1993;12:2799-808.
50. Zeng X, Chen L, Jost CA, Maya R, Keller D, Wang X et al. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* 1999;19:3257-66.
51. Balint E, Bates S, Vousden KH. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* 1999;18:3923-9.
52. Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH et al. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo J* 2005;24:836-48.
53. Zeng X, Lee H, Zhang Q, Lu H. p300 does not require its acetylase activity to stimulate p73 function. *J Biol Chem* 2001;276:48-52.
54. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003;112:481-90.
55. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* 2003;139:89-97.
56. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Melino G, Wang JY. Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ* 1999;6:1146-53.
57. Shaul Y. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 2000;7:10-6.
58. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr., Levrero M et al. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-9.
59. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002;416:560-4.
60. Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* 2002;277:14177-85.
61. Yang A, Zhu Z, Kapranov P, McKeon F, Church GM, Gingeras TR et al. Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell* 2006;24:593-602.
62. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001;21:1874-87.
63. Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000;25:47-54.
64. Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A et al. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* 2001;22:515-7.
65. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33:357-65.
66. Chan WM, Siu WY, Lau A, Poon RY. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* 2004;24:3536-51.
67. Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* 2002;62:636-41.
68. Slade N, Zaika AI, Erster S, Moll UM. DeltaNp73 stabilises TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ* 2004;11:357-60.
69. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003;3:387-402.
70. Soussi T. p53 mutations and resistance to chemotherapy: A stab in the back for p73. *Cancer Cell* 2003;3:303-5.